

Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina

**Surto de candidemia por *Candida parapsilosis* resistente ao fluconazol, em um hospital em Brasília: Caracterização clínica, molecular e avaliação dos fatores associados**

***Henrique Marconi Sampaio Pinhati***

***Brasília – DF***

**2015**

**Henrique Marconi Sampaio Pinhati**

**Surto de candidemia por *Candida parapsilosis* resistente ao fluconazol, em um hospital em Brasília: caracterização clínica, molecular e avaliação dos fatores associados**

**Tese submetida ao Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, para obtenção do Título de Doutor em Medicina**

**Orientador Prof. Dr. Luiz Augusto Casulari Roxo da Motta**

**Brasília**

**2015**

# DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a várias pessoas que participaram nesse árduo processo de decisão e execução desta obra, entre elas:

ao Dr Luiz Augusto Casulari Roxo da Motta, um grande entusiasta da ciência médica. Eu o conheço há muito tempo e sempre o ví como um modelo de médico e pesquisador a ser imitado. O apoio que recebi dele foi fundamental nesse processo.

ao Dr Arnaldo Lopes Colombo, além dos claros dotes de pesquisador que dispensa qualquer comentário, uma grande pessoa humana. Eu resumiria que o Dr Arnaldo foi um pai e devoto a ele minha gratidão e respeito.

aos meus amigos e irmãos na fé do Centro de Estudos e Atividades Culturais, com os quais venho compartilhando muitas empreitadas da minha vida.

dedico “at last but not least” como dizem os americanos, aos meus queridos e amados pais e irmãos com os quais estarei ligado para sempre pelo vínculo da vida e do sangue.

# AGRADECIMENTOS

Agradeço à equipe do Laboratório Especial de Micologia da Universidade Paulista de Medicina cuja cabeça é o dr Arnaldo Lopes colombo, e menciono em especial Ana Carolina Remondi Souza, Ricardo Andreotti Siqueira e Fernando Bizerra.

Agradeço a Camila Maria Gomes Damasceno, colega e fiel amiga das labutas à frente de CCIHs que coordenei e coordeno.

Agradeço a Fabiola Fernandes S. Castro que gentilmente guardou as cepas para serem enviadas de Brasília para São Paulo.

“A pergunta não poderia ser mais: o que eu ainda devo esperar da vida – mas deveria ser: o que a vida espera de mim?”

Viktor Frankl

## RESUMO

**Introdução.** Candidíase hematogênica é um problema cada vez mais relevante em hospitais terciários em todo o mundo, onde há uma grande variação nas taxas de incidência, mortalidade e as espécies de *Candida* envolvidas. *Candida parapsilosis* é a *Candida* não albicans mais comumente isolada nos hospitais da América Latina. Tradicionalmente, apresenta baixo nível de resistência aos antifúngicos comumente empregados na prática clínica e também está associada às menores taxas de letalidade entre as candidemias de diferentes espécies, entre elas a *Candida albicans*. Este é o primeiro relato de um surto de candidemia por *C. parapsilosis* resistente ao fluconazol (CPRF), onde os pacientes tiveram uma mortalidade além do esperado.

**Material e Métodos.** Este é um estudo transversal e observacional. Coletamos dados clínicos e microbiológicos de todos os episódios de candidemia diagnosticados de julho de 2011 a fevereiro de 2012 em um hospital terciário de 200 leitos em Brasília. A identificação inicial e os testes de susceptibilidade foram feitos pelo aparelho VITEK 2 - Bio-Mérieux. Os isolados de *C. parapsilosis* resistente ao fluconazol foram enviados para o laboratório de referência (LEMI-UNIFESP), para confirmação da identificação por tipagem molecular, perfil de resistência pelo teste de microdiluição padronizado pelo CLSI. Análise univariada (testes de qui ao quadrado e Fisher) e multivariada foram empregados para identificar fatores associados com a infecção por CPRF.

**Resultados.** Foi identificado 42 episódios de candidemia no período, e 15 foram em mulheres. A mediana de idade foi 72 anos. A incidência de candidemia no período foi 4,05 episódios por 1,000 admissões, 30 casos (71,4%) por *C. parapsilosis*, 23 dos quais (54,8%) eram por CPRF (CIM 50% = 16mcg/ml). Encontravam-se na UTI 95,2% dos pacientes no momento do diagnóstico da candidemia. O único fator associado à CPRF foi diabetes melito. A letalidade global por candidemia foi 45,2% e 43, 5% no grupo CPRF.

**Discussão:** Este é o primeiro relato de um surto por *Candida parapsilosis* fluconazol resistente na América Latina. A concentração de casos na UTI e a baixa prévia à exposição ao fluconazol sugerem transmissão horizontal. Os pacientes tiveram alta taxa de letalidade a despeito do tratamento com anfotericina lipossomal.

**Palavras-chave:** Candida; Candidemia; resistência ao fluconazol; tratamento; antifúngico.

## ABSTRACT

**Introduction:** Hematogenous candidiasis is an increasing problem in tertiary hospitals around the world, where there are large variations in incidence rates, mortality and agents involved. *C. parapsilosis* is the main species of non-albicans candida in many hospitals in Latin America, with a low resistance to various antifungal agents and lower mortality rates than *C albicans*. This is a report of the first outbreak of candidemia by fluconazole resistant *C parapsilosis* whose patients had mortality beyond the expected.

**Material and Methods:** It is cross-sectional, observational study. We collect clinical and microbiological data of all candidemia episodes diagnosed from July/2011 to february/2012 in a tertiary hospital of 200 beds in Brasília. Initial identification and susceptibility testing were performed by the VITEK 2 - Bio-Mérieux system. Isolates of *Candida parapsilosis* Fluco-R were sent to reference laboratory (LEMI-UNIFESP) for confirmation of the identification by molecular typing and to antifungal resistance profile by CLSI microdilution test. Univariate (Chi Square and Fisher) and Multivariate analysis was performed to identify associated factors related to *C parapsilosis* fluconazole resistant (CPFR) infection.

**Results:** We identified a total of 42 episodes of candidemia in the period, 15 in women. The median age was 72 years. The incidence of candidemia in the period was 4.05 per 1000 admissions, 30 cases (71.4%) by *Candida parapsilosis*, 23 of which (54.8%) were resistant to fluconazole (MIC<sub>50%</sub> = 16mcg/ml). 95.2% of patients were in the ICU at the time of diagnosis of CPRF. Previous use of fluconazole occurred in only 21.7% of cases of candidemia CPRF . The only risk factor for infection founded for CPRF was diabetes. Overall mortality of candidemia was 45.2% and 43.5% for CPRF infection .

**Discussion:** This is the first report of an outbreak of *Candida parapsilosis* fluconazole resistant in Latin America. The concentration of cases in the ICU and low prior exposure to fluconazole suggest horizontal transmission. Patients had high mortality despite treated with Liposomal Amphotericin.

**Keywords:** Candida; Candidemia; Fluconazole Resistance; Antifungal Treatment.



## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: As características das colônias ao CHROMagar

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Distribuição das candidemias no Hospital Santa Luzia por ano e o coeficiente de incidência por 1.000 internações/ano

Tabela 2 - distribuição das cândidas identificadas, idade média e percentagem de resistência ao Fluconazol

Tabela 3 - Comparação entre os valores de CIM obtidas pelo VITEK 2 e pela microdiluição em Caldo (MDC) das 14 amostras de *C. parapsilosis* testadas no LEMI.

Tabela 4 - Fatores de Risco para infecção por *Candida parapsilosis* resistente ao fluconazol (teste do Qui Quadrado e teste exato de Fisher)

Tabela 5 - Fatores de Risco para infecção por *Candida parapsilosis* resistente ao fluconazol (teste do t student e Mann-Whitney)

Tabela 6 - Variáveis de desfecho para os grupos de pacientes com infecção por *Candida parapsilosis* resistente e sensível ao fluconazol (teste do Qui Quadrado e teste exato de Fisher)

Tabela 7 - Fatores de Risco para infecção por cândida resistente ao fluconazol (teste do Qui Quadrado e teste exato de Fisher)

Tabela 8 - Fatores de Risco para infecção por cândida resistente ao fluconazol (teste do t student e Mann-Whitney)

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AmB - Anfotericina B

ASC - área sob a curva -

BPs - breakpoints

CPRF - *Candida parapsilosis* resistente ao fluconazol

CNA - *Candidas não-albicans*

CI - candidíase invasiva

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CIM - concentração inibitória mínima

EUA - Estados Unidos da América

EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility*

LEMI - Laboratório Especial de Micologia

MDC - microdiluição em caldo

NPT - nutrição parenteral total

UFC – Unidades formadoras de colônias

UTI - unidade de terapia intensiva

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1. EPIDEMIOLOGIA DA CANDIDEMIA	14
1.2. FISIOPATOLOGIA, FATORES DE RISCO PARA A CANDIDEMIA E PRINCIPAIS ESPÉCIES	15
1.3. OPÇÕES TERAPÊUTICAS PARA CANDIDEMIA	18
1.4. TESTES DE SUSCETIBILIDADE <i>IN VITRO</i> AOS ANTIFÚNGICOS	20
1.5. OS PONTOS DE CORTES DE SUSCEPTIBILIDADE DAS CÂNDIDAS AO FLUCONAZOL	24
1.6. MECANISMOS DE AÇÃO E RESISTÊNCIA AO FLUCONAZOL	25
1.7. A SUSCEPTIBILIDADE DA <i>C. ALBICANS</i> , <i>C. PARAPSILOSIS</i> E <i>C. TROPICALIS</i> AO FLUCONAZOL	26
1.8. A <i>CANDIDA PARAPSILOSIS</i>	27
1.9. O HOSPITAL SANTA LUZIA	28
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
<b>3. PACIENTES E MÉTODOS</b>	<b>31</b>
<b>4. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>34</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>35</b>
5.1. ARTIGO SOB ANÁLISE DO BMC INFECTIOUS DISEASES	35
5.2. ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY	54
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>79</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	<b>81</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>86</b>
8.1. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	87
8.2. RESULTADOS NÃO PUBLICADOS NOS ARTIGOS	89
8.3. FICHA CLÍNICA DE CANDIDEMIA	95

## APRESENTAÇÃO

O presente estudo foi provocado como uma resposta que buscava para o enfrentamento de um problema que assolava o hospital que até aquele momento trabalhava como responsável pelo Serviço de Controle de Infecção Hospitalar. Trata-se da introdução de uma cepa de *Candida parapsilosis*, associada a repetidos casos de infecções da corrente sanguínea, altamente resistente aos antifúngicos tradicionalmente indicados para esse tratamento, e aparentemente com elevada letalidade.

A cepa foi introduzida por volta do ano de 2007, num momento que os métodos de identificação das espécies de *Candida* estavam começando a entrar na prática clínica, na nossa cidade, e ainda não estavam validados métodos de antifungigrama fornecido pelos aparelhos automatizados de identificação.

Diante do número crescente de casos, trouxe em 2010, o problema para discussão em um encontro de especialistas em infecções fúngicas denominado INFOCUS, ocorrido naquele ano em Santiago do Chile. Recebi do organizador do evento, Dr. Arnaldo Lopes Colombo, o convite para enviar umas amostras para análise em seu laboratório. Nesse mesmo ano, já no Brasil, fui a São Paulo no Laboratório Especial de Micologia – LEMI, da UNIFESP, dirigido pelo prof. Arnaldo. Alguns dias depois recebo no meu celular uma ligação confirmando que as cepas de *Candida parapsilosis* apresentavam um padrão de resistência que fugia muito do conhecido até então, ou seja, tratava-se de um problema novo.

Em 2011, estive com o professor Arnaldo e iniciamos os trabalhos juntos que culminaram na confecção de duas teses, a primeira já defendida por Ana Carolina Remondi, foi uma análise molecular para caracterização da resistência das cepas de Brasília. A agora doutora Ana conseguiu identificar o gene de resistência e inclusive provar que se tratava de um surto, pois as cepas repetiam o mesmo padrão de mutação.

A segunda tese está concretizada no presente trabalho, no qual, além de descrever o fenômeno, procurei fazer um exaustivo levantamento de todos os

fatores que pudessem estar implicados no surto, na tentativa de encontrar uma causa clínica e explicação do problema.

Assim, nessa Tese, faço inicialmente uma introdução contextualizando a relevância mundial das infecções fúngicas por *Candida* na corrente sanguínea, e a maneira proposta para o enfrentamento nas várias partes do mundo, incluindo padrões de incidência, apresentação e resistência, além de mostrar como diferentes diretrizes sugerem o tratamento. A seguir o texto descreve o fenômeno como se apresentou de forma detalhada.

Foi feita uma descrição do método de resultados do trabalho e por fim são apresentados os dois artigos que resultaram deste estudo um já aceito em revista de alto impacto e o outro submetido, está em análise.

Além dos artigos esse estudo, já tinha gerado duas publicações no congresso ICAAC - Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy – um dos mais relevantes do mundo em microbiologia, organizado pela American Society for Microbiology, nos anos de 2013 e 2014.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. EPIDEMIOLOGIA DA CANDIDEMIA

As cândidas são fungos que existem predominantemente sob a forma de pequenas leveduras unicelulares (4-6µm) e, no homem, se reproduzem de forma assexuada por brotamento. Esses microorganismos são colonizantes comuns da microbiota humana incluindo regiões da pele, orofaringe, trato respiratório inferior, sistema geniturinário e, em especial, do trato gastrointestinal (1). Em pacientes hospitalizados ou em acompanhamento por clínicas de tratamento ambulatorial, no entanto, podem não apenas colonizar, mas causar infecções. Uma das mais temidas infecções no ambiente nosocomial é a invasão da corrente sanguínea por cândida conhecido como candidíase invasiva (CI), candidíase hematogênica ou candidemia (2).

Candidemia é alarmante problema nos hospitais terciários ao redor do mundo, especialmente nas unidades de terapia intensiva (UTI). Apesar dos avanços nas práticas médicas, a candidíase hematogênica é ainda complicação infecciosa de difícil diagnóstico, associada ao prolongamento do tempo de hospitalização (3), em torno de 30 dias, aumento dos custos hospitalares (4), além de ser responsável por mortalidade atribuída de até 50% (5) (6).

As taxas de incidência de candidemia hospitalar variam amplamente entre as diversas áreas geográficas e diferentes centros médicos. Nos Estados Unidos da América (EUA) notifica-se incidências de até 2,4 episódios de candidemia por 1.000 admissões hospitalares (7). Na Europa diferentes estudos mostraram taxas que variaram de 0,2-1,87 por 1.000 admissões, nos diversos países (8). Na América Latina a candidemia nosocomial é importante problema tanto em adultos quanto em crianças. Um recente inquérito envolvendo 8 países e 20 centros, identificou incidências variando entre 0,33 e 1,95 por 1.000 admissões, e a taxa brasileira é de 1,38 por 1.000 admissões (9). Por fim, a ampla variação também é notificada no Brasil e as taxas de incidência variam entre 0,33 e 6 por mil admissões (10) (11).

A grande variação das taxas de incidência de candidemia é, provavelmente, reflexo da combinação de vários fatores, entre eles as diferenças nos recursos

disponíveis para a assistência médica e programas de treinamento em boas práticas, dificuldades na implementação de programas de controle de infecção nos hospitais dos países em desenvolvimento, limitações no número de trabalhadores da saúde envolvidos no cuidado dos pacientes críticos em UTIs, a prática de terapias antimicrobianas (12) e antifúngicas muito agressivas e a identificação e terapêutica precoce, preemptiva, ou até profilática de paciente de alto risco para o desenvolvimento de candidemia (11).

## 1.2. FISIOPATOLOGIA, FATORES DE RISCO PARA A CANDIDEMIA E PRINCIPAIS ESPÉCIES

Há três importantes etapas que compõe o quadro de candidíase invasiva: a) colonização ou aumento da carga fúngica no tecido, resultado, por exemplo, do uso de antimicrobianos; b) quebra das barreiras naturais das mucosas e/ou pele, resultado da inserção de dispositivos intravasculares, trauma ou cirurgia recente, mucosite associada a quimioterápicos e radiação; c) disfunção do sistema imune, como por exemplo, a neutropenia que leva à sua proliferação e disseminação (1).

Assim, junto à colonização, imunodepressão e invasão há conhecidos fatores que se destacam para o risco de CI. Entre os fatores podemos citar: internações prolongadas e o uso de antibióticos de largo espectro, terapias imunossupressoras; emprego de cateteres centrais e, em especial, quando associado ao uso de nutrição parenteral total, e cirurgias em especial envolvendo vísceras ocas. Estão ainda relacionados: doenças crônicas em especial diabetes, terapia renal de substituição, ventilação mecânica prolongada e quadros sistêmicos disseminados, sepse e altos escores de gravidade medidos por índices como o “APACHE” (13).

Apesar de os fatores elencados, ainda não se tem elementos que predizem quais os pacientes que irão de fato desenvolver candidemia. Em outras palavras, inúmeros pacientes que tem muitos dos fatores de risco elencados não vão evoluir com CI, ou sim irão, mas em um momento imprevisível. Para responder a esse questionamento, vários estudos tentam identificar métodos ou algoritmos que

possam prever quais os pacientes que estão propensos a desenvolver candidemia (13).

O primeiro estudo controlado foi realizado por Pittet e colaboradores. Durante seis meses, foram coletadas culturas seriadas de três sítios: orofaringe, traqueia e estômago em todos os pacientes admitidos em UTI do Hospital Universitário de Genebra. De 650 pacientes admitidos, 29 estavam ou desenvolveram colonização por *Candida*. Entre os pacientes colonizados, foi feita análise dos fatores de risco para desenvolvimento de CI. Foram identificados: severidade da doença medida pelo índice "Physiology and Chronic Health Evaluation - APACHE II" e uso prolongado de antibioticoterapia de largo espectro (usaram em média 16 dias a mais de antibióticos). Observou-se, também, que os pacientes infectados tinham cargas mais elevadas de fungo à cultura quantitativa (14).

Paphitou e colaboradores realizaram estudo retrospectivo, em um único centro com 327 pacientes, que estiveram internados na UTI cirúrgica, por quatro ou mais dias. Trinta e seis pacientes (11%) desenvolveram CI, dos quais 2,8% foi provada, 4,3% foi provável e 3,9% foi possível. Após análise multivariada, identificaram os fatores preditores de risco de CI: necessidade de hemodiálise, diabetes melito, uso de nutrição parenteral total (NPT) e o uso de antibióticos de largo espectro (15).

Ostrosky-Zeichner e colaboradores conduziram um estudo retrospectivo em doze centros dos EUA e Brasil, a partir da análise de 2.890 pacientes igual ou superior a 19 anos, internados há mais de quatro dias em UTIs, na tentativa de identificar fatores de risco para CI. A taxa de incidência foi 3% porque foram identificados 88 casos. Desses casos elegíveis, a *Candida* foi identificada no sangue em 72 casos e, nos 16 demais, em tecidos estéreis. A melhor previsão para o advento de candidemia (capturando 45,5% dos casos de CI) foi a combinação dos fatores: a) O uso prévio de antibióticos ou cateter central, b) associado a pelo menos dois dos seguintes fatores de risco: qualquer cirurgia, uso de imunossuppressores, NPT, pancreatite, diálise e uso de esteroides (16).

Em 2009, os próprios autores do estudo mencionado, notaram que os fatores de risco ainda que apresentassem boa especificidade, tinham mais propriamente um



bom valor preditivo negativo e somente se aplicavam para uma pequena parte dos pacientes que chegavam à UTI. Assim, foi feito novo estudo com o objetivo de agregar novos fatores de forma a criar um sistema mais sensível. Foi realizada análise retrospectiva de 597 pacientes admitidos em UTI. O novo fator incluído foi a presença de ventilação mecânica nas últimas 48 horas, que incrementou em 10% a inclusão de pacientes, sendo capaz de capturar 50% dos casos de CI do estudo (17).

León e colaboradores publicaram um estudo multicêntrico, prospectivo, em 2006, no qual incluíram 1.699 pacientes admitidos em UTI divididos em três grupos: não colonizados e não infectado por *Candida spp.* (n = 719), apenas colonizados por *Candida spp.* (n = 883), e infectados por *Candida spp.* (n = 97). Após análise multivariada, os fatores de risco independentes associados a CI foram: cirurgia à admissão na UTI, NPT, sepse severa e colonização multifocal. Com os dados compilados propuseram um escore da cândida. Para cada fator foi dado um ponto exceto sepse que foi dado dois pontos. Um escore acima de 2,5 pontos tinha sensibilidade de 81% e especificidade de 74% em prever CI (18).

Atualmente são conhecidas mais de 150 espécies de cândida. Entretanto, cerca de 30 destas espécies foram identificadas como agentes infecciosos em humanos, capazes de causar CI: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida dubliniensis*, *Candida pelliculosa*, *Candida kefyr*, *Candida lipolytica*, *Candida famata*, *Candida inconspicua*, *Candida rugosa*, *Candida norvegensis*, *Candida sake*, *Candida apicola*, *Candida zeylanoides*, *Candida valida*, *Candida intermedia*, *Candida pulcherrima*, *Candida haemulonii*, *Candida stellatoidea*, *Candida utilis*, *Candida humicola*, *Candida lambica*, *Candida ciferrii*, *Candida colliculosa*, *Candida holmii*, *Candida marina* e *Candida sphaerica*. A frequência desses isolados varia bastante, no entanto, em cerca de 95% das infecções, os patógenos envolvidos são *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, e *C. krusei* (7) (19) (20).

O emprego de métodos de identificação molecular tem adicionado ainda a descoberta de novas espécies dentro de espécies chamadas complexos. Entre os exemplos, podemos citar: *C. dubliniensis* dentro do complexo *C. albicans*; *C.*

*fermentati* dentro do complexo *C. guilliermondii*, e *C. nivariensis* e *C. bracarensis* dentro do complexo *C. glabrata* (21).

Em todos os estudos de prevalência em candidemia, a *C. albicans* aparece ainda quase que invariavelmente como o agente mais frequente da candidemia. A despeito da *C. albicans* ser considerada o principal agente, há consenso do aumento da participação de infecções invasivas causadas por *Candidas não-albicans* (CNA). Neste cenário, os EUA, Canadá e países do norte da Europa costumam ter a *C. glabrata*, figurando entre as principais CNA (20) (22). Por outro lado, os dados da América Latina, incluindo o Brasil, e Ásia revelam predominância das espécies *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (10) (23) (24).

Dados gerados durante dois estudos brasileiros multicêntricos de vigilância de candidíase hematogênica, mostraram que a taxa de incidência no Brasil varia entre 1,66 e 2,49 por 1.000 admissões em hospitais terciários. Essas taxas são 2 a 10 vezes mais altas que aquelas documentadas nos EUA e Europa (10) (25) (26).

Os dados brasileiros são reprodutíveis na América Latina. Um recente estudo envolvendo 21 hospitais terciários, em sete países latino-americanos, e 672 episódios de candidemia identificou como as espécies mais incidentes: *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* sendo responsáveis, respectivamente, por 37,6%, 26,5% e 17,6% dos episódios (9).

### 1.3. OPÇÕES TERAPÊUTICAS PARA CANDIDEMIA

O tratamento clássico da candidemia faz-se com o antifúngico fluconazol, dito do grupo dos azólicos (27) (28). Essa droga ainda é indicada como droga de referência para o tratamento empírico das cândidas, principalmente em pacientes estáveis e em hospitais cuja taxa de susceptibilidade a esse fármaco é aceitável (2). No entanto, as espécies de cândidas precisam ser vistas de forma individualizada, pois apresentam padrões intrínsecos de susceptibilidade e resposta aos diferentes antifúngicos, em especial à classe dos azólicos (29) (30). Classicamente as espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, são susceptíveis ao fluconazol (29). *C. Kruzei*, por outra parte, é intrinsecamente resistente ao fluconazol (29). *C. glabrata*

responde mal ao fluconazol, pois tem um intrínseco baixo nível de resistência a esse fármaco e, pode, facilmente, adquirir alto nível de resistência com resistência cruzada a outros triazólicos de forma que não deve ter esta droga como opção terapêutica (2).

Há pouco mais de dez anos, uma nova classe de antifúngicos é empregada para o tratamento das cândidas: as equinocandinas (31). Esse grupo tem hoje três representantes disponíveis no mercado – caspofungina, anidulafungina, micafungina - e seu uso cresce no Brasil.

É bem conhecido que as equinocandinas são altamente ativas contra a grande maioria de espécies de cândida (32). As equinocandinas são indicadas para o tratamento de CI em pacientes instáveis e locais com alta prevalência de *C. Glabrata* e *C. Kruzei* (33). A resistência da *C. Glabrata* a essa classe de antifúngico emergiu juntamente com a resistência aos azólicos. A análise de 313 isolados, em um período de 10 anos, em um centro, revelou o aumento da resistência de 4,4% para 13,3% e a terapia previa parece ser um fator preditivo de resistência (34).

Os isolados de *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* tendem a exibir valores de concentrações inibitórias mínimas (CIM) mais altos que aqueles observados com cepas de *C. albicans* às equinocandinas e, alguns centros, tem reportado diminuição da prevalência de *C. albicans* em favor de *C. parapsilosis* como causa de CI em paciente preexpostos a equinocandinas (35). Apesar de existir muita controvérsia sobre a relevância clínica desses altos valores de CIM observados com cepas de *C. parapsilosis*, há estudo que mostra dados que não favorecem o uso de equinocandinas (36), enquanto outros estudos não encontraram diferenças em relação ao desfecho, após o uso de equinocandinas (32) (37).

A terceira classe de antimicóticos usada no tratamento das candidemias é a Anfotericina B (AmB) (38). Trata-se de um polieno, nas suas formulações de sal deoxicolato ou associada a lipídeos. As formulações lipídicas podem ser: carregadas por lipossomas (Ambissome®), associada a microdiscos de colesterol (Amphocil®) ou associada a lipídios complexos (Abelcet®). O uso da AmB no tratamento de candidemia costuma ser evitado pelo amplo espectro desta droga e alto custo das suas formulações lipídicas. O emprego das formulações lipídicas de anfotericina

deve-se à necessidade de diminuir sua toxicidade renal. Todas as formulações são equivalentes em termos de eficácia terapêutica. Elas têm boa atividade para a maioria das espécies de cândida. Poucas exceções existem, entre elas a *C. lusitaniae*, há muito reconhecida por desenvolver resistência durante o emprego de AmB (39). As *C. rugosa* e *C. guilhermondi* costumam apresentar altas CIM a AmB (19).

#### 1.4. TESTES DE SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* AOS ANTIFÚNGICOS

A CIM é parâmetro amplamente empregado em microbiologia e representa a mínima concentração sanguínea de determinado fármaco necessária para inibir o crescimento de determinado agente infeccioso. Hoje, existem duas principais sociedades que definem quais são esses valores, a partir de um banco de dados microbiológicos coletados e armazenados. Essas são o *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI, de origem americana e o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility* – EUCAST, de origem europeia. Essas duas agências vem a longo tempo definindo os CIM para bactérias e, mais recentemente, para os fungos. Os chamados “breakpoints” (BPs) ou “pontos de corte” são os valores que definem se o germe em questão é sensível ou resistente.

Existem métodos ditos padrão ouro para se definir a CIM e um dos mais empregados é o da microdiluição em caldo (MDC). Desde 1997, os testes de susceptibilidade usam a padronização desenvolvida pelo CLSI empregando a metodologia MDC. O comitê europeu - EUCAST emprega uma variação da técnica do CLSI para definir os BPs das espécies de cândidas ao fluconazol. Ambas as técnicas refletem resultados equivalentes (30).

Para um conhecimento aprofundado do assunto desenvolvido nesta tese será a seguir descrita a técnica padronizada pelo CLSI, segundo o último documento, M27-A3 (40), em relação ao antifúngico fluconazol (40).

As hemoculturas colhidas dos pacientes, em concordância com o pedido médico para fins de diagnóstico, são enviadas ao laboratório de microbiologia para identificação e, eventualmente, a determinação da susceptibilidade. Hoje em dia, há dois sistemas principais usados para esse fim, ou seja, o sistema MicroScan WalkAway, da empresa Beckman Coulter, o o sistema Vitek 2 da empresa (Biomérieux, França).

O sistema usado no presente trabalho foi o Vitek 2. Esse está associado ao BactAlert (Biomérieux, França), onde são depositados os frascos de hemoculturas para incubação. O aparelho alerta ao identificar que a amostra está positiva. É feita a aspiração de parte do conteúdo da garrafa e semeado no meio BD Sabouraud GC Agar / CHROMagar Candida Medium (BD). O Agar Sabouraud com glicose consiste num meio que, devido ao seu pH reduzido e à concentração glicose elevada, é parcialmente seletivo relativamente aos fungos. Através da inclusão de substratos cromogênicos no meio, as colônias de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, em especial, produzem cores diferentes, o que permite a detecção direta dessas espécies de levedura na placa de isolamento. As colônias de *C. albicans* aparecem a verde-claro a verde médio, as colônias *C. tropicalis* a azul esverdeado a azul metalizado e as colônias de *C. krusei* com um tom cor-de-rosa claro com um rebordo esbranquiçado. As colônias de *C. parapsilosis* aparecem com um tom rosa claro ou branca, enquanto que aquelas de *C. glabrata* aparecem em um tom entre rosa e roxo (41). Uma demonstração dessas colorações é apresentada na figura 1.

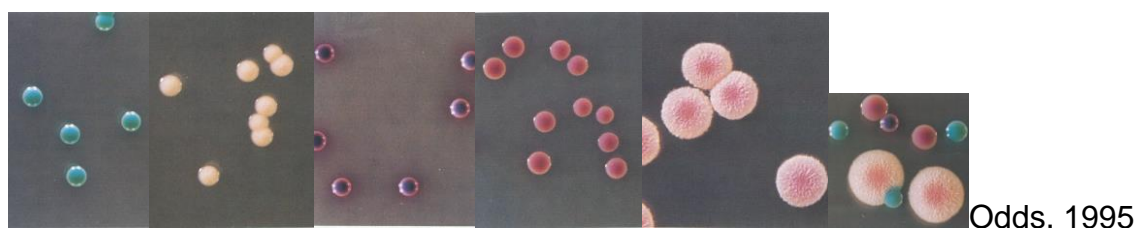


Figura 1: As características das colônias ao CHROMagar. Na sequencia o aspecto das colônias de *C. albicans*, *C parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C glabrata*, *C. krusei*. Na última foto aparecem várias colônias juntas.

As leveduras ao crescerem são colocadas nos cartões de identificação e antifungigrama do Vitek 2. Essa primeira etapa é, portanto, o método automatizado. O aparelho fornece sua própria identificação e antifungigrama.

Para uma identificação mais acurada, em especial em laboratórios de pesquisa, pode-se proceder outro método - padrão-ouro - de identificação e sensibilidade. Quarenta e oito horas antes da realização dos testes as leveduras são repicadas em Cromoagar (Difco, USA) para certificação da pureza das mesmas. Em seguida, é realizado repique em Agar Sabouraud Dextrose (ASD) [Oxoid, Inglaterra] para realização dos testes de suscetibilidade.

Para se obter a concentração desejada da solução mãe que é a solução estoque para o uso, o antifúngico é pesado e calculada a sua potência, expressa em  $\mu\text{g/mL}$ . Após a pesagem, os antifúngicos são dissolvidos em solventes apropriados. O fluconazol em particular é dissolvido em água destilada, obtendo-se uma concentração de  $5,120 \mu\text{g/mL}$ . A solução contendo o fluconazol é aliqüotadas em tubo tipo ependorff e armazenadas no freezer a  $-20^\circ\text{C}$ , até a preparação das placas de microdiluição (42)

A partir da solução estoque (solução mãe) contendo fluconazol, são realizadas diluições com o meio RPMI 1640 em dez tubos de ensaios (primeiras diluições). Na segunda série de diluições, transfere-se  $0,1\text{mL}$  da primeira diluição para outros dez tubos de ensaios, contendo  $9,0\text{mL}$  de meio RPMI, tendo uma concentração de  $128\mu\text{g/mL}$  a  $0,25\mu\text{g/mL}$

O fluconazol é distribuído em microplacas, pipetando-se  $100\mu\text{L}$  das diluições, começando da menor concentração para a maior, dispensando os mesmos nos orifícios de numeração de onze a dois no sentido vertical, deixando vazio o orifício de numeração doze para o controle de crescimento e o orifício de numeração um para controle de esterilidade. A figura 3 ilustra a distribuição dos antifúngicos nas microplacas.

Após esse procedimento, as microplacas são cobertas com parafilm® e armazenadas no freezer a  $-20^\circ\text{C}$  por até seis meses.

A partir do crescimento em cultura de colônia pura em Ágar sabouraud dextrose, incubado a 35°C, por 24 horas, com auxílio de alça descartável estéril seleciona-se de uma a cinco colônias e transfere-se para um tubo contendo solução fisiológica estéril. A suspensão é homogeneizada no vórtex e ajustada a turbidez com o tubo 0,5 na escala de McFarland que corresponde a  $1 \times 10^6$  –  $5 \times 10^6$  Unidade Formadora de colônia - UFC/mL.

A seguir prover 4,9 mL do meio RPMI no tubo de ensaio, acrescenta-se 100µL do inóculo (diluição 1:50) com posterior agitação no vórtex. Transfere-se 500µL do mesmo para outro tubo de ensaio contendo 9,5 mL de meio RPMI (diluição 1:20) homogeniza-se novamente no vórtex. A concentração final da suspensão será de  $5,0 \times 10^2$  a  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL. Como controle de qualidade e reprodutibilidade dos testes, são incluídas cepas *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019, distribuídas nas duas últimas linhas.

A suspensão das leveduras testadas é distribuída nas linhas horizontais da microplaca. No orifício de número um é adicionado somente meio RPMI para ser considerado como controle de esterilidade. No orifício doze é adicionado o meio RPMI com a suspensão das leveduras para ser considerado controle de crescimento. Em seguida as microplacas são incubadas por 48 horas a 35°C.

A leitura CIM é realizada após 24h de incubação para fluconazol/voriconazol de acordo com CLSI - M27 S4 (2012). A presença ou ausência de crescimento das leveduras em cada orifício da placa é avaliada por meio de leitura visual, a partir do orifício de maior número para o de menor número.

A interpretação dos resultados é baseada na leitura visual. A CIM é aquela menor concentração do antifúngico capaz de inibir parcialmente (50%) o crescimento da levedura.

## 1.5.OS PONTOS DE CORTES DE SUSCEPTIBILIDADE DAS CÂNDIDAS AO FLUCONAZOL

No que diz respeito a *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, apesar de reportarem valores de CIM semelhantes até o último documento publicado pelo CLSI, em dezembro de 2012, havia discrepâncias nas definições dos pontos de corte BPs. Hoje, o CLSI passou a adotar os mesmos BPs do EUCAST, no entanto na época do estudo, o aparelho VITEK 2 usava o antigo padrão adotado pelo CLSI. A seguir fazemos a descrição, uma vez que será relevante para o entendimento do presente trabalho.

O EUCAST chama sensível CIM menores ou iguais a 2µg/mL e resistente valores maiores ou iguais a 4 µg/mL. O CLSI a por sua vez, chamava sensível CIM menor ou igual a 8 µg/mL, suscetível dose dependente CIM= 8-32 µg/mL e resistente CIM maior ou igual a 64 µg/mL. A explicação para essa diferença estava no ponto de vista de cada agencia descrito a seguir (43).

Para EUCAST interessava identificar a sensibilidade das cepas em relação à sua situação selvagem. Por CIM da população selvagem entende-se os isolados que não possuem nenhum mecanismo mutacional ou adquirido de resistência. Assim EUCAST optou por empregar o chamado “cutoff epidemiológico”, o qual a definição dos BPs representa a CIM do percentil 95 de uma curva normal populacional da distribuição de uma população de isolados selvagens.

O CLSI estava até então focado na eficácia terapêutica. O fluconazol tem como principal parâmetro farmacocinético e farmacodinâmico a relação área sob a curva (ASC) dividido pela CIM. Quando essa relação supera o valor de 25-50, pode-se prever eficácia terapêutica. Por ASC entende-se a quantidade total de droga que atinge a corrente sanguínea em determinado período de tempo. Para adultos sadios normais, a ASC do fluconazol é quase igual à dose administrada. Como a dose recomendada para tratamento de candidemia é 400mg ao dia, para CIM de 8 µg/mL, o parâmetro de sensibilidade do CLSI adotado até então, teremos uma relação ASC/CIM de 50(43).



Portanto, pode entende-se que os BPs adotados então pelo CLSI primavam mais por proporcionar uma razoável predição de sucesso ou falha terapêutica. Por outra parte, os BPs adotados pelo EUCAST eram e são mais acurados na detecção da emergência de resistência ao fluconazol entre as espécies de cândida, em especial aquelas que são tradicionalmente bastante sensíveis, ou seja, *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, uma vez que CIM  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$  são incomuns e, provavelmente, contém mecanismos incorporados de resistência aos azóis (43).

A partir de 2012, o CLSI passou a adotar os mesmos BPs de cândidas empregados pela agência europeia EUCAST (43) (44).

## 1.6. MECANISMOS DE AÇÃO E RESISTÊNCIA AO FLUCONAZOL

Bons agentes terapêuticos são aqueles que atuam causando mínimos efeitos colaterais. Para tanto os alvos elegíveis para essas drogas serão exclusivos das células fúngicas, ou seja, ausentes nas células humanas. Neste sentido, a célula fúngica possui dois alvos importantes: o ergosterol, análogo ao colesterol componente da membrana celular humana, lipídeo componente da membrana fúngica. Outro alvo é a parede fúngica, estrutura ausente nas células humanas.

A anfotericina e suas formulações lipossomais ligam-se diretamente ao ergosterol da membrana celular. Os azóis agem inibindo o crescimento fúngico ao promoverem a depleção do ergosterol da membrana. Sua ação consiste em inibir a enzima lanosterol 14 $\alpha$ -esterol-dimetilase, responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol. As equinocandinas atuam na parede da célula fúngica impedindo a formação da estrutura o beta 1,3 D-glucano, através da inibição da enzima o beta 1,3 D-glucano sintetase.

Vários mecanismos estão associados na resistência das espécies de cândida aos diferentes antifúngicos. Iremos nos deter nos mecanismos relacionados à resistência aos Azóis, objeto do presente estudo (45):

(1) O primeiro mecanismo é ativação de bombas de efluxo codificadas pelos genes MDR e CDR. Há vários subtipos de bombas de efluxo e são distribuídas de forma diferente entre as espécies de cândida: *C. albicans* - MDR1, CDR1, CDR2, *C. glabrata* - CgCDR1, CgCDR2, *C. dublinensis* - CdMDR1, CdDR1. A indução do gene CDR tende a afetar todos os azólicos, enquanto que o gene MDR apenas ao fluconazol.

(2) A mutação do gene ERG11, que codifica a enzima alvo 14 $\alpha$ -esterol-dimetilase, reduzindo a afinidade pelos azóis. Esse mecanismo está associado à resistência intrínseca da *C. krusei* ao fluconazol.

(3) A hiperexpressão da enzima alvo 14 $\alpha$ -esterol-dimetilase alterada.

(4) A mutação do gene ERG3, o qual gera um substituto ao ergosterol.

Há um efeito aditivo das mutações descrita, ou seja, as CIM para fluconazol são maiores na medida em que se acrescentam mutações da bomba de efluxo e da afinidade à enzima alvo (46).

#### 1.7.A SUSCEPTIBILIDADE DA *C. ALBICANS*, *C. PARAPSILOSIS* E *C. TROPICALIS* AO FLUCONAZOL

Devido à preocupação de que cepas resistentes ou com susceptibilidade reduzida a antifúngicos possam se tornar mais prevalentes, é importante avaliar, periodicamente, o perfil de susceptibilidade de agentes infecciosos aos antimicrobianos, buscando caracterizar possíveis tendências temporais ou geográficas na frequência deste fenômeno em relação a diferentes patógenos. A avaliação periódica permite monitorar causas de falência terapêutica a antimicóticos.

As taxas de resistência em candidemias ao fluconazol ainda se mantém baixas reportando-se 1,0 a 2,1% em *C. albicans*, 0,4 a 4,2% em *C. parapsilosis* e 1,4 a 6,6% em *C. tropicalis* (47) (48) (49). Por outro lado, há relatos de um lento e progressivo aumento da resistência, principalmente em especial para *Candida*

*parapsilosis*. Cleveland reportou os dados de Atlanta e Baltimor coletados nos períodos de 1992-93 e 2008-11. Notou aumento na resistência da *C. parapsilosis* de 2% para 6% e 0 para 4% respectivamente (50). O uso prévio de fluconazol foi implicado como causador do surgimento de resistência a esse fármaco, mas estudos recentes não conseguiram confirmar (51).

No que diz respeito ao nosso meio, há poucos estudos epidemiológicos de resistência. Até o momento, as espécies mais prevalentes de cândida permanecem altamente sensíveis ao fluconazol. Em recente pesquisa multicêntrica na América Latina, que envolveu cândida hematogênica resistência encontradas (CIM $\geq$ 4mg/L) foram 1(0,4%) de 253 amostras de *C. albicans*, 2 (1,1%) de 178 amostras de *C. parapsilosis*, e nenhuma em 118 amostras de *C. tropicalis* (52).

#### 1.8.A CANDIDA PARAPSILOSIS

A partir do final dos anos 90 a incidência de isolados de *Candida parapsilosis*, tem dramaticamente aumentado. Esta já vem frequentemente sendo identificada como a segunda mais comum espécie de cândida de isolada na hemocultura na Ásia e América do Sul (23) (24).

Desde 2005, a *Candida parapsilosis* foi reclassificada em três distintas espécies: *Candida parapsilosis* propriamente dita, *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis*, sendo que a *Candida parapsilosis* responde pela maioria das doenças clínicas. Os sistemas comerciais de microbiologia não estão, no entanto, ainda capacitados para distinguir estas espécies, ou seja, na prática até o momento estas espécies continuam sendo classificadas como *Candida parapsilosis* (53).

O fluconazol é aceito como droga de eleição para o tratamento de infecções por *Candida parapsilosis* por várias sociedades, entre elas as sociedades europeia (54), americana (33) e a de infectologia brasileira (55), que sugerem essa droga como de escolha mesmo para pacientes instáveis. Também, como foi dito, os estudos da nossa região indicam que permanece bastante sensível ao fluconazol.

## 1.9. O HOSPITAL SANTA LUZIA

O Hospital Santa Luzia é uma instituição privada, em Brasília, com cerca de 200 leitos e, desses, quarenta são leitos dedicados à terapia intensiva em adultos. O hospital possui serviço de microbiologia próprio e, no final do ano de 2006, após a aquisição do aparelho VITEK 2 – BioMérieux, começou a identificação das espécies de cândidas isoladas na corrente sanguínea, deixando de reportar como *Candida sp.* A partir do ano 2007, houve um significativo aumento na incidência de candidemia quando comparadas com o ano anterior. Esse aumento se mantém até o final da coleta dos dados, variando de 2,3 a 4,2. A espécie mais prevalente é de *C. parapsilosis*, segundo a tabela 1 abaixo:

Tabela 1 Distribuição das candidemias no Hospital Santa Luzia por ano e o coeficiente de incidência por 1.000 internações/ano

	2006	2007	2008	2009	2010	2011*
<i>Candida parapsilosis</i>	2	14	19	25	18	8
<i>Candida albicans</i>	3	3	5	3	8	7
<i>Candida tropicalis</i>		14	8	8	5	3
<i>Candida spp.</i>	8	2				
<i>Candida famata</i>			1	1		
<i>Candida guilhermondii</i>		1			1	1
<i>Candida glabrata</i>						1
Coeficiente anual de incidência	1,12	3,59	2,28	3,16	2,23	4,18

\* Dados coletados pelo Serviço de Controle de Infecção até junho de 2011

Adicionalmente, foi constatado que os isolados de *C. parapsilosis* não estavam respondendo ao fluconazol, ou seja, além de estar contaminando o ambiente hospitalar, necessitava-se de recorrer a outros agentes antifúngicos. A nossa experiência mostrou que o emprego das equinocandinas também não conseguia eliminar o agente da corrente sanguínea e, na maioria das vezes, optamos pelo emprego de anfotericina lipossomal, o que tornou muito dispendioso o tratamento desses pacientes.

O processo de confirmação da resistência dos isolados de *C. parapsilosis* ao fluconazol foi um processo gradativo. Em meados do ano 2010, passamos a realizar o antifungigrama incorporado ao aparelho Vitek 2. Fizemos, ainda, a testagem de algumas dessas cepas por fitas de Etest que confirmaram a resistência. Por fim, no final de 2010, enviamos duas cepas para o Laboratório Especial de Micologia – LEMI, da UNIFESP, que pelo método da MDC propostos pelo CLSI foi mais uma vez confirmada a resistência. Até o final da coleta de dados, tínhamos cerca de 75% das cepas de *C. parapsilosis* resistentes ao fluconazol.

## 2. OBJETIVOS

- Verificar as informações de resistência obtidas pelo método automatizado das amostras de *Candida parapsilosis* obtidas a partir de hemoculturas.
- Caracterizar por técnica de biologia molecular as espécies identificadas como *Candida parapsilosis*.
- Identificar os mecanismos de resistência envolvidos nas cepas de *Candida parapsilosis*.
- Avaliar os riscos associados para aquisição de *Candida parapsilosis* resistente ao fluconazol - CPRF.
- Elencar algumas variáveis de desfecho da infecção por *Candida parapsilosis*.

### 3. PACIENTES E MÉTODOS

Estudo retrospectivo observacional do tipo série de casos associado a um estudo caso controle onde foram coletados dados clínicos e microbiológicos de todos os episódios de candidemia, diagnosticados entre julho de 2011 a fevereiro de 2012, no Hospital Santa Luzia. Trata-se de um hospital com 200 leitos, sendo um dos maiores hospitais terciários e privados, localizado em região central da cidade de Brasília. O hospital possui três UTIs destinadas a pacientes adultos, totalizando 40 leitos; realiza atendimento a pacientes oncológicos e cirurgias de alta complexidade, mas não tem programa de transplantes.

As cândidas foram isoladas do sangue, identificadas e testadas usando o sistema automatizado BacT-ALERT/VITEK 2 (BioMérieux). Os BPs interpretativos do aparelho são os recomendados pelo CLSI, ou seja, CIM  $\leq$  8mg/L - sensível, CIM entre 16-32 mg/L - sensível dose dependente e CIM  $\geq$  64 mg/L - resistente. Para o estudo, consideramos resistentes todas as cândidas com CIM  $\geq$  16mg/L. Há de se notar que o aparelho VITEK 2 tem margem de identificação da CIM ou seja CIM  $\leq$  1mg/L a CIM  $\geq$  64mg/L.

Foi feito levantamento de todos os pacientes adultos, maiores de 18 anos, que estiveram internados no hospital e apresentaram ao menos um episódio de candidemia no período mencionado. As candidemias ocorridas em um mesmo paciente durante o período de 30 dias, foram contadas como um único episódio. Os dados foram coletados nos prontuários. Os seguintes fatores de risco foram elencados: idade, sexo, local do hospital em que o paciente se encontrava, data da internação, unidade hospitalar, motivo da internação (câncer, doença hematológica, HIV, doença pulmonar, doença cardíaca, doença autoimune, doença neurológica, cirurgia), diabetes melito, insuficiência renal, admissão previa em uma unidade hospitalar ou em outro hospital, data da candidemia, ventilação mecânica prévia (incluindo o número de dias em ventilação mecânica), hemodiálise, APACHE, presença de neutropenia, hipotensão, uso de drogas vasoativas, febre, presença de cateter central, positividade da cultura semiquantitativa da ponta de cateter (definida pelo crescimento mais de 15

unidades formadoras de colônias) quimioterapia, uso prévio de corticosteroides, antibióticos e fluconazol.

Como variáveis de desfecho foram eleitas: o número de outras amostras positivas para a mesma cândida no período de 30 dias, o antifúngico usado para o tratamento, comprometimento de outros órgãos, necessidade de dialise, óbito em qualquer data após a candidemia e óbito nos 30 dias após o diagnóstico da candidemia.

A partir de julho de 2011, o serviço de microbiologia do hospital foi orientado a guardar todas as cepas de *Candida parapsilosis* isoladas na corrente sanguínea para serem enviadas ao Laboratório Especial de Micologia – LEMI, UNIFESP-Brasil, para a análise microbiológica de resistência, caracterização da espécie e mecanismos de resistência por análise molecular. O método empregado para identificação do MIC foi a microdiluição em caldo conforme o protocolo do CLSI.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Santa Luzia sob o registro CEP 73/2011.

#### Procedimentos laboratoriais *in vitro*

Nove cepas de *C. parapsilosis* foram submetidas ao estudo. O DNA foi extraído a partir dos isolados usando ruptura mecânica com esferas de vidro e de fenol / clorofórmio. PCR em tempo real foi realizada utilizando sondas TaqMan® específicas das espécies.

O teste de suscetibilidade aos antifúngicos foi realizado utilizando o ensaio de microdiluição do CLSI. Fluconazol e anidulafungina foram fornecidos pela Pfizer Pharmaceutical Group e anfotericina B foi fornecida pela Sigma Chemical Corporation (St. Louis, MO, EUA). O documento CLSI-M27-S4 foi usado como o padrão-ouro para classificar as *C. parapsilosis* (*sensu lato*) como suscetíveis, suscetíveis de dose-dependente (SDD) / intermediário, ou resistentes aos azóis e equinocandinas.



Foi feito sequenciamento completo (ABI3100 automatizado - Applied Biosystems) do open reading frame (ORF), do gene ERG 11 que codifica a lanosterol 14  $\alpha$  – desmetilase.

RT-PCR quantitativo foi realizado para avaliar a expressão de genes CDR1, MDR1 e ERG11 por cepas de *C. parapsilosis* (sensu stricto) na presença ou ausência de fluconazol.

#### Procedimentos laboratoriais *in vivo*

Para confirmar o fenótipo de resistência *in vitro* observado ao fluconazol, avaliou-se *in vivo* a resposta ao tratamento com fluconazol por cepas de *C. parapsilosis* resistentes e sensíveis ao fluconazol, no modelo de infecção da *Galleria mellonella*.

Grupos de 16 larvas foram inoculadas com a seringa de Hamilton com 10<sup>6</sup> UFC de *C. parapsilosis*. Empregou-se cepas do estudo e cepas ATCC lavadas e centrifugadas com solução salina.

Após injeção, as larvas foram incubadas a 37°C e o número de larvas mortas foi monitorizado diariamente. Dois grupos de controle foram incluídos: um grupo foi inoculado com solução salina para observar a morte devido a trauma físico, e o outro não recebeu injeção como um controle para a viabilidade geral.

Larvas infectadas foram tratados com o fluconazol (14 mg / kg) (Sigma Chemical Corporation, St. Louis, MO, EUA). O antifúngico foi fornecido imediatamente após a infecção em um volume padrão. Grupo de 10 larvas foram tratados com o fluconazol sozinho para testar a toxicidade. Sobrevivência foi monitorada a cada 24 h.

A Carga fúngica foi determinada por contagem de unidades formadoras de colônicas - UFC após 16 h da inoculação. Para tanto, cinco larvas de cada grupo foram pesadas e homogeneizadas em 1 ml de solução salina estéril e os homogenatos foram semeadas em placas de YPD-agar contendo canamicina (45 ug / mL), estreptomicina (100 ug / mL) e ampicilina (100 ug / mL). As placas foram incubadas a 30 ° C durante 72 h antes das colônias serem contadas.

#### 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise das variáveis qualitativas dicotômicas foi empregado o teste do qui ao quadrado ou o teste exato de Fisher. Para as variáveis contínuas com distribuição normal, utilizou-se o teste t *Student*, e para a distribuição não paramétrica empregamos o teste de Mann-Whitney. A análise estatística univariada foi feita usando o programa SPSS (versão 18.0, Chicago IL). Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

Após análise bruta inicial univariada, as variáveis com associação significativa com a *Candida parapsilosis* resistente ao fluconazol foram incluídas com as covariáveis idade e sexo e na sequência ajustadas. Empregou-se um modelo multivariado e razões de prevalência com intervalo de 95 % foram calculadas para se caracterizar a intensidade da associação entre cada variável independente e a presença de *Candida parapsilosis* resistente. A análise multivariada foi conduzida empregando-se uma regressão de Poisson com variância robusta (log-linear). Usou-se a regressão de Poisson porque ela fornece melhor estimativa das razões de prevalência, que por sua vez representam de forma mais significativas as medidas de efeito para estudos transversais (56). O nível de significância foi fixado em  $p < 0,05$ .

Foram calculadas as taxas de incidência que representam o número de candidemias por 1.000 admissões e por 1.000 pacientes-dias.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. ARTIGO SOB ANÁLISE DO BMC INFECTIOUS DISEASES

#### **Outbreak of candidemia caused by fluconazole resistant *Candida parapsilosis* strains in an intensive care unit**

Henrique Marconi Sampaio Pinhati<sup>1</sup>, Luiz Augusto Casulari<sup>2</sup>, Ana Carolina Remondi Souza<sup>3</sup>, Ricardo Andreotti Siqueira<sup>3</sup>, Camila Gomes Damasceno<sup>4</sup>, Arnaldo Lopes Colombo<sup>5</sup>

Corresponding author: Henrique Marconi Sampaio Pinhati, e-mail: [hpmarconi@gmail.com](mailto:hpmarconi@gmail.com), Escola Superior de Ciências da Saúde - SMHN quadra 03, conjunto A bloco 1 - Edifício Fepecs - Asa Norte, Brasília - DF, Brazil. Zip code: 70710-907.

## **Abstract**

**Background:** Candidemia is an increasing problem in tertiary care hospitals worldwide. Here, we report the first outbreak of candidemia caused by fluconazole-resistant *C. parapsilosis* (FRCP) strains in Latin America.

**Methods:** This was a cross-sectional study of clinical and microbiological data of all candidemic episodes diagnosed from July, 2011 to February, 2012 in a 200-bed tertiary care hospital. Initial yeast identification and susceptibility testing were performed using the VITEK 2 - System. Isolates of *Candida spp.* that were fluconazole resistant were sent to a reference laboratory (LEMI-UNIFESP) for identification by molecular typing and confirmation of conducted to identify factors associated with FRCP infection.

**Results:** We identified a total of 42 patients with candidemia (15 women) with a median age of 72 years. The incidence of candidemia was 4.05 per 1,000 admissions, including 30 cases (71.4%) of infection with *C. parapsilosis*, 23 of which (54.8%) were resistant to fluconazole. Ninety-five percent of patients were admitted to intensive care units (ICU) at the time of diagnosis of FRCP candidemia. In only 22% of FRCP candidemia cases had fluconazole been used previously. The results of our study indicated that diabetes is a risk factor for CPRF candidemia ( $p = 0.002$ ). Overall mortality from candidemia was 45.2%, and mortality from episodes of FRCP infections was 43.5%.

**Conclusions:** The clustering of incident cases in the ICU and the limited prior exposure of infected patients to fluconazole suggest horizontal transmission of FRCP. Accurate vigilant monitoring for new nosocomial strains of FRCP is required, especially in ICU wards.

**Keywords:** Candida; Candidemia; Fluconazole Resistance; Antifungal Treatment.

## **Background**

Hematogenous candidiasis is an alarming problem in tertiary care hospitals worldwide, especially in patients admitted in intensive care units (ICU) [1, 2]. Incidence rates of candidemia vary considerably among geographic areas and medical centers. For example, in Europe and the USA, different studies have reported incidence rates of 0.2-1.87 and 0 - 2.4 per 1,000 admissions, respectively [3, 4]. In Brazil and Latin America, nosocomial candidemia is an important problem in adults and children, and the reported incidence rates are 0.33-6 per 1,000 admissions [5-7]. The large variation in the incidence rates of candidemia is probably due to a combination of several factors, including differences in resources available for medical care and training programs, difficulties in the implementation of infection control programs in hospitals in developing countries, limited number of health care workers to assist patients in critical care units, and less-aggressive practices of empirical antifungal therapy and prophylaxis for high-risk patients [6]. Hospital-acquired candidemia is associated with a large increase in hospitalization duration, attributable mortality (up to 49%) and costs [8, 9].

Although *Candida albicans* is still considered the main causative species of candidemia worldwide, there is a concern over the rise in invasive infections caused by non-*albicans* species. In this regard, *Candida glabrata* has frequently been reported in Northern Europe and US medical centers [1, 10], whereas *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* are the most common non-*albicans* species associated with fungemia in Latin America and Asia [11, 12]. Of note, a recent multicenter study in the USA found that *C. parapsilosis* was the second most commonly encountered non-*Candida albicans* species [13].

Fluconazole is accepted as an alternative treatment for patients with candidemia due to its efficacy and safety demonstrated by several clinical trials [14, 15]. For candidemia caused by *Candida parapsilosis* complex, in particular, fluconazole has been suggested as the best alternative for primary therapy [16]. There are some controversies in the literature regarding the effectiveness of echinocandins against infections of *C. parapsilosis*, as high MICs are usually observed when this species is tested against drugs of this class [17].

The present study describes the first outbreak of candidemia caused by fluconazole-resistant *Candida parapsilosis* strains (FRCP) in a tertiary care center in Latin America.

## Methods

From 2006 to 2011, we observed a progressive increase in the incidence rate of candidemia, especially in ICU patients, in the Hospital Santa Luzia, a 200-bed tertiary care center located in Brasília (Brazil). Global rates of candidemia increased from less than 1 episode per 1000 admissions to 4/1000 admissions during the study period. We conducted a cross sectional study of clinical and laboratory data of all adult patients (age  $\geq$  18 years) diagnosed with candidemia between July, 2011 and February, 2012 (nine months period) to investigate a possible candidemia outbreak.

The local ethical committee approved the protocol (CEP: 73/2011).

### Laboratory Procedures

Yeast identification and antifungal susceptibility testing was initially performed by the local microbiology laboratory using the VITEK 2 – system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). All *C. parapsilosis* isolates stored at the routine laboratory were sent to a reference laboratory (LEMI - Laboratório Especial de Micologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil) for further molecular identification and confirmation of antifungal susceptibility testing by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) reference method.

- (i) **Molecular identification of *C. parapsilosis* (*sensu lato*) isolates by real time TaqMan® PCR assays.** DNA was extracted from the isolates using mechanical disruption with glass beads and phenol/chloroform [18]. Real-time PCR was performed using species-specific TaqMan® probes, as previously described by our group [19].
- (ii) ***In vitro* susceptibility testing.** Antifungal susceptibility testing was performed at the reference laboratory using the CLSI microdilution assay [20]. Fluconazole and anidulafungin were provided by Pfizer Pharmaceutical Group (New York, NY, USA) and amphotericin B was provided by Sigma Chemical Corporation (St. Louis, MO, USA). The CLSI-M27-S4 document was used as the gold standard interpretative guidelines for classifying the *C. parapsilosis* (*sensu lato*) isolates as susceptible, susceptible dose dependent(SDD) / intermediate, or resistant to azoles and echinocandins [21].

### Statistical analysis

We performed univariate and multivariate analyses of factors that may be associated with FRCP. For the univariate analysis, categorical variables were compared using the chi-square or Fisher exact tests, and continuous variables were compared using the Student t test or Mann–Whitney U test, as appropriate. All statistical tests were two-tailed, and the significance level was set at  $p < 0.05$ .

After the initial univariate analysis, the variables with significant FRCP association were included in a multivariable analysis with adjustments for the covariates of age and sex. A Poisson regression with robust variance (linear-log) was employed for the multivariate analysis. The level of significance was set at  $p < 0.05$  [22].



## Results

During the study period, a total of 42 episodes of candidemia were reported. The median age of the patients was 72 years (range: 24-92 years), and 35.7% of the patients were female. The overall incidence of candidemia during the 9 month study period was 4.05 per 1000 admissions. Positive blood cultures for *Candida* were predominantly obtained from patients hospitalized in ICUs (95.2%).

The VITEK 2 system identified 30 blood stream *Candida* isolates as *C. parapsilosis* (71.4%), 9 as *C. albicans* (21.4%), 2 as *C. glabrata* (4.8%) and 1 as *C. tropicalis* (2.4%). Using the VITEK 2 system, fluconazole resistance or SDD was detected in 23 out 30 *C. parapsilosis* (76.6%) isolates tested. All 9 *C. albicans*, 2 *C. glabrata* and 1 *C. tropicalis* strains were considered susceptible to fluconazole by the automated system.

Fourteen *C. parapsilosis* isolates stored in the routine laboratory were sent to LEMI for further molecular identification and confirmation of antifungal susceptibility test results by the CLSI broth microdilution reference method. Except for one clinical isolate identified as *C. metapsilosis*, all other strains were genetically identified as *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) when tested using species specific TaqMan® probes. Despite some differences among MICs obtained using the two methods, the categorical agreement between methods was very good (72%). Of the 11 *C. parapsilosis* strains categorized as SDD or resistant to fluconazole by the Vitek system, all but two were considered resistant or SDD when tested by the CLSI method. Two additional strains originally identified as susceptible by the Vitek 2 system were found to be resistant by the BMD. No strains of *C. albicans*, *C. tropicalis* or *C. glabrata* were available for testing by the CLSI methodology. No strains of *C. parapsilosis* were resistant to anidulafungin or amphotericin B.

Considering that only 14 of the 42 isolated strains were tested by the CLSI method, we used the information provided by the Vitek system to check for risk factors associated with infection by fluconazole-SDD or -resistant *Candida*.

The epidemiological and clinical characteristics of the patients infected by FRCP strains and those infected by fluconazole-susceptible *Candida* (FSC) species are presented in Table 1. In general, most demographic and clinical data were similar

between the two patient groups. The exposition to central venous catheter, hemodialysis, surgery, mechanical ventilation, antibiotics and corticosteroids, were similar in both groups. It is important to mention that only 5 of the 23 patients (22%) infected by FRCP had been previously exposed to fluconazole before developing candidemia compared to 3 of the 19 patients (16%) infected by FSC strains ( $p=0.87$ ). After univariate analysis, only 2 variables were identified as independent factors associated with infection by FRCP: diabetes mellitus ( $p = 0.002$ ) and parenteral nutrition ( $p = 0.054$ ). After multivariate analysis, only diabetes remained an independent factor associated with infection by FRCP ( $p = 0.001$  OR 1.3 - 3.5).

The overall candidemia mortality rates at 30 days after diagnosis were 45.2% (19/42) for all patients (27/42), 47.4% (9/19) for the group infected by FSC and 43.5% (10/23) for the group infected by FRCP ( $p = 0.8$ ). Of note, liposomal amphotericin B was the major therapeutic option employed for the treatment of patients infected by FRCP (12/23).

## Discussion

This study is the first to describe an outbreak of candidemia caused by fluconazole-resistant *C parapsilosis* strains in ICU patients of a tertiary care hospital in Brazil. It is important to note that the *Candida parapsilosis* strains were identified by molecular methods and the phenotype of resistance to fluconazole was examined by 2 different methods, including the CLSI microbroth dilution assay.

The outbreak of *C parapsilosis* was confirmed by a sharp increase in the incidence rate of candidemia reported in the intensive care unit of this study simultaneously with the increase in the prevalence of *C parapsilosis* strains among *Candida* blood stream isolates from 31% in 2007 to 66% in 2011. Although no typing method was performed, it is indisputable that the rate of candidemia during our study period was far higher than the baseline rate previously documented at the studied hospital, and most episodes of candidemia were caused by *C parapsilosis* strains exhibiting a phenotype of resistance which is completely atypical for this particular species of *Candida* [23].

During the study period, hospital physicians worked under the reasonable assumption that most episodes of *C parapsilosis* candidemia were completely refractory to treatment with fluconazole (personal communication). As a consequence, the hospital staff decided to use liposomal amphotericin B (L-AmB) as the antifungal drug of choice to treat all episodes of *C parapsilosis* candidemia. This decision was based on the putative limitations of candins against *C parapsilosis* infections and the good activity of L-AmB against biofilm-producing strains of *Candida* species [14, 24].

Despite treatment with L-AmB, the crude mortality rate of candidemia due to *C parapsilosis* was 43.5%, and there was no difference in the crude mortality rates candidemia cases caused by other species of *Candida*, suggesting that the phenomenon of resistance to fluconazole came at no cost to the virulence of the isolates studied here. Indeed, this finding contradicts the current consensus that the mortality rate due to infection with *C parapsilosis* is usually lower than those due to infection with *C albicans* or *C tropicalis* [13]. The high mortality rates observed with our casuistic study of FRCP candidemia is probably secondary to the high

percentage of elderly patients (70% > 60 years) as well as the high Apache II score related to those patients (see table 1).

Although worldwide a rise in the incidence of invasive infections due to FRCP isolates is uncommon, it has been reported recently. In accordance with recent studies, using antifungal susceptibility tests that are considered gold standards (CLSI and EUCAST microbroth assays), the rates of fluconazole resistance in blood stream *C parapsilosis* isolates ranges from 3.4 to 7.5% in the USA [17, 25, 26], 0 to 6.3% in Europe and up to 5.4 in Asia [17, 27, 28].

In Latin America, *C parapsilosis* blood stream isolates have rarely been reported to be resistant to fluconazole. A recent study evaluating a total of 672 episodes of candidemia in 21 medical centers from 7 countries in Latin America found that the fluconazole MIC value for 90% of 178 strains of *C parapsilosis* was 1.0 mg/mL, and only 2 strains exhibited susceptibility-dose dependence against this drug [5]. In Brazil, the largest multicenter study ever published on the epidemiology of candidemia evaluated a total of 712 episodes of candidemia and found that all 146 *C parapsilosis* strains tested were susceptible to azoles [7]. Based on those studies we can state with certainty that the present series of FRCP candidemia represents the largest experience with this emergent pathogen in our region.

*C. parapsilosis (sensu stricto)* has been described as the most prevalent *C. parapsilosis* complex species in both superficial and invasive human infections, and *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* are responsible for less than 10% of the *C. parapsilosis* group infections in reported in different series [29-35]. Accordingly, 13 out of 14 of our *C. parapsilosis* isolates available for molecular identification were identified as *C. parapsilosis (sensu stricto)*.

It is well established that *C parapsilosis* is a commensal of human skin that can be transmitted horizontally via contaminated external sources and hands of health care workers [23]. We tried to identify risk factors associated with episodes of candidemia caused by FRCP, but our findings were limited by the small population size and casuistic nature of this study as well as the absence of environmental sampling data and the absence of a survey of *Candida* colonization among patients and health care workers. By multivariate analysis, diabetes was the only medical

condition found to be independently associated with FRCP. In the present study, central catheters were not associated with FRCP; furthermore, they were almost universally present in the patients who developed candidemia, regardless of whether the causative *Candida* strain was susceptible to fluconazole (92.9%, 39 of 42 episodes). However, considering that most patients with FRCP fungemia were not previously exposed to fluconazole, we still propose that the present outbreak was probably a series of catheter-related fungemias that occurred when a resistant strain of *C. parapsilosis* was exogenously acquired by the patients during their hospitalization (15 to 40 days before developing candidemia) through contact with health care workers that were putatively colonized by this emergent pathogen.

The identification of diabetes as a risk factor of infection by FRCP in our series may be explained by two aspects: 1-this medical condition may increase the number of opportunities and the intensity of physical contact between health care workers and patients to appropriately monitor this metabolic disease both clinically and through laboratory tests; 2- diabetic patients are more prone to colonization by *S. aureus* and eventually *Candida*, facilitating a putative episode of colonization by a hospital acquired fluconazole-resistant *Candida* strain.

In conclusion, this paper is the first report of an outbreak of candidemia possibly related to nosocomial horizontal transmission of fluconazole-resistant *Candida parapsilosis* strains in a patient population for which previous fluconazole exposure was rare. This finding suggests that vigilant monitoring should be performed to identify new strains of fluconazole-resistant *Candida parapsilosis*, especially in ICU wards, due to their potential for dissemination through horizontal transmission.

#### **Abbreviations**

FRCP - fluconazole-resistant *C. parapsilosis*; FSC – fluconazole-susceptible *Candidas*; ICU - intensive care unit; CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute; (L-AmB) - Liposomal amphotericin B

#### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Authors' contributions**

Conceived and designed study: HMSP, ALC, LAC. Collection of data: HMSP, RAS, CMGD, ACRS. Analyzed the data: HMSP, LAC, RAS. Manuscript preparation: ALC, HMSP, LAC ACRS, CMGD. All authors read and approved the final manuscript

### **Acknowledgements**

This study was supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), grant (2012/04767-1) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil, (grant 308011/2010-4). A.C.R.S. received a doctoral fellowship from FAPESP (2012/04769-4). A.L.C. received grants from FAPESP and CNPq.

### **Author details**

<sup>1</sup>Medicine professor of Escola Superior de Ciências da Saúde, Hospital de Base do Distrito Federal, Brasília DF, Brazil. <sup>2</sup>University Hospital of Universidade de Brasília, Brasília DF, Brazil. <sup>3</sup>LEMI – Laboratório Especial de Micologia - Universidade Federal de São Paulo SP, São Paulo, Brazil. <sup>4</sup> Hospital Infection Control Service of Hospital Santa Luzia, Brasilia DF, Brazil. <sup>5</sup>Head of LEMI – Laboratório Especial de Micologia - Universidade Federal de São Paulo SP, São Paulo, Brazil.

## References

1. Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ. Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *Int J Infect Dis*. 2010;14:e954–66.
2. Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, 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). *Int J Antimicrob Agents*. 2011;38:65–9.
3. Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag*. 2014;10:95–105.
4. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20:133–63.
5. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One*. 2013;8:e59373.
6. Moretti ML, Trabasso P, Lyra L, Fagnani R, Resende MR, Cardoso LG, de O, et al. Is the incidence of candidemia caused by *Candida glabrata* increasing in Brazil? Five-year surveillance of *Candida* bloodstream infection in a university reference hospital in southeast Brazil. *Med Mycol*. 2013;51:225–30.
7. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da MDA, et al. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol*. 2006;44:2816–23.
8. Heimann SM, Cornely OA, Wisplinghoff H, Kochanek M, Stippel D, Padosch SA, et al. Candidemia in the intensive care unit: analysis of direct treatment costs and clinical outcome in patients treated with echinocandins or fluconazole. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;34:331–8.

9. Falagas ME, Apostolou KE, Pappas VD. Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006;25:419–25.
10. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, et al. Results from the Artemis DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to Fluconazole and Voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol*. 2010;48:1366–77.
11. Hinrichsen SL, Falcão É, Vilella TAS, Colombo AL, Nucci M, Moura L, et al. Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop Agosto De*. 2008;41:394–8.
12. Morii D, Seki M, Binongo JN, Ban R, Kobayashi A, Sata M, Hashimoto S, Shimizu J, Morita S, Tomono K. Distribution of *Candida* species isolated from blood cultures in hospitals in Osaka, Japan. *J Infect Chemother*. 2014;20:558–62.
13. Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, Horn DL, Reboli AC, Rotstein C, et al. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) Registry 2004–2008. *PLoS One*. 2014;9:e101510.
14. Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, Garbino J, Kullberg BJ, Lortholary O, et al. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:19–37.
15. Colombo AL, Guimarães T, Camargo LF, Richtmann R, de Queiroz-Telles Fd, Salles MJ, et al. 2013. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Braz J Infect Dis*. 2013;17:283–312.
16. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Calandra TF, Edwards JE, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009



update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009;48:503–35.

17. Pfaller MA, Messer SA, Woosley LN, Jones RN, Castanheira M. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and Mold isolates collected from 2010 to 2011: application of New CLSI clinical breakpoints and epidemiological Cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance. *J Clin Microbiol*. 2013;51:2571–81.
18. Jain P, Khan ZK, Bhattacharya E, Ranade SA. Variation in random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles specific to fluconazole-resistant and -sensitive strains of *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001;41:113–9.
19. Souza ACR, Ferreira RC, Gonçalves SS, Quindós G, Eraso E, Bizerra FC, et al. Accurate identification of *Candida parapsilosis* (sensu lato) by use of mitochondrial DNA and real-Time PCR. *J Clin Microbiol*. 2012;50:2310–4.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute; Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-3rd ed. document M27-A3. CLSI, Wayne, PA, USA; 2008.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute; Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 4th informational supplement. document M27-s4. CLSI, Wayne, PA, USA; 2012.
22. Barros AJ, Hiraikata VN. Alternatives for logistic regression in cross-sectional studies: an empirical comparison of models that directly estimate the prevalence ratio. *BMC Med Res Methodol*. 2003;3:21.
23. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. 2008. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21:606–25.
24. Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, Fiori B, Rossi M, Porta R, et al. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *J Clin Microbiol*. 2007;45:1843–50.

25. Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Stein B, Hollick R, Lockhart SR, et al. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008-2011. *Clin Infect Dis*. 2012;55:1352–61.
26. Pfaller MA, Jones RN, Castanheira M. Regional data analysis of *Candida non-albicans* strains collected in United States medical sites over a 6-year period, 2006–2011. *Mycoses*. 2014;57:602–11.
27. Arendrup MC, Dzajic E, Jensen RH, Johansen HK, Kjældgaard P, Knudsen JD, et al. Epidemiological changes with potential implication for antifungal prescription recommendations for fungaemia: data from a Nationwide fungaemia surveillance programme. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19:E343–53.
28. Minea B, Nastasa V, Moraru RF, Kolecka A, Flonta MM, Marincu I, et al. Species distribution and susceptibility profile to fluconazole, voriconazole and MXP-4509 of 551 clinical yeast isolates from a Romanian multi-centre study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34:367–83.
29. Silva AP, Miranda IM, Lisboa C, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. Metapsilosis* in a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol*. 2009;47:2392–7.
30. Gonçalves SS, Amorim CS, Nucci M, Padovan ACB, Briones MRS, Melo ASA, et al. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16:885–7.
31. Ruiz LS, Khouri S, Hahn RC, da Silva EG, de Oliveira VK, Gandra RF, et al. Candidemia by species of the *Candida parapsilosis* complex in children's hospital: prevalence, biofilm production and antifungal susceptibility. *Mycopathologia*. 2013;175:231–9.
32. Bonfietti LX, Martins Mdos A, Szeszs MW, Pukiskas SB, Purisco SU, Pimentel FC, et al. Prevalence, distribution and antifungal susceptibility profiles of

*Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* bloodstream isolates. *J Med Microbiol.* 2012;61:1003–8.

33. Trabasso P, Matsuzawa T, Fagnani R, Muraosa Y, Tominaga K, Resende MR, et al. Isolation and drug susceptibility of *Candida parapsilosis sensu lato* and other species of *C. parapsilosis* complex from patients with blood stream infections and proposal of a novel LAMP identification method for the species. *Mycopathologia.* 2015;179:53–62.
34. Cantón E, Pemán J, Quindós G, Eraso E, Miranda-Zapico I, Álvarez M, et al. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:5590–6.
35. Feng X, Ling B, Yang G, Yu X, Ren D, Yao Z. Prevalence and distribution profiles of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* responsible for superficial candidiasis in a Chinese university hospital. *Mycopathologia.* 2012;173:229–34.

Table 1. Epidemiological and clinical characteristics of 42 patients with fungemia caused by fluconazole-resistant *C. parapsilosis* (FRCP) and fluconazole-susceptible *Candida* species (FSC).

	<b>FRCP</b> <b>(N=23)</b>	<b>FSC<sup>a</sup></b> <b>(N=19)</b>	<b>p value</b>
Age (years) - median (range)	70.3 (24-92)	76.52 (35-91)	0.53
Gender female - n (%)	7 (30.4)	8 (42.1)	0.43
Time to candidemia – median/range	22 (15-40)	25 (17-52)	0.22
Apache II score – median/range	14 (7-19)	16 (14-21)	0.43
Death up to 30 days after candidemia (%)	10 (43.5)	9 (47.4)	0.80
<b>Comorbidities - n (%)</b>			
Cancer	6 (26.1)	2 (10.5)	0.26
Pulmonary disease	10 (43.5)	11 (57.9)	0.352
Cardiac disease	6 (26.1)	3 (15.8)	0.666
<b>Diabetes mellitus</b>	<b>11 (47.8)</b>	<b>2 (10.5)</b>	<b>0.023</b>
Renal failure	4 (17.4)	3 (15.8)	1.000
<b>Previous exposure to medical procedures and medicines – n (%)</b>			
Short-term catheter	22 (95.7)	17 (89.5)	0.58
Catheter tip positive	4 (17.4)	3 (15.8)	1.000
Previous hemodialysis	3 (13)	1 (5.3)	0.613

Prior surgery	13 (56.5)	10 (52.6)	0.801
Mechanical ventilation	16 (69.5)	14 (73.7)	0.804
Parenteral nutrition	7 (30.4)	1 (5.3)	0.054
Hospitalization	5 (20)	7 (41.2)	0.136
Antibiotics	12 (52.2)	8 (42.1)	0.623
Steroids	8 (34.8)	7 (36.9)	0.975
Any antifungal drug	8 (34.8)	3 (15.8)	0.259
Fluconazole	5 (21.74)	3 (15.8)	0.870

---

<sup>a</sup> **FSC:** all *Candida* strains considered susceptible to fluconazole by the Vitek 2 system

5.2.ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA ANTIMICROBIAL  
AGENTS AND CHEMOTHERAPY

**Evaluation of *C. parapsilosis* resistance to fluconazole: molecular mechanisms and in vivo impact in infected *G. mellonella* larvae**

**Ana Carolina R. Souza<sup>1</sup>, Beth Burgwyn Fuchs<sup>2</sup>, Henrique M. S. Pinhati<sup>3,4</sup>,  
Ricardo A. Siqueira<sup>1</sup>, Eleftherios Mylonakis<sup>2</sup>, Arnaldo L. Colombo<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório Especial de Micologia, Disciplina de Infectologia, Escola paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil;

<sup>2</sup>Division of Infectious Diseases, Rhode Island Hospital, Alpert Medical School of Brown University, Providence, RI, USA;

<sup>3</sup>Univerdiade de Brasília - UnB

<sup>4</sup> Hospital Santa Luzia, Brasília, DF, BRAZIL

This study was presented in part at the 54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, United States, September 5 - 9, 2014 [abstr. M-1094]

**Running title: Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida parapsilosis***

**Key words:** *Candida parapsilosis*, mechanisms of resistance, fluconazole, *ERG11* mutations.

**#Corresponding author.** Mailing address: Laboratório Especial de Micologia, Universidade Federal de São Paulo, Rua Pedro de Toledo, 669 – 5º andar, CEP

04039-032, São Paulo, SP, Brasil. Phone: +55-11-55764848 (VOIP 2448). Fax: +55-11-50813240. E-mail: [arnaldocolombo@gmail.com](mailto:arnaldocolombo@gmail.com)

## ABSTRACT

*Candida parapsilosis* is the main non-*albicans* *Candida* species isolated from patients in Latin America and is a major pathogen in certain groups, such as neonates. Mutations in the *ERG11* gene and overexpression of membrane transporter proteins have been linked to fluconazole resistance (FR). The aim of this study was to evaluate the molecular mechanisms in fluconazole resistant strains of *C. parapsilosis* isolated from critically ill patients. Speciation of the 9 collected *C. parapsilosis* (*sensu lato*) isolates was confirmed through molecular identification using TaqMan probes. The *G. mellonella* infection model was used to confirm *in vitro* resistance. We assessed the presence of *ERG11* mutations as well as the expression of *ERG11* and two additional genes that contribute to antifungal resistance (*CDR1* and *MDR1*) by using real-time RT-PCR. All *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) isolates tested exhibited fluconazole MICs between 8 and 16 g/ml. The *in vitro* data were confirmed by failure of fluconazole in treating *G. mellonella* infected by fluconazole resistant strains. The sequencing of the *ERG11* gene revealed a common mutation leading to an Y132F amino acid substitution in all isolates. After fluconazole exposure, we noted overexpression of *ERG11*, *CDR1* and *MDR1* in 9/9, 1/9 and 4/9 strains, respectively. We demonstrated that diverse mechanisms of resistance, including the presence of point mutations in the *ERG11* gene and overexpression of *ERG11*, and genes encoding efflux pumps are involved in fluconazole resistance in *C. parapsilosis*. This is the first comprehensive assessment at molecular levels of mechanisms of FR in clinical *C. parapsilosis* strains from Latin America.



## INTRODUCTION

*C. parapsilosis* (*sensu lato*) is a common human opportunistic pathogen able to cause superficial and invasive diseases being especially prevalent in neonates and adults patients with catheter related fungemia **(Trofa et al. 2008; Pammi et al. 2013; Quindós, 2014)**. *C. parapsilosis* (*sensu lato*) is the most common non-*albicans* *Candida* species (NAC) isolated from bloodstream infections (BSI) in Spain, Italy and many countries in Latin America and is becoming also prevalent in USA medical centers **(Almirante et al. 2005; Basetti et al. 2006; Colombo et al. 2006; Basetti et al. 2013; Nucci et al. 2013; Marcos-Zambrano et al. 2014; Pfaller et al. 2014)**.

Although *C. parapsilosis* strains are usually susceptible to azoles, recent reports indicates a rise in the incidence of invasive infections due to *C. parapsilosis* fluconazole resistant isolates **(Moudgal et al. 2005; Sarvikivi, et al. 2005; Canton et al. 2011; Cleveland et al. 2012; Pfaller et al. 2013; Pfaller and Castanheira, 2014)**. Azole drugs, especially fluconazole, are commonly used to treat *Candida* infections because of their safety and the availability of oral and intravenous formulations **(Pappas et al. 2009; Colombo et al. 2012)**. This family of antifungal agents prevents the synthesis of ergosterol, a major component of fungal plasma membranes, by inhibiting the cytochrome P-450-dependent enzyme lanosterol demethylase **(Georgopapadakou and Walsh, 1996)**.

Fluconazole resistance in *C. albicans* may occur in two ways: (i) reduced level of fluconazole accumulation, by active efflux of drugs, resulting particularly from overexpression of the *CDR1*, *CDR2*, and *MDR1* genes **(Sanglard et al. 1995; Albertson et al. 1996; Goldman et al. 2004; Cowen et al. 2014)**, and (ii) an alteration in the drug target that results in an increased level of production of the enzyme or in its reduced binding affinity for fluconazole **(Heilmann et al. 2010; Sanglard et al. 1998; Goldman et al. 2004; Monk et al. 2014; Cowen et al. 2014)**. However, it is still not clear whether or not these mechanisms are also relevant for NAC, including *C. parapsilosis*. In this study, we evaluated the mechanisms of fluconazole resistance in *C. parapsilosis* strains isolated during an outbreak of candidemia documented in a single hospital in Brazil.

## MATERIAL AND METHODS

**C. parapsilosis strains.** The isolates of *C. parapsilosis* (*sensu lato*) included in the present study were obtained from intensive care unit (ICU) patients with candidemia enrolled in a retrospective survey conducted from July/2011 to February/2012 in a Brazilian institution (**Pinhati et al. 2013**). Initial yeast identification and susceptibility testing was performed by the VITEK II – system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). Nine *C. parapsilosis* (*sensu lato*) isolates for which azoles MICs exceeded the established susceptibility breakpoint were sent to a reference laboratory (Laboratório Especial de Micologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil) for further molecular identification and confirmation of antifungal susceptibility by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) reference method. Resistant strains were selected for *in vivo* studies and molecular characterization of mechanisms of fluconazole resistance. In addition, the reference strain - *C. parapsilosis* ATCC 22019 was also included as a control organism in all laboratory tests.

**Molecular identification of *C. parapsilosis* (*sensu lato*) isolates by real time TaqMan® PCR assays.** DNA was extracted from the isolates using mechanical disruption with glass beads and phenol/chloroform (**Jain et al. 2001**). Real-time PCR was performed using species specific TaqMan® probes, as previously described by our group (**Souza et al. 2012**).

***In vitro* susceptibility testing.** Antifungal susceptibility testing was performed using the CLSI microdilution assay (**CLSI, 2008**). Fluconazole (FLC), voriconazole (VRC), anidulafungin (ANF), and amphotericin B (AMB), were provided by Pfizer Pharmaceutical Group (New York, NY, USA) and Sigma Chemical Corporation (St. Louis, MO, USA), respectively. The CLSI-M27-S4 document (**CLSI, 2012**) was used as interpretative guidelines for classifying the *C. parapsilosis* (*sensu lato*) isolates as susceptible, susceptible dose dependent, or resistant to antifungals.

**Sequencing of the *ERG11* gene.** The entire open reading frame (ORF) of the *ERG11* gene encoding lanosterol 14  $\alpha$  - demethylase was amplified and sequenced with specific primers (Table 1). PCR products were purified using The Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI) and sequenced in an ABI3100

automated sequencer (Applied Biosystems). DNA and the corresponding amino acid sequences were analyzed by using SeqMan II and EditSeq software packages (Lasergene 8.0; DNASTar, Inc., Madison, WI). The sequences generated in this study have been deposited in the GenBank (NCBI) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>) under the following accession numbers: KR082784 – KR082792.

**Relative quantification of gene expression by quantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR).** Quantitative RT-PCR was undertaken to estimate the expression of *CDR1*, *MDR1* and *ERG11* genes by *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) strains in the presence or absence of fluconazole. Experiments were repeated three times.

**RNA extraction.** For each isolate, an overnight culture grown in 2 mL of RPMI-morpholinepropanesulfonic acid (RPMI) buffered with MOPS was diluted to an initial inoculum of  $10^5$  colony-forming units per mL (CFU/ml) in fresh RPMI-MOPS and grown at 37°C with shaking at 250 rpm. The treatment group was exposed to fluconazole at a concentration of one time the MIC, which was added after 6h of growth (to cells in log-phase growth) and continued for 1.5h. Following drug exposure, cells were harvested for RNA isolation as previous described (**Goldman et al. 2004**). cDNA was synthesized by using the Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific).

**RT-PCR.** cDNA was analyzed by qRT-PCR using a CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, USA) and specific primers (Table 1). The iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) was used for PCR reactions. The  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method was used for relative quantification of gene expression, and the data were normalized to *ACT1* gene expression.

**In vivo studies.** To confirm the observed fluconazole resistance phenotype, we assessed the response to fluconazole treatment by both fluconazole resistant and susceptible *C. parapsilosis* strains, in the *Galleria mellonella* infection model.

**Fungal inoculum preparation.** *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) isolates ATCC 22019 and LEMI 8657 were used for *in vivo* experiments. The cells were grown in YPD at 30°C overnight. Cells were collected by centrifugation and washed three times with

phosphate-buffered saline (PBS). Yeast cells were counted using a hemocytometer. The cell number was confirmed by determining colony forming units (CFU) per mL on YPD plates.

**Inoculation of *G. mellonella* with *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) strains.** Wax moth larvae killing assays were performed as previously described (**Mylonakis et al. 2005**). Briefly, groups of 16 larvae (250-350 mg, Vanderhorst Wholesale, St. Marys, OH, USA) were each inoculated with  $10^6$  CFU/larvae. A Hamilton syringe was used to inject 10  $\mu$ l aliquots of the inoculum into the hemocoel of each larva via the last, left proleg (**Fuchs et al. 2010**). After injection, larvae were incubated at 37°C and the number of dead larvae was monitored daily. Two control groups were included: one group was inoculated with PBS to observe the killing due to physical trauma, and the other received no injection as a control for general viability.

**Treatment with fluconazole.** Infected larvae were treated with fluconazole (14 mg/kg) (Sigma Chemical Corporation, St. Louis, MO, USA). The antifungal was provided immediately after the infection and was delivered in a 10 l volume to the last, right proleg. Groups of 10 larvae were treated with the fluconazole alone to test the toxicity. Survival was monitored every 24 h.

**Fungal burden determination.** Fungal burden was determined by CFU counts after 16 h inoculation. For this purpose, five larvae per group were weighed and homogenized in 1 ml sterile PBS with a Tissue Tearor (model 398, Biospec Products, Inc, Bartelsville), and serial dilutions of the homogenates were plated on YPD agar plates containing kanamycin (45  $\mu$ g/mL), streptomycin (100  $\mu$ g/mL), and ampicillin (100  $\mu$ g/mL). Plates were incubated at 30°C for 72 h before colonies were counted.

**Statistics.** Killing curves were plotted and estimation of differences in survival (log rank and Wilcoxon tests) analyzed by the Kaplan-Meier method using with Graph Pad Prisma 5 (La Jolla CA, USA). The same software program was used for the statistical analysis of the CFU of *C. parapsilosis* in the hemocoel (t-Test). A *p* value of <0.05 was considered significant. Each experiment was repeated at least three times, and each independent experiment gave similar results. The data presented in this report are from a representative experiment.

## RESULTS

**Molecular identification of *C. parapsilosis (sensu lato)* isolates by real time TaqMan® PCR assays.** The nine *C. parapsilosis* strains selected for this study were genetically identified as *C. parapsilosis (sensu stricto)* when tested by the species specific TaqMan®

**Antifungal susceptibility tests.** Table 2 summarizes the MIC values obtained for the nine *C. parapsilosis (sensu stricto)* clinical isolates and the reference strain ATCC 22019 for the 4 antifungal agents tested. The 9 *C. parapsilosis* bloodstream isolates tested exhibited resistance to fluconazole (MICs  $\geq 8$   $\mu\text{g/mL}$ ). Regarding voriconazole, 1 isolate was considered resistant to voriconazole (MIC  $\geq 1$   $\mu\text{g/mL}$ ), 6 were considered as susceptible dose dependent (S-DD for MIC of 0.5  $\mu\text{g/mL}$ ) and 1 was considered susceptible to voriconazole (MIC  $\leq 0.125$   $\mu\text{g/mL}$ ). All of them were susceptible to amphotericin B (MICs  $\leq 1$   $\mu\text{g/mL}$ ) and anidulafungin (MICs  $\leq 2$   $\mu\text{g/mL}$ ). Further characterization of fluconazole resistance mechanisms was performed for all nine *C. parapsilosis* isolates.

**Sequencing of the *ERG11* gene.** The whole ORF of the *ERG11* gene was determined for the 9 *C. parapsilosis (sensu stricto)* resistant isolates and for the reference strains *C. parapsilosis* ATCC 22019. The *ERG11* sequences generated were 1569 BPs in length. Comparison of the *ERG11* sequences of the 9 isolates studied with the available corresponding sequence for the reference strain ATCC 22019 (GenBank accession no. GQ302972.1), revealed the presence of two nucleotides mutated, including a silent mutation (T591C) and a missense mutation (A395T) which led to an Y132F amino acid substitution and changed the protein sequence (Table 2). We did not find single allele mutations (i.e., heterozygous for the mutation), but only point mutations in both alleles (i.e., homozygous for the mutation).

**Expression of *ERG11*, *CDR1* and *MDR1* in *C. parapsilosis (sensu stricto)* bloodstream isolates.** To investigate if changes in the expression patterns of the resistance-associated genes *ERG11*, *CDR1* and *MDR1* could be associated with the fluconazole resistance phenotype observed in our clinical isolates, we used quantitative RT-PCR analysis. Table 2 shows the relative expression of each respective gene during fluconazole exposure (after 1.5h of exposure) compared to

the absence of fluconazole (where the mRNA expression levels were given a value of 1.0).

All *C. parapsilosis* isolates expressed increased *ERG11* levels (1.5 to 4.9 times) in the presence of fluconazole ( $p < 0.001$ ). The expression of *MDR-1* increased in the isolates LEMI 8646, LEMI 8657, LEMI 8382, LEMI 8653, while the expression of *CDR-1* increases only in the isolate LEMI 8646 ( $p < 0.05$ ). Taken together, our results suggest that there is no clear correlation among different levels of expression of the *CDR1* and *MDR1* genes and MICs.

***In vivo* studies.** As shown in Figure 1, both the fluconazole resistant and references strains caused a lethal infection to *G. mellonella* larvae. Treatment after fluconazole did not prolong survival of larvae infected with the fluconazole resistant strain LEMI 8657. However, when the infection was due to the fluconazole susceptible strain ATCC 22019, the treatment produced significant survival ( $p < 0.001$ ). In addition, we also evaluated the impact of fluconazole on the fungal burden of susceptible and resistant *C. parapsilosis* strains within the hemocoel (Figure 2). Although fluconazole administration did not prolong survival, treatment of larvae in the LEMI 8657 group led to a slight decrease in the CFUs. In contrast, fluconazole treatment dramatically lowered the fungal burden of the larvae infected by ATCC 22019 when compared to untreated group ( $p < 0.005$ ). Suggesting that fluconazole inhibited the ATCC 22019 strain but the resistant train LEMI 8657, as demonstrated *in vitro*, was not inhibited *in vivo*.

## DISCUSSION

In this study, we evaluated the mechanisms of fluconazole resistance in 9 *C. parapsilosis* strains isolated during an outbreak of candidemia and represent the first comprehensive assessment at molecular levels of mechanisms of fluconazole resistance in clinical *C. parapsilosis* strains from South America. Our results indicate that various mechanisms, including the presence of point mutations in the *ERG11* gene and overexpression of *ERG11*, and genes encoding efflux pumps are involved to confer fluconazole resistance in *C. parapsilosis* strains.

Despite most of *C. parapsilosis* clinical isolates are susceptible to triazoles, some authors have reported a rise in the incidence of invasive infections due to

fluconazole resistant strains (**Canton et al. 2011; Lockhart et al. 2012; Cleveland et al. 2012; Pfaller and Castanheira, 2014**). The rise in *C. parapsilosis* fluconazole resistance is a cause of concern due the ability of this species to be frequently transmitted through contaminated medical devices or fluids, and the hands of health care workers (**Trofa, 2008**). In *C. albicans*, fluconazole resistance is the result of a combination of different molecular mechanisms, including mutations and overexpression of *ERG11*, and overexpression of two genes, *CDR1* (*Candida* drug resistance gene) and *MDR1* (multidrug resistance gene) (**Sanglard et al. 1995; Morschhauser, 2002; Cowen et al. 2014**).

Alterations in the *ERG11* sequence have been reported in *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, and *Candida kefyr* (**Perea et al. 2001; Goldman et al. 2004; Vandepute et al. 2005; Morio et al. 2010; Hull et al. 2012; Jiang et al. 2013; Forastiero et al. 2013; Couzigou et al. 2014**). In the present study, all 9 *C. parapsilosis* isolates exhibiting high fluconazole MICs had a point mutation at the *ERG11* sequence that led to an Y132F amino acid substitution, when compared to the control strain ATCC22019. A similar point mutation was recently observed in resistant *C. parapsilosis* strains from patients in the US (**Grossman et al. 2015**). Interestingly, the occurrence of missense mutation at the 132 site was also reported in *C. albicans* and *C. tropicalis* (**Morio et al. 2010; Jiang et al. 2013; Forastiero et al. 2013**). Taken together these data support the hypothesis that the 132 site may be a *hot spot* for *ERG11* in *Candida* spp., as suggested by Jiang et al. (**2013**).

Using real-time RT-PCR, we assessed the quantitative expression of *ERG11*, as well as the expression of the ABC transporter, *CDR1*, and the MFS transporter, *MDR1*, in the presence or absence of fluconazole. In the presence of fluconazole, all fluconazole *C. parapsilosis* resistant clinical isolates showed increased mRNA expression of the *ERG11* gene, which encodes the target 14- $\alpha$ -demethylase. Supporting our data, similar results were observed in NCAC species, including *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* and *C. krusei* (**Barchiesi et al. 2000; Perea et al. 2002; Redding et al. 2002; Vandeputte et al. 2005; Rogers et al. 2006; Tavakoli et al. 2010; Jiang et al. 2013**). In contrast, Silva et al. (**2011**) analyzed the resistance mechanisms developed by induced resistant *C. parapsilosis* strains and found that the expression of *ERG11* is reduced in fluconazole resistant isolates.

Overexpression of the *MDR1* gene has been linked to fluconazole resistance in *C. albicans* and *C. dubliniensis* (Moran et al. 1998; Wirsching et al. 2001; Moran et al. 2002; Morschhauser, 2002; Cowen et al. 2014). Homologues of *MDR1* have been described in *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. krusei*, however, the overexpression of these homologues has not yet been identified as a cause of azole resistance in clinical isolates (Barchiesi et al. 2000; Vandepute et al. 2005; Guinea et al. 2000; Jiang et al. 2013). In *C. parapsilosis*, previous studies have demonstrated upregulation of *MDR1* in azole-resistant strains (Silva et al. 2011; Grossman et al. 2015). Accordingly, 4 out of 9 of our isolates showed increased mRNA expression of *MDR1*.

Only one of our nine clinical strains showed increased expression of *CDR1*. Although several studies have reported that overexpression of *CDR1* gene plays an important role in fluconazole resistance in some *Candida species* (Morschhauser, 2002; Cowen et al. 2014), the role of this specific transporter in *C. parapsilosis* remains unclear. Silva et al. (2011) suggested an overexpression of *CDR1* in fluconazole induced resistant *C. parapsilosis* strains, since they observed upregulation of the transcription factor *NDT80* which, in *C. albicans*, modulates azole tolerance by controlling the expression of the gene *CDR1*.

In order to assess the correlation between the *in vitro* resistant phenotype with an *in vivo* model, we infected *G. mellonella* larvae to evaluate the response to fluconazole therapy. The *in vivo* response showed a very good correlation with the resistance phenotype documented *in vitro*. It is worth mentioning that resistance to fluconazole in *C. parapsilosis* appears not to be associated with decreasing in fitness and virulence as documented in our *in vivo* infection model in *G. mellonella*, where the resistant strain (LEMI 8657) exhibited a 50% and 80% killing at 24 and 72 hours post infection, respectively, compared to the susceptible strain (ATCC 22019) that had a 50% and 100% killing rate at 96 and 144 hours.

In summary, we demonstrated that *C. parapsilosis* fluconazole resistant strains are also present in Latin America with a potential of nosocomial spread of the pathogen through the hands of health care workers. The *G. mellonella* model demonstrated that for our *C. parapsilosis* strains fluconazole resistance came at no cost for pathogenicity and virulence. Finally, our data demonstrated that not only



overexpression of *MDR1* and mutations in *ERG11*, but also overexpression of *ERG11* and *CDR1* are involved in fluconazole resistance in *C. parapsilosis*

### **Acknowledgements**

This study was supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), grant (2012/04767-1) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil, (grant 308011/2010-4). A.C.R.S. received a doctoral fellowship from FAPESP (2012/04769-4). A.L.C. received grants from FAPESP and CNPq. B.B.F. and E.M received a grant from the Brown-Brazil Initiative.

## REFERENCES

**Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD.** 2008. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev.* **21**(4):606-25. doi: 10.1128/CMR.00013-08.

**Pammi M, Holland L, Butler G, Gacser A, Bliss JM.** 2013. *Candida parapsilosis* is a significant neonatal pathogen: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J* **32**:e206–e216.

**Quindós G.** 2014. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol.* **31**(1):42-8.

**Almirante, B., D. Rodriguez, B. J. Park, M. Cuenca-Estrella, A. M. Planes, M. Almela, J. Mensa, F. Sanchez, J. Ayats, M. Gimenez, P. Saballs, S. K. Fridkin, J. Morgan, J. L. Rodriguez-Tudela, D. W. Warnock, A. Pahissa, and G. Barcelona Candidemia Project Study.** 2005. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* **43**:1829-35.

**Bassetti M, Righi E, Costa A, Fasce R, Molinari MP, Rosso R, Pallavicini FB, Viscoli C.** 2006. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infect Dis.* **10**:6:21.

**Colombo, A. L., M. Nucci, B. J. Park, S. A. Nouer, B. Arthington-Skaggs, D. A. da Matta, D. Warnock, J. Morgan, and S. Brazilian Network Candidemia.** 2006. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol* **44**:2816-23.

**Bassetti M, Merelli M, Righi E, Diaz-Martin A, Rosello EM, Luzzati R, Parra A, Trecarichi EM, Sanguinetti M, Posteraro B, Garnacho-Montero J, Sartor A, Rello J, Tumbarello M.** 2013. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain. J Clin Microbiol. **51**(12):4167-72.

**Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, Guzman-Blanco M, Santolaya ME, Thompson L, Sifuentes-Osornio J, Echevarria JI, Colombo AL; Latin American Invasive Mycosis Network.** 2013. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. PLoS One **8**(3):e59373.

**Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Sánchez C, Muñoz P, Bouza E, Guinea J.** 2014. Antifungal resistance to fluconazole and echinocandins is not emerging in yeast isolates causing fungemia in a Spanish tertiary care center. Antimicrob Agents Chemother. **58**(8):4565-72.

**Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, Horn DL, Reboli AC, Rotstein C, Franks B, Azie NE.** 2014. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004-2008. Plos One **3**; 9(7)e101510.

**Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD; Infectious Diseases Society of America.** 2009. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect. Dis. **48**:503–535.

**Colombo AL, Guimarães T, Aranha Camargo LF, Richtmann R, Queiroz-Telles F, Salles MJC, da Cunha CA, Yasuda MAS, Moretti ML, Nucci M; on behalf of the Consenso Brasileiro de Infecções por *Candida* Group.** 2012. Brazilian guidelines for the

management of candidiasis: a joint meeting report of three medical societies – Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia, Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Braz J Infect Dis.* **16** Suppl 1:S1-S34.

**Georgopapadakou NH, Walsh TJ.** 1996. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob Agents Chemother.* **40**(2):279-91.

**Moudgal V, Little T, Boikov D, Vazquez JA.** 2005. Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**(2):767-9.

**Sarvikivi E, Lyytikäinen O, Soll DR, Pujol C, Pfaller MA, Richardson M, Koukila-Kähkölä P, Luukkainen P, Saxén H.** 2005. Emergence of fluconazole resistance in a *Candida parapsilosis* strain that caused infections in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol.* **43**(6):2729-35.

**Canton, E., J. Peman, G. Quindos, E. Eraso, I. Miranda-Zapico, M. Alvarez, P. Merino, I. Campos-Herrero, F. Marco, E. G. de la Pedrosa, G. Yague, R. Guna, C. Rubio, C. Miranda, C. Pazos, D. Velasco, and F. S. Group.** 2011. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:5590-6.

**Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Stein B, Hollick R, Lockhart SR, Magill SS, Derado G, Park BJ, Chiller TM.** 2012. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008-2011. *Clin Infect Dis.* **15**;55(10):1352-61.

**Pfaller MA, Messer SA, Woosley LN, Jones RN, Castanheira M.** 2013. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance. J Clin Microbiol. **51**(8):2571-81.

**Pfaller MA, Jones RN, Castanheira M.** 2014. Regional data analysis of *Candida non-albicans* strains collected in United States medical sites over a 6-year period, 2006-2011. *Mycoses* **57**:602–611.

**Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J.** 1995. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. Antimicrob Agents Chemother. **39**(11):2378-86.

**Albertson GD, Niimi M, Cannon RD, Jenkinson HF.** 1996. Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. Antimicrob Agents Chemother. **40**(12):2835-41.

**Goldman GH, da Silva Ferreira ME, dos Reis Marques E, Savoldi M, Perlin D, Park S, Godoy Martinez PC, Goldman MH, Colombo AL.** 2004. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in candida albicans clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **50**(1):25-32.

**Cowen LE, Sanglard D, Howard SJ, Rogers PD, Perlin DS.** 2014. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **10.** pii: a019752

**Heilmann CJ, Schneider S, Barker KS, Rogers PD, Morschhäuser J.** 2010. An A643T mutation in the transcription factor Upc2p causes constitutive ERG11 upregulation and

increased fluconazole resistance in *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother. **54**(1):353-9.

**Sanglard D, Ischer F, Koymans L, Bille J.** 1998. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother. **42**(2):241-53.

**Monk BC, Tomasiak TM, Keniya, Huschmann FU, Tyndall JD, O'Connell JD 3rd, Cannon RD, McDonald JG, Rodriguez A, Finer-Moore JS, Stroud RM.** 2014. Architecture of a single membrane spanning cytochrome P450 suggests constraints that orient the catalytic domain relative to a bilayer. Proc Natl Acad Sci U S A. **111**(10):3865-70.

**Pinhati HM, Casulari LA, Bizerra FC, Siqueira RA, Castro FF, Colombo AL.** 2013. Abstr 53th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother, abstr K-1707.

**Jain P, Khan ZK, Bhattacharya E, Ranade SA.** 2001. Variation in random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles specific to fluconazole-resistant and -sensitive strains of *Candida albicans*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **41**:113–119.

**Souza ACR, Ferreira RC, Gonçalves SS, Quindós G, Eraso E, Bizerra FC, Briones MRS, Colombo AL.** 2012. Accurate identification of *Candida parapsilosis* (*sensu lato*) using mitochondrial DNA and real-time PCR. J Clin Microbiol. **50**(7):2310-2314.

**Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition. CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

**Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2012. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informational supplement. CLSI document M27- S4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

**Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, Calderwood SB, Ausubel FM, Diener A.** 2005. Galleria mellonella as a model system to study Cryptococcus neoformans pathogenesis. Infect Immun. **73**(7):3842-50.

**Fuchs B. B., E. O'Brien, J. B. Khoury, E. Mylonakis.** 2010. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. Virulence **1**(6):475-82.

**Lockhart SR, Iqbal N, Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Bolden CB, Baughman W, Stein B, Hollick R, Park BJ, Chiller T** 2012. Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. J Clin Microbiol **50**:3435–3442. doi:10.1128/JCM.01283-12.

**Morschhäuser J.** 2002. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. Biochim Biophys Acta. **18**;1587(2-3):240-8.

**Perea S, Lo´pez-Ribot JL, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Santilla´n RA, Martinez M, Calabrese D, Sanglard D, Patterson TF.** 2001. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. Antimicrob Agents Chemother **45**, 2676–2684.

**Vandeputte P, Larcher G, Bergès T, Renier G, Chabasse D, Bouchara JP.** 2005. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. Antimicrob Agents Chemother. **49**(11):4608-15.

**Morio F, Loge C, Besse B, Hennequin C, Le Pape P.** 2010. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **66**(4):373-84.

**Hull CM, Parker JE, Bader O, Weig M, Gross U, Warrilow AG, Kelly DE, Kelly SL.** 2012. Facultative sterol uptake in an ergosterol-deficient clinical isolate of *Candida glabrata* harboring a missense mutation in ERG11 and exhibiting cross-resistance to azoles and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother.* **56**(8):4223-32.

**Jiang C, Dong D, Yu B, Cai G, Wang X, Ji Y, Peng Y.** 2013. Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. *J Antimicrob Chemother.* **68**(4):778-85.

**Forastiero A, Mesa-Arango AC, Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, Bernal-Martinez L, Pelaez T, Lopez JF, Grimalt JO, Gomez-Lopez A, Cuesta I, Zaragoza O, Mellado E.** 2013. *Candida tropicalis* antifungal cross-resistance is related to different azole target (Erg11p) modifications. *Antimicrob Agents Chemother.* **57**(10):4769-81.

**Couzigou C, Gabriel F, Biteau N, Fitton-Ouhabi V, Noël T, Accoceberry I.** 2014. Two missense mutations, E123Q and K151E, identified in the ERG11 allele of an azole-resistant isolate of *Candida kefyr* recovered from a stem cell transplant patient for acute myeloid leukemia. *Med Mycol Case Rep.* **9**;5:12-5.

**Grossman NT, Pham CD, Cleveland AA, Lockhart SR.** 2015. *Molecular Mechanisms of Fluconazole Resistance in Candida parapsilosis Isolates* from a U.S. Surveillance System. *Antimicrob Agents Chemother.* **59**(2):1030-7.



**Barchiesi F, Calabrese D, Sanglard D, Falconi Di Francesco L, Caselli F, Giannini D, Giacometti A, Gavaudan S, Scalise G.** 2000. Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**(6):1578-84.

**Perea S, López-Ribot JL, Wickes BL, Kirkpatrick WR, Dib OP, Bachmann SP, Keller SM, Martinez M, Patterson TF.** 2002. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**(6):1695-703.

**Redding SW, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Sadkowski L, Fothergill AW, Rinaldi MG, Eng TY, Patterson TF.** 2002. *Candida glabrata* oropharyngeal candidiasis in patients receiving radiation treatment for head and neck cancer. *J Clin Microbiol* **40**: 1879–1881.

**Rogers PD, Vermitsky JP, Edlind TD, Hilliard GM.** 2006. Proteomic analysis of experimentally induced azole resistance in *Candida glabrata*. *J Antimicrob Chemother* **58**:434–438.

**Tavakoli M, Zaini F, Kordbacheh M, Safara M, Raoofian R, Heidari M.** 2010. Upregulation of the ERG11 gene in *Candida krusei* by azoles. *Daru.* **18**(4):276-80.

**Silva AP, Miranda IM, Guida A, Synnott J, Rocha R, Silva R, Amorim A, Pina-Vaz C, Butler G, Rodrigues AG.** 2011. Transcriptional profiling of azole-resistant *Candida parapsilosis* strains. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:3546-3556.

**Moran GP, Sanglard D, Donnelly S, Shanley DB, Sullivan DJ, Coleman DC.** 1998. Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 1819–1830.

**Wirsching S, Moran GP, Sullivan DJ, Coleman DC, Morschhauser J.** 2001. MDR1-mediated drug resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 3416–3421.

**Moran G, Sullivan D, Morschhauser J, Coleman D.** 2002. The *Candida dubliniensis* CdCDR1 gene is not essential for fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 2829–2841.

**Guinea J, Sánchez-Somolinos M, Cuevas O, Peláez T, Bouza E.** 2006. Fluconazole resistance mechanisms in *Candida krusei*: the contribution of efflux-pumps. *Med Mycol.* **44**(6):575-8.

**Table 1.** Oligonucleotide sequences used in this study

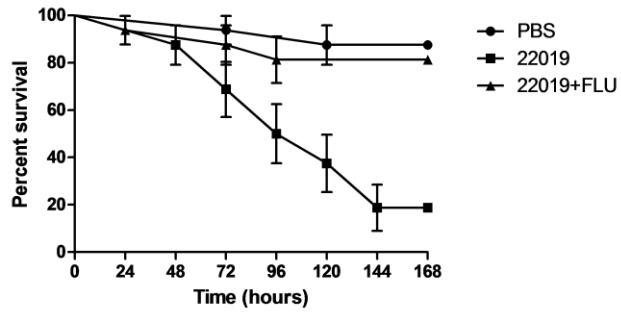
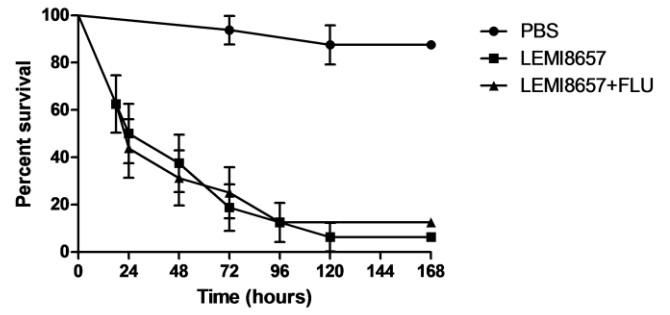
Oligonucleotide <sup>a</sup>	Sequence 5' to 3'	Purpose
MDR1_CP_F	GATTTTTCGCTAGTCCGTGTTTG	<i>MDR1</i> real time PCR
MDR1_CP_R	TGTAGGCGCATAGGTCTCAGGT	
ERG11_CP_F	GTACACCGTCATTACTCTACCCAACA	<i>ERG11</i> real time PCR
ERG11_CP_R	TGCTCCTTTCATTTACAACATCATTT	
CDR1_CP_F	ATTTGCCGACATCCACCGTTAGG	<i>CDR1</i> real time PCR
CDR1_CP_R	ACCATGCTGTTTGCGAGTCCA	
ERG11_CP_F1	CGAGATAATCATCAACGAACATTC	<i>ERG11</i> sequencing
ERG11_CP_R1	CGTTTAAAACATCCAAAGACCTTA	
ERG11_CP_F2	AATCTGAGGGTTTCCTTGATGGT	
ERG11_CP_R2	AAAGACCGCATTGACTACCGAT	

<sup>a</sup>The letters F and R in the primers names describe the orientation of the primers 5' to 3': F for forward (sense) and R for reverse (antisense).

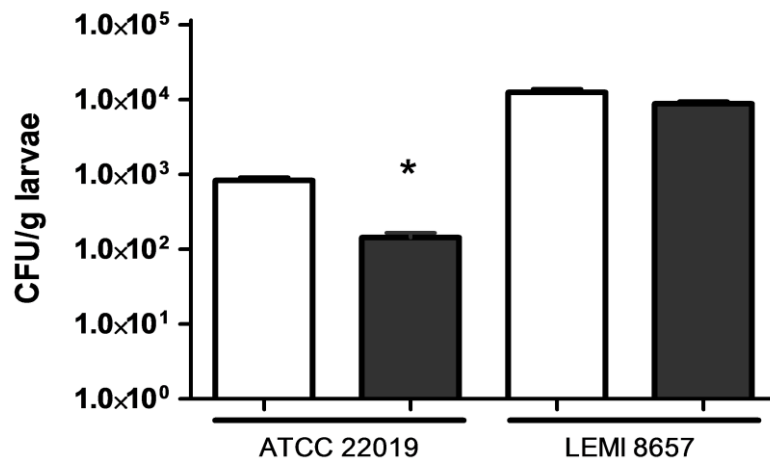
**Table 2.** *In vitro* activity of four antifungal agents against nine clinical isolates of *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) using the CLSI broth microdilution assay complemented by *ERG11* sequence analysis and expression of *ERG11*, *CDR1* and *MDR1* genes.

Isolate	Identification	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) for indicated antifungal agent <sup>a</sup>				Occurrence of mutations in the <i>ERG11</i> gene	<i>ERG11/ACT<sup>b</sup></i>	<i>CDR1/ACT<sup>b</sup></i>	<i>MDR1/ACT<sup>b</sup></i>
		FLC	VRC	ANF	AMB				
LEMI 8646	<i>C. parapsilosis</i> ( <i>sensu stricto</i> )	8	1	2	0.25	T591C, A395T	4.9	1.5	1.3
LEMI 8650	<i>C. parapsilosis</i> ( <i>sensu stricto</i> )	8	0.5	2	0.25	T591C, A395T	3.6	1.3	1.0
LEMI 8653	<i>C. parapsilosis</i> ( <i>sensu stricto</i> )	16	0.5	2	0.25	T591C, A395T	1.5	0.8	1.4
LEMI 8655	<i>C. parapsilosis</i> ( <i>sensu stricto</i> )	16	0.5	1	0.25	T591C, A395T	3.6	1.1	1.2
LEMI 8657	<i>C. parapsilosis</i> ( <i>sensu stricto</i> )	16	0.5	2	0.125	T591C, A395T	3.4	1.1	1.4
LEMI 8662	<i>C. parapsilosis</i> ( <i>sensu stricto</i> )	16	0.5	2	0.25	T591C, A395T	3.7	0.8	1.1
LEMI 8379	<i>C. parapsilosis</i> ( <i>sensu stricto</i> )	8	0.5	2	0.25	T591C, A395T	2.3	0.7	0.5
LEMI 8382	<i>C. parapsilosis</i> ( <i>sensu stricto</i> )	8	0.5	2	0.25	T591C, A395T	3.5	1.1	1.8
LEMI 8383	<i>C. parapsilosis</i> ( <i>sensu stricto</i> )	8	0.5	1	0.25	T591C, A395T	3.0	1.2	0.8
ATCC 22019	<i>C. parapsilosis</i> ( <i>sensu stricto</i> )	0.5	0.5	1	0.125	ND	1.9	0.7	1.1

<sup>a</sup> FLC, fluconazole; VRC, voriconazole; ANF, anidulafungin; AMB, amphotericin B. <sup>b</sup>cDNA levels were calculated relative to average levels of cDNA obtained in the absence of fluconazole. The cDNA levels of the different genes were normalized using the *ACT1* gene.

**A****B**

**Figure 1** .Effect of fluconazole (14 mg/kg) during infection of larvae with  $10^6$  cells of *C. parapsilosis* susceptible strain ATCC 22019 per larvae (A) and  $10^6$  cells of *C. parapsilosis* resistant strain LEMI 8657 per larvae (B).



**Figure 2.** Effect of antifungal treatment on fungal burden in *G. mellonella* infected with *C. parapsilosis* ATCC 22019 or LEMI 8657. White bars, no treatment; black bars, fluconazole treatment (14 mg/kg). \*  $p < 0.05$ .

## 6. CONCLUSÕES

1. Verificar as informações de resistência obtidas pelo método automatizado das amostras de *Candida parapsilosis* obtidas a partir de hemoculturas.

Nossa hipótese inicial de aumento de incidência de candidemia por *Candida parapsilosis* foi confirmada.

A hipótese dessas cepas de *Candida parapsilosis* estarem manifestando um inusitado padrão de resistência ao fluconazol a partir dos dados obtidos pelo aparelho Vitek 2 usado no hospital, foi também confirmada após testagem pelo método microdiluição em caldo, realizado no Laboratório Especial de Micologia da UNIFESP.

2. Caracterizar por técnica de biologia molecular as espécies identificadas como *Candida parapsilosis*.

As cepas de *Candida parapsilosis* enviadas ao LEMI confirmaram pertencer ao *complexo parapsilosis*, sendo principalmente identificadas molecularmente como *Candida parapsilosis* a exceção de uma *Candida metapsilosis*.

3. Identificar os mecanismos de resistência envolvidos nas cepas de *Candida parapsilosis*.

As *Candida parapsilosis* que eram resistentes ao fluconazol tiveram o seu gene ERG 11 sequenciado, a qual revelou mutação em dois nucleotídeos uma silenciosa - T591C e outra - Y132F conduziu à substituição de um aminoácido e alteração do sequenciamento da proteína gerada. A presença do fluconazol provocou a superexpressão do gene ERG 11, gene este relacionado a resistência ao fluconazol.

Larvas de *G. mellonella* foram inoculadas com as *Candida parapsilosis* resistentes ao fluconazol e a seguir receberam fluconazol. A morte das larvas e sobrevivência dos controles confirmou a falta de resposta clínica do fluconazol nas cepas do estudo.

4. Avaliar os riscos associados para aquisição de *Candida parapsilosis* resistente ao fluconazol - CPRF.

Análise univariada identificou como fatores associados à infecção por CPRF - diabetes melito ( $p = 0.002$ ) e nutrição parenteral ( $p = 0.054$ ). Após análise multivariada apenas diabetes melito permaneceu como fator associado independente ( $p = 0.001$  OR 1.3 - 3.5).

O uso prévio de fluconazol não esteve associado à infecção por CPRF.

5. Elencar algumas variáveis de desfecho da infecção por *Candida parapsilosis*.

As taxas de mortalidade global aos 30 dias do diagnóstico foram 45,2% para todos os pacientes (27/42), 43,5% (10/23) no grupo CPRF e 47,4% (9/19) no grupo *Candida parapsilosis* sensível ao fluconazol ( $p = 0.8$ ). Anfotericina lipossomal foi a opção terapêutica mais empregada para o tratamento de paciente infectados por CPRF (12/23).



## 7. REFERÊNCIAS

1. Pappas PG. Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North Am.* 2006;20(3):485–506.
2. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Calandra TF, Edwards JE, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2009;48(5):503–35.
3. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis.* 2004;39(3):309–17.
4. Heimann SM, Cornely OA, Wisplinghoff H, Kochanek M, Stippel D, Padosch SA, et al. Candidemia in the intensive care unit: analysis of direct treatment costs and clinical outcome in patients treated with echinocandins or fluconazole. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2015;34(2):331–8.
5. Falagas ME, Apostolou KE, Pappas VD. Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* julho de 2006;25(7):419–25.
6. Colombo AL, Thompson L, Graybill JR. The north and south of candidemia: Issues for Latin America. *Drugs Today Barc Spain* 1998. 2008;44 Suppl A:1–34.
7. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(1):133–63.
8. Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag.* 2014;10:95–105.
9. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PloS One.* 2013;8(3):e59373.
10. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol.* 2006;44(8):2816–23.
11. Moretti ML, Trabasso P, Lyra L, Fagnani R, Resende MR, de Oliveira Cardoso LG, et al. Is the incidence of candidemia caused by *Candida glabrata* increasing in Brazil? five-year surveillance of candida bloodstream infection in a university reference hospital in southeast Brazil. *Med Mycol.* 2013;51(3):225–30.
12. Agrawal C, Biswas D, Gupta A, Chauhan BS. Antibiotic Overuse as a Risk Factor for Candidemia in an Indian Pediatric ICU. *Indian J Pediatr.* 2014; 82(6):530-6

13. Ahmed A, Azim A, Baronia AK, Marak KRSK, Gurjar M. Risk prediction for invasive candidiasis. *Indian J Crit Care Med Peer-Rev Off Publ Indian Soc Crit Care Med*. 2014;18(10):682–8.
14. Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R. Candida colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg*. 1994;220(6):751–8.
15. Paphitou NI, Ostrosky-Zeichner L, Rex JH. Rules for identifying patients at increased risk for candidal infections in the surgical intensive care unit: approach to developing practical criteria for systematic use in antifungal prophylaxis trials. *Med Mycol*. 2005;43(3):235–43.
16. Ostrosky-Zeichner L, Sable C, Sobel J, Alexander BD, Donowitz G, Kan V, et al. Multicenter retrospective development and validation of a clinical prediction rule for nosocomial invasive candidiasis in the intensive care setting. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2007;26(4):271–6.
17. Ostrosky-Zeichner L, Pappas PG, Shoham S, Reboli A, Barron MA, Sims C, et al. Improvement of a clinical prediction rule for clinical trials on prophylaxis for invasive candidiasis in the intensive care unit. *Mycoses*. 2011;54(1):46–51.
18. León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Almirante B, Nolla-Salas J, Alvarez-Lerma F, et al. A bedside scoring system (“Candida score”) for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with Candida colonization. *Crit Care Med*. 2006;34(3):730–7.
19. Pfaller MA, Diekema DJ, for the International Fungal Surveillance Participant Group. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of Candida. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10:11–23.
20. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, et al. Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4):1366–77.
21. Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, Horn DL, Reboli AC, Rotstein C, et al. Epidemiology and Outcomes of Invasive Candidiasis Due to Non-albicans Species of Candida in 2,496 Patients: Data from the prospective antifungal therapy (PATH) registry 2004–2008. *PLoS ONE [Internet]*. 2014;9(7).
22. Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ. Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. 2010;14(11):e954–66.
23. Hinrichsen SL, Falcão E, Vilella TAS, Colombo AL, Nucci M, Moura L, et al. [Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(4):394–8.

24. Morii D, Seki M, Binongo JN, Ban R, Kobayashi A, Sata M, et al. Distribution of *Candida* species isolated from blood cultures in hospitals in Osaka, Japan. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother*. 2014;20(9):558–62.
25. Colombo AL, Guimarães T, Silva LRBF, de Almeida Monfardini LP, Cunha AKB, Rady P, et al. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007;28(5):570–6.
26. Morgan J. Global trends in candidemia: review of reports from 1995-2005. *Curr Infect Dis Rep*. 2005;7(6):429–39.
27. Rex JH, Bennett JE, Sugar AM, Pappas PG, van der Horst CM, Edwards JE, et al. A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patients without neutropenia. *Candidemia Study Group and the National Institute*. *N Engl J Med*. 1994;331(20):1325–30.
28. Rex JH, Pappas PG, Karchmer AW, Sobel J, Edwards JE, Hadley S, et al. A randomized and blinded multicenter trial of high-dose fluconazole plus placebo versus fluconazole plus amphotericin B as therapy for candidemia and its consequences in nonneutropenic subjects. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2003;36(10):1221–8.
29. Pfaller MA, Diekema DJ, Sheehan DJ. Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(2):435–47.
30. Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Pfaller MA, Rinaldi M, Rodriguez-Tudela JL, et al. International and Multicenter Comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 Broth Microdilution Methods for Testing Susceptibilities of *Candida* spp. to Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole. *J Clin Microbiol*. 2005;43(8):3884–9.
31. Walsh TJ. Echinocandins--an advance in the primary treatment of invasive candidiasis. *N Engl J Med*. 2002;347(25):2070–2.
32. Bennett JE. Echinocandins for candidemia in adults without neutropenia. *N Engl J Med*. 2006;355(11):1154–9.
33. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Calandra TF, Edwards JE, et al. Clinical Practice Guidelines for the Management Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009;48(5):503–35.
34. Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD, Jiménez-Ortigosa C, Catania J, Booker R, et al. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2013;56(12):1724–32.
35. Lortholary O, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, Fontanet A, Bretagne S, Dromer F. Recent Exposure to Caspofungin or Fluconazole Influences the Epidemiology of

- Candidemia: a Prospective Multicenter Study Involving 2,441 Patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(2):532–8.
36. Andes DR, Safdar N, Baddley JW, Playford G, Reboli AC, Rex JH, et al. Impact of Treatment Strategy on Outcomes in Patients with Candidemia and Other Forms of Invasive Candidiasis: A Patient-Level Quantitative Review of Randomized Trials. *Clin Infect Dis.* 2012;54(8):1110–22.
  37. Fernández-Ruiz M, Aguado JM, Almirante B, Lora-Pablos D, Padilla B, Puig-Asensio M, et al. Initial Use of Echinocandins Does Not Negatively Influence Outcome in *Candida parapsilosis* Bloodstream Infection: A Propensity Score Analysis. *Clin Infect Dis.* 2014;ciu158.
  38. Ito JI, Hooshmand-Rad R. Treatment of *Candida* Infections with Amphotericin B Lipid Complex. *Clin Infect Dis.* 2005;40(Supplement 6):S384–91.
  39. Brajtburg J, Powderly WG, Kobayashi GS, Medoff G. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34(2):183–8.
  40. Clinical and Laboratory Standards Institute. (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Third Edition [Internet]. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute.; 2008. Recuperado de: <http://clsi.org/>
  41. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 1994;32(8):1923–9.
  42. XXI ALAM [Internet]. Recuperado de: <http://www.sbmicrobiologia.org.br/cdlatino/resumos/R1177-1.html>
  43. Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Sheehan D, CLSI Subcommittee for Antifungal Susceptibility Testing. 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 Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother.* 2010;13(6):180–95.
  44. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informational supplement; 2012.
  45. Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med.* janeiro de 2012;125(1 Suppl):S3–13.
  46. MacCallum DM, Coste A, Ischer F, Jacobsen MD, Odds FC, Sanglard D. Genetic dissection of azole resistance mechanisms in *Candida albicans* and their validation in a mouse model of disseminated infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(4):1476–83.

47. Minea B, Nastasa V, Moraru RF, Kolecka A, Flonta MM, Marincu I, et al. Species distribution and susceptibility profile to fluconazole, voriconazole and MXP-4509 of 551 clinical yeast isolates from a Romanian multi-centre study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2015;34(2):367–83.
48. Arendrup MC, Dzajic E, Jensen RH, Johansen HK, Kjældgaard P, Knudsen JD, et al. Epidemiological changes with potential implication for antifungal prescription recommendations for fungaemia: data from a nationwide fungaemia surveillance programme. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(8):E343–53.
49. Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Clin Infect Dis*. 2008;46(1):120–8.
50. Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Stein B, Hollick R, Lockhart SR, et al. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008-2011. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2012;55(10):1352–61.
51. Garnacho-Montero J, Díaz-Martín A, García-Cabrera E, Ruiz Pérez de Pipaón M, Hernández-Caballero C, Aznar-Martín J, et al. Risk factors for fluconazole-resistant candidemia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(8):3149–54.
52. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. *PLoS ONE [Internet]*. 2013 [citado 31 de maio de 2015];8(3). Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3601956/>
53. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(4):606–25.
54. Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, Garbino J, Kullberg BJ, Lortholary O, et al. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:19–37.
55. Colombo AL, Guimarães T, Camargo LFA, Richtmann R, de Queiroz-Telles F, Salles MJC, et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis – a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Braz J Infect Dis*. 2013;17(3):283–312.
56. Barros AJ, Hirakata VN. Alternatives for logistic regression in cross-sectional studies: an empirical comparison of models that directly estimate the prevalence ratio. *BMC Med Res Methodol*. 2003;3(1):21.

## 8. ANEXOS

## 8.1. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



Ministério da Saúde  
Conselho Nacional de Saúde  
Comissão de Ética em Pesquisa – CEP

### PARECER

Registro CEP: 73/2011

**Projeto de pesquisa:** “Caracterização e avaliação dos fatores de risco para aquisição de Candida parapsilosis resistente a fluconazol em um hospital de Brasília”

**Protocolo:** “Estudo observacional prospectivo”

**Pesquisador Responsável:** Henrique Marconi Sampaio Pinhati

**Instituição:** Hospital Santa Luzia

**CEP de origem:**

**Área Temática Especial:** grupo III

**Patrocinador:** não há

### Local de realização

Estudo a ser realizado em hospital da rede particular do DF.

### Objetivos

- Descrever padrão de resistência de amostras de cândida obtidas a partir de hemoculturas;
- Caracterizar com maior acurácia as espécies identificadas como cândida parapsilosis através dos métodos de biologia molecular;
- Elencar fatores de risco para aquisição de cândida papasilosis resisntente ao fluconazol.

### Apresentação do protocolo

A Folha de Rosto está corretamente preenchida.

O currículo do pesquisador responsável, constante no processo e acessado pela Plataforma Lattes está de acordo com a proposta da pesquisa

O orçamento do estudo não foi apresentado e portanto caracteriza uma pendência maior.

A metodologia é adequada aos objetivos do estudo mas pode ter variáveis em resultado pois algumas etapas dependerá da ação de terceiros tais como o cumprimento de rotina para coleta de culturas.

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Como trata-se de pesquisa epidemiológica sem intervenção clínica ou contato paciente e médico responsável, apenas com amostra sanguínea, o TCLE fica dispensado pois pode interferir no resultado do trabalho se considerarmos apenas os indivíduos que querem ser incluídos na pesquisa.

---

SHLS 716 Conj E Lote 5 CEP 70390-903 – Brasília/DF Tel.: (61) 3445-6369

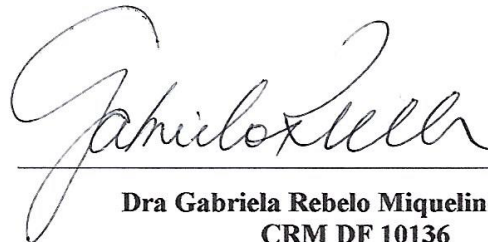
E-mail c.estudos@hsl.com.br

  
HOSPITAL SANTA LUZIA S/A  
Comitê de Ética em Pesquisa  
CEP

Diante do exposto e das novas análises realizadas, a Comissão de Ética em Pesquisa – CEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, ressaltando a necessidade de inclusão do orçamento e responsável pelo custeio.

Situação: **Protocolo Aprovado com recomendação.**

Brasília, 30 de Janeiro de 2012.



HOSPITAL SANTA LUZIA S/A  
Comitê de Ética em Pesquisa  
CEP

**Dra Gabriela Rebelo Miquelino Cunha**  
CRM DF 10136  
Coordenador do CEP - Hospital Santa Luzia



## 8.2. RESULTADOS NÃO PUBLICADOS NOS ARTIGOS

Tabela 2 distribuição das cândidas identificadas, idade média e percentagem de resistência ao Fluconazol

<i>Espécie</i>	<i>n=42 (100%)</i>	<i>Idade média</i>	<i>CIM ≥16mg/L n (%)</i>
<i>C. parapsilosis</i>	30 (71,4%)	69	23 (76,67%)
<i>C. albicans</i>	9 (21,4%)	71	0 (0%)
<i>C. glabrata</i>	2 (4,8%)	61	- *
<i>C. tropicalis</i>	1 (2,4%)	85	0 (0%)

\* *C. glabrata* é considerada virtualmente resistente ao fluconazol

Durante o período 42 episódios de candidemia foram identificados.

A incidência nos 9 meses foi 4,05 por 1000 admissões.

95,2% das culturas positivas foram oriundas da UTI.

Quatorze isolados de *C. parapsilosis* foram recuperados e enviados ao LEMI, todos confirmaram ser *C. parapsilosis sensu stricto*, exceto um identificado como *C. metapsilosis*.

Tabela 3 Comparação entre os valores de CIM obtidas pelo VITEK 2 e pela microdiluição em Caldo (MDC) das 14 amostras de *C. parapsilosis* testadas no LEMI.

<i>Registro</i>	<i>CIM VITEK 2</i>	<i>CIM - MDC</i>	<i>Complexo parapsilosis</i>
1010	1	16	<i>C. metapsilosis</i>
710	8	8	<i>C. parapsilosis</i>
712	8	0,5	<i>C. parapsilosis</i>
1110	16	16	<i>C. parapsilosis</i>
1210	16	0,25	<i>C. parapsilosis</i>
408	16	4	<i>C. parapsilosis</i>
602	16	8	<i>C. parapsilosis</i>
702	16	8	<i>C. parapsilosis</i>
810	16	1	<i>C. parapsilosis</i>
812	16	16	<i>C. parapsilosis</i>
910	16	16	<i>C. parapsilosis</i>
409	64	8	<i>C. parapsilosis</i>
502	64	16	<i>C. parapsilosis</i>
902	64	8	<i>C. parapsilosis</i>
Mediana	16	8	

Concordância categórica 72% (concordância entre os métodos entre cepas R ou SDD).

Duas cepas originalmente consideradas S foram identificadas como R pelo MDC.

Nenhuma cepa foi resistente para anidulafungina ou anfotericina.

Tabela 4 Fatores de Risco para infecção por *Candida parapsilosis* resistente ao fluconazol (teste do Qui Quadrado e teste exato de Fisher)

Fator de risco	<i>C. parapsilosis</i> <i>fluco-R</i> (n=23)	<i>Demais</i> <i>candidas</i> (n=19)	<i>p</i>	<i>OR</i>	<i>CI</i>
<b>No (%) pacientes com as seguintes patologias</b>					
Neoplasia	6(26,1)	2(10,5)	0,26		
Doença pulmonar	10(43,5)	11(57,9)	0,352		
Doença cardíaca	6(26,1)	3(15,8)	0,666		
<b>Diabetes</b>	<b>11(47,8)</b>	<b>2(10,5)</b>	<b>0,023</b>	<b>7,8</b>	<b>1,5-41,7</b>
Insuficiência renal	4(17,4)	3(15,8)	1,000		
<b>No (%) pacientes submetidos aos seguintes procedimentos</b>					
Hemofiltração	3(13)	1(5,3)	0,613		
Procedimento cirúrgico prévio	13(56,5)	10(52,6)	0,801		
Internação prévia	5(20)	7(41,2)	0,136		
V. mecânica	16(69,5)	14(73,7)	0,804		
<b>Nutrição parenteral total</b>	<b>7(30,4)</b>	<b>1(5,3)</b>	<b>0,054</b>		
<b>No (%) pacientes receberam previamente os seguintes tratamentos</b>					
O uso de mais de dois antibióticos	12(52,2)	8(42,1)	0,623		
Uso de corticosteroides	8(34,8)	7(36,9)	0,975		
Uso prévio de antifúngicos	8(34,8)	3(15,8)	0,259		
Uso prévio de fluconazol	5(21,7)	3(15,8)	0,870		
<b>No (%) de pacientes com a cultura da ponta do cateter positiva para candida</b>	<b>4(17,4)</b>	<b>3(15,8)</b>	<b>1,000</b>		

Após análise multivariada e somente diabetes permaneceu como fator associado ( $p = 0.001$  OR 1.3 - 3.5).

A mortalidade global por candidemia em 30 dias foi 45,2% (19/42), 47.4% (9/19) para o grupo FSC e 43.5% (10/23) para o grupo FRCP ( $p = 0.8$ )

Anfotericina lipossomal foi a principal opção terapêutica para o grupo FRCP (12/23)

Tabela 5 - Fatores de Risco para infecção por *Candida parapsilosis* resistente ao fluconazol (teste do t student e Mann-Whitney)

Variável (n)	<i>C. parapsilosis</i>	<i>Demais</i>	<i>p</i>
	<i>fluco-R</i> ( <i>n</i> =23)	<i>candidas</i> ( <i>n</i> =19)	
Idade – mediana (p25;p75)	70 (55;82)	77 (61;85)	0,53
Tempo entre a internação e a primeira hemocultura positiva (dias) - mediana (p25;p75)	22 (15;40)	25 (17;52)	0,22
Apache II - mediana (p25;p75)	14 (7;19)	16 (14;21)	0,43

Tabela 6 Variáveis de desfecho para os grupos de pacientes com infecção por *Candida parapsilosis* resistente e sensível ao fluconazol (teste do Qui Quadrado e teste exato de Fisher)

Desfecho	<i>C. parapsilosis</i> <i>fluco-R</i> (n=23)	<i>Demais</i> <i>candidas</i> (n=19)	<i>p</i>	<i>OR</i>	<i>CI</i>
<b>No (%) pacientes submetidos aos seguintes desfechos</b>					
Necessidade do emprego de drogas vasoativas	10(43,5)	9(47,4)	0,650		
Recebeu tratamento antifúngico	12(52,2)	15(78,9)	0,139		
Tratamento primário com Ambissome (n=27)	n=12 6(50)	n=15 0(0)	0,03	0,29	0,16-0,56
Óbito durante a internação	13(56,5)	14(73,7)	0,248		
Sobreviveu 30 após diagnóstico da candidemia	13(56,5)	10(52,6)	0,801		

Tabela 7 Fatores de Risco para infecção por cândida resistente ao fluconazol (teste do Qui Quadrado e teste exato de Fisher)

Fator de risco	<i>Fluconazol-S</i> (n=17)	<i>Fluconazol-R</i> (n=25)	<i>p</i>	<i>OR</i>	<i>CI</i>
<b>No (%) pacientes com as seguintes patologias</b>					
Neoplasia	1(5,9)	7(28)	0,078		
Doença pulmonar	10(58,8)	11(44)	0,346		
Doença cardíaca	3(17,7)	6(24)	0,913		
Diabetes	2(11,8)	11(44)	0,060		
Insuficiência renal	3(17,7)	4(16)	0,888		
<b>No (%) pacientes submetidos aos seguintes procedimentos</b>					
Hemofiltração	1(5,9)	3(12)	0,462		
Procedimento cirúrgico prévio	9(52,9)	14(56)	0,845		
Internação prévia	7(41,2)	5(20)	0,136		
V. mecânica	13(76,5)	17(68)	0,804		
Nutrição parenteral total	1(5,9)	7(28)	0,078		
<b>No (%) pacientes receberam previamente os seguintes tratamentos</b>					
O uso de mais de dois antibióticos	7(41,2)	13(52)	0,606		
Uso de corticosteroides	7(41,2)	8(32)	0,607		
Uso prévio de antifúngicos	3(17,7)	8(32)	0,448		
Uso prévio de fluconazol	3(17,7)	5(20)	1,000		
No (%) de pacientes com a cultura da ponta do cateter positiva para candida	3(17,7)	4(16)	0,865		

Tabela 8 - Fatores de Risco para infecção por cândida resistente ao fluconazol (teste do t student e Mann-Whitney)

Variável (n)	<i>Fluconazol-S</i> (n=17)	<i>Fluconazol-R</i> (n=25)	<i>p</i>
Idade – mediana (p25;p75)	77 (66;86)	69 (57;81)	0,777
Tempo entre a internação e a primeira hemocultura positiva (dias) - mediana (p25;p75)	16 (15;20)	14 (7;20)	0,63
Apache II - mediana (p25;p75)	25 (17;47)	22 (15;42)	0,127

### 8.3. FICHA CLÍNICA DE CANDIDEMIA

#### 1) INFORMAÇÕES DEMOGRÁFICAS

Rec \_\_\_\_\_ (deixar esse espaço em branco)

Número do Paciente \_\_\_\_\_

#### Raça

- Branco
- Negro
- Mulato
- Asiático
- Índio
- Outro
- Desconhecido

Idade (anos) \_\_\_\_\_

Idade (meses) \_\_\_\_\_

Idade (dias) \_\_\_\_\_

#### Gênero

- Masculino
- Feminino

#### 2) INFORMAÇÕES MICROBIOLÓGICAS

Data da candidemia incidente \_\_\_\_\_ dd.mm.aaaa

Espécie identificada no centro \_\_\_\_\_ Fonte da Hemocultura

- Veia Periférica
- Cateter
- Ambos
- Desconhecido

**Até 14 dias ANTES da candidemia incidente, o paciente tinha:**

**Bacteremia**

- Não  Desconhecido
- No mesmo dia da candidemia incidente
- Antes da candidemia incidente

**Se o paciente teve bacteremia, informar:**

- S aureus  Coag. Neg. Staph
- Enterococcus  Outro Gram-positivo
- E coli  P aeruginosa
- Klebsiella sp.  Outro Gram-negativo
- Anaeróbio

**Nos 30 dias APÓS a candidemia, o paciente teve:**

Outra hemocultura Segunda cultura positiva para Candida:

- Não \_\_\_\_\_
- Sim
- Desconhecido

**Data da 2ª hemocultura positiva para Candida:\_\_\_\_\_ dd.mm.aaaa**

**3ª hemocultura positiva para Candida:\_\_\_\_\_**

**Data da 3ª hemocultura positiva para Candida:\_\_\_\_\_ dd.mm.aaaa**

**4ª hemocultura positiva para Candida:\_\_\_\_\_**

**Data da 4ª hemocultura positiva para Candida:\_\_\_\_\_ dd.mm.aaaa**

### **3 – INFORMAÇÃO DA HOSPITALIZAÇÃO**

**No momento que a cultura incidente foi obtida, o paciente estava:**



**Hospitalizado**                      **Data da Admissão** \_\_\_\_\_ **dd.mm.aaaa**

- Não
- Sim
- Desconhecido

**Ala Hospitalar**

- Clínica
- Cirúrgica
- Pediátrica
- Ginecologia/Obstetria
- Unidade de Terapia Intensiva (UTI)
- Emergência
- Outra \_\_\_\_\_

**Se fora do hospital, marque:**

**Local Fora do Hospital**

- Clínica Diária       Diálise
- Clínica HIV         Emergência
- Outra \_\_\_\_\_

**Se o paciente estava na UTI, marque:**

**Tipo de UTI**

- Cardíaca
- Clínica
- Cirúrgica
- Geral
- Neonatal
- Pediátrica

Outra \_\_\_\_\_

**48h antes da candidemia incidente o paciente estava:**

**Outra Ala**

- Não
- Clínica
- Cirúrgica
- Pediátrica
- Ginecologia/Obstetria
- UTI
- Emergência
- 

**Another ward**

No  
Medical  
Surgical  
Pediatrics  
Gynecology/Obstetrics  
ICU  
Emergency

**Type of ICU 48 h before**

Cardiac  
Medical  
Surgical  
General  
Neonatal  
Pediatrics  
Unknown

**Transferred from other hospital**

No  
Yes  
Unknown  
dd.mm.yyyy  
Other

**If the patient was in the ICU, mark**

**If outpatient, mark**

**48 h before the incident candidemia, was the patient in**

Other

**If the other ward was ICU, mark**

**In the 72 hours before the incident candidemia, was the patient**

Other

**Cancer**

No  
Hematologic malignancy  
Solid tumor  
Unknown

**Transplant**

No  
Kidney  
Heart  
Lung  
Liver  
Pancreas  
Autologous HSCT  
Allogeneic HSCT  
Other

**Other transplant**

**GVHD**

No HSCT  
Acute grade I  
Acute grade II  
Acute grade III  
Acute grade IV  
Acute, grade unknown

Chronic limited  
Chronic extensive  
Chronic, unknow

**HIV**

No  
Yes  
Unknown

**AIDS**

No HIV  
Yes  
Unknown

**Cardiac disease**

No  
Yes  
Unknown

**Lung disease**

No  
Yes  
Unknown

**Liver disease**

No  
Yes  
Unknown

**Chirrosis**

No  
Yes  
Unknown

**PAST MEDICAL HISTORY**

**(3 months before candidemia)**

**Hematologic malignancy**

AML ALL Acute leukemia, other  
CML CLL Non-Hodgkin's lymphoma  
Hodgkin's lymphoma Multiple myeloma Other

**Solid tumor**

Melanoma Head and neck Lung  
Gastrointestinal Liver Pancreas  
Renal Adrenal Bladder  
Breast Ovaries, uterus CNS  
Other

**Diabetes**

No  
Yes  
Unknown

**Insulin use**

No  
Yes  
Unknown

**Renal failure**

No  
Yes  
Unknown

**Chronic renal failure**

No  
Yes  
Unknown

**Chronic dialysis**

No  
Yes  
Unknown

**Autoimmune disease**

No  
Yes  
Unknown

**Neurologic disease**

No  
Yes  
Unknown

**Surgery**

No  
Abdominal  
Cardioracic  
Genitourinary  
Gynecologic  
Neurologic  
Orthopedic  
Trauma  
Vascular  
Unknown

**Surgery 2**

No  
Abdominal  
Cardioracic  
Genitourinary  
Gynecologic  
Neurologic  
Orthopedic  
Trauma  
Vascular  
Unknown

**Mucositis**

No  
Yes  
Unknown

**Neutropenia**

No  
Yes

Unknown

**Prolonged neutropenia**

No

Yes

Unknown

**Profound neutropenia**

No

Yes

Unknown

**Previous admission**

No

Yes

Unknown

**Dermatitis**

No

Yes

Unknown

**Mechanical ventilation**

No

Yes

Unknown

**Days on mechanical ventilation**

**Parenteral nutrition**

No

TPN

Partial nutrition

Lipid

Unknown

**Days on parenteral nutrition**

**Dialysis**

No

Hemodialysis

Peritoneal

Unknown

**Hemofiltration**

No

Yes

Unknown

**Days on dialysis**

**Months on dialysis**

**Neutropenia**

No

Yes

Unknown

**Profound neutropenia**

No

Yes

Unknown

**Date neutrophils <100**

**Date neutrophils >100**

**Did not reach >100**

Yes

Unknown

**Data neutrophils <500**

**Date neutrophils >500**

**Did not reach >500**

Yes

Unknown

**Apache II Karnofsky**

weeks

dd.mm.yyyy

**RISK FACTORS**

**SEVERITY OF ILLNESS**

**Hypotension**

No

Yes

Unknown

**Vasoactive drug**

No

Yes

Unknown

**Fever**

No

Yes

Unknown

**Highest temperature**

**Cateter 1**

No

CVC jugular

CVC subclavian

CVC femoral

PICC

CVC tunneled

Arterial

Umbilical

Unknown

Other

**Date insertion of catheter 1**

**Date removal of catheter 1**

**Catheter 1 not removed until day 30 of incident candidemia**

**Blood culture was taken from the catheter?**

No

Yes

Unknown

**Was the catheter removed BECAUSE of candidemia?**

No

Yes

Unknown

**Catheter 2**

No

CVC jugular

CVC subclavian

CVC femoral

PICC

CVC tunneled

Arterial

Umbilical

Unknown

Other

**Date insertion catheter 2**

**CATHETER INFORMATION (24 h before incident candidemia)**

dd.mm.yyyy

**Date removal catheter 2**

dd.mm.yyyy

**Apache II at entry in the ICU**

**Catheter tip culture?**

Negative

Positive

Not performed

**If positive, write Candida species**

Unknown

**Catheter 2 not removed until day 30 of incident candidemia**

**Blood culture taken from catheter 2?**

No

Yes

Unknown

**Catheter 2 removed BECAUSE of candidemia?**

No

Yes

Unknown

**Were there more than 2 catheters?**

No

Yes

Unknown

**Antibiotic**

No

1 - 2

3 - 4

5 - 6

7 or more

Unknown

**Corticosteroids**

No

Yes

Unknown

**Other immunosuppressive drug**

No

Yes

Unknown

**Chemotherapy**

No

Yes

Unknown

**Anti-retroviral**

No

Yes

Unknown

**H2 blocker**

No

Yes

Unknown

**Previous antifungal**

No

Yes

Unknown

**Reason for using previous antifungal**

Prophylactic or empiric

Treatment of other fungal infection

Unknown

**What previous antifungal? ▼ □**

**Date of start of previous antifungal**

Write "1" if catheter was not removed

**MEDICATION HISTORY (14 days before candidemia)**

dd.mm.yyyy

**Date of discontinuation of previous antifungal** dd.mm.yyyy

**Treatment**

**Date of start of treatment**

**Date of last dose of treatment**

**Treatment 2**

**Date first dose of treatment 2**

**Date last dose of treatment 2**

**Treatment 3**

**Date first dose treatment 3**

**Date last dose treatment 3**

**Date start of treatment**

**Date end of treatment**

**Deep seated infection**

No

Yes



Unknown

**Local of deep-seated infection**

**Other local of deep seated infection**

**Other (3) local of deep seated inf.**

**TREATMENT OF CANDIDEMIA**

dd.mm.yyyy

dd.mm.yyyy

**If the patient received another drug for the treatment of the incident candidemia, what was**

dd.mm.yyyy

dd.mm.yyyy

dd.mm.yyyy

dd.mm.yyyy

**Indicate below the date of the FIRST DOSE of ANY antifungal drug used for the TREATMENT of the incident candidemia**

dd.mm.yyyy

**Indicate below the date of the LAST DOSE of ANY antifungal drug used for the TREATMENT of the incident candidemia**

dd.mm.yyyy

**OUTCOME**

**CHARACTERIZATION OF THERAPEUTIC FAILURE**

**Cumulative dose of corticosteroids until 30 days after incident candidemia**

mg (pred equivalent)

**Receipt of TNF blocker after incident candidemia**

No

Yes

**Dilated fundoscopy**

Not performed

Normal

Abnormal

**If abnormal, describe**

**Echocardiography**

Not performed

Negative

Endocarditis

**If abnormal, inform what valve was involved**

**Abdominal image**

Not performed      Ultrasound

CT      Both

Other image

**Image consistent with invasive candidiasis?**

No

Yes

**If iamge,**

**Skin lesion with positive biopsy for invasive candidiasis?**

No

Yes

**During treatment for candidemia and until 30 days after incident candidemia**

**Procedure**

Surgery

New dialysis

New total parenteral nutrition

Placement of foreign material

**(mark all that apply)**

**In your opinion what was the**

**Reason for failure**

Inadequate drug

Inadequate dose

Inadequate route

Inadequate duration of treatment

Host factors

Presence of foreign body

**(mark all that apply)**

Presence of remote

focus of infection

Other

**Was the patient submitted to any**

**Did the patient develop a**

**NEW neutropenia**

No

Yes

**By day 14 of candidemia,**

**did the patient receive**

**Antibiotics**

Anti-anaerobe

Anti-pseudomonas

Other beta-lactam

Glicopeptide

Other anti-Gram-positive

**Discharge**

Never admitted

Not discharged

Yes

Unknown

**Transferred to other center**

Never admitted

Not transferred

Yes

Unknown

**Death**

No

Yes

Unknown

**Date of last follow up**

**Survived 30 days**

No

Yes

Unknown

**Date of death**

**Autopsy**

No

Yes

Unknown

**Organ involvement by Candida?**

No

Yes

Unknown

**Site candidiasis**

**Death due to candidemia**

No

Yes

Unknown

**Name of the investigator who filled this case report form**

**Final comments**

**Date of data entry**

dd.mm.yyyy

dd.mm.yyyy

dd.mm.yyyy

**If organ involvement (documented by autopsy), sites:**

Numero do paciente

Data da 1a hemocultura positiva

Num. do isolado no hospital

Numero do isolado 1

Data da 2a hemocultura positiva

Num. do isolado 2 no hospital

Numero do isolado 2

Data da 3a hemocultura positiva

Num. do isolado 3 no hospital

Numero do isolado 3

Data da 4a hemocultura positiva

**DO NOT FILL THIS FIELDS. GO DIRECTLY TO "SEND ANSWERS" AND CLICK TO SEND**

**THE CASE REPORT FORM**

Status da ficha

Checada

Não checada

Completa

Comentários finais: