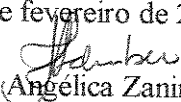


PATRÍCIA CONCEIÇÃO ALVES

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas do(a) aluno(a) **Patrícia Conceição Alves Ferreira**.
Campinas, 03 de fevereiro de 2005.

+
Prof(a). Dr(a). 
Orientador(a)

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE TESTES DE
SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS PELOS MÉTODOS
NCCLS E EUCAST DE LEVEDURAS DO GÊNERO *CANDIDA***

Campinas

2004

PATRÍCIA CONCEIÇÃO ALVES

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE TESTES DE
SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS PELOS MÉTODOS
NCCLS E EUCAST DE LEVEDURAS DO GÊNERO *CANDIDA***

*Dissertação apresentada à Comissão de Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas, para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências Médicas, na Área de Ciências Biomédicas.*

ORIENTADORA: Profa.Dra. Angélica Zaninelli Schreiber

Campinas

2004

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	AL87a
V	EX
TOMBO BC/	63719
PROC.	16.P.00086.05
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	13/05/05
Nº CPD	8 de 1350211

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Al87a Alves, Patrícia Conceição
Avaliação comparativa de testes de suscetibilidade a antifúngicos pelos métodos NCCLS e EUCAST de leveduras do gênero *Candida* / Patrícia Conceição Alves. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

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

1. Epidemiologia. 2. Imunossupressão. 3. Infecções oportunistas.
4. Espectrofotometria. 5. Análise estatística. 6. Candidíase. I. Schreiber, Angélica Zaninelli. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a).

Angélica Zaninelli Schreiber

Membros:

1. Angélica Zaninelli Schreiber

2. Maria Magali R. S. Soares

3. Maria Luiza Moretti

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 03/02/2005

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Sergio e Iria, pelo apoio, carinho e dedicação.
A minha avó, Nilda, pelo grande incentivo em iniciar este trabalho.
Ao meu esposo, Edson, pela compreensão, ajuda e apoio.*

A Profa.Dra. Angélica Zaninelli Schreiber pela oportunidade e credibilidade.

A Todos funcionários do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica do HC-UNICAMP em especial à Luzia Lyra e Edson Luz.

A todos funcionários do setor de estatística da UNICAMP.

Aos colegas de Pós-graduação, Valéria e Ana Beatriz.

A Dra. Marília, pela contribuição dada.

A Profa.Dra. Maria Magali S. R. Soares

Aos colegas de profissão, pela compreensão e incentivo, em especial para Dr. Atílio Andreguetto.

Aos sinceros amigos, pela presença constante, Andréa Guimarães e Claudia Bueno.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

*“Quando uma criatura desperta para um grande sonho e sobre
ele lança toda sua alma, todo universo conspira a seu favor”.*

Goethe

	Pág.
RESUMO	<i>xiv</i>
ABSTRACT	<i>xvii</i>
1-INTRODUÇÃO	20
1.1- Considerações gerais sobre os fungos	21
1.2- Aspectos Clínicos e epidemiológicos	22
1.3- Terapêutica de infecções por leveduras	22
1.4- Testes de suscetibilidade a antifúngicos	24
1.4.1- O método padronizado pelo NCCLS.....	25
1.4.1.1- Inóculo.....	25
1.4.1.2- Meio de cultura.....	26
1.4.1.3- Temperatura e tempo de incubação.....	26
1.4.1.4- Solubilidade da droga.....	26
1.4.1.5- Degradação da droga.....	27
1.4.1.6- Procedimentos de leitura.....	27
1.4.1.7- Determinação do ponto final.....	28
1.4.2- O método preconizado pelo EUCAST.....	28
1.5- Correlação “in vivo” e “in vitro”	29
2- OBJETIVOS	32
3- MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1- Estudo retrospectivo	35
3.2- Microrganismo	35

3.3- Cálculo do tamanho amostral para proporção.....	35
3.4- Manutenção das cepas.....	36
3.5- Reativação das cepas.....	36
3.6- Identificação dos microrganismos.....	36
3.7- Pureza da droga.....	37
3.8- Testes de suscetibilidade.....	37
3.8.1- Preparação do inóculo.....	37
3.8.2- Meio de cultura.....	38
3.8.3- Antifúngicos avaliados.....	38
3.8.3.1- Preparação da solução estoque.....	38
3.8.4- Preparação da placa de diluição.....	38
3.8.5- Técnica de microdiluição em caldo.....	39
3.8.5.1- Execução e leitura dos testes de CIM - Metodologia NCCLS.....	39
3.8.5.2- Execução e leitura dos testes de CIM - Metodologia EUCAST.....	40
3.8.6- Cepas padrão.....	40
3.9- Análise estatística.....	40
3.9.1- Para comparação dos testes realizados por ambas as metodologias.....	41
4- RESULTADOS.....	42
5- DISCUSSÃO.....	59
6- CONCLUSÕES.....	68
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
8- ANEXOS.....	78

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	American type culture collection
BHI	(Brain Heart Infusion) Infusão de cérebro e coração
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
EUCAST	European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing
LIF	Laboratório de Investigação em Fungos-UNICAMP
NCCLS	National Committee for Clinical and Laboratory Standards

	Pág.
Tabela 1- Distribuição das espécies de <i>Candida</i> isoladas de diferentes materiais clínicos coletados de pacientes do HC-UNICAMP, no período de janeiro de 1999 a dezembro 2003.....	45
Tabela 2- Distribuição das espécies de <i>Candida</i> isoladas de pacientes, das diferentes clínicas do HC-UNICAMP, no período de janeiro de 1999 a dezembro 2003.....	46
Tabela 3- Dados da CIM para <i>Candida krusei</i> ATCC 6258 e <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019, durante o processo de padronização de leitura.....	47
Tabela 4- Intervalos de Concentração Inibitória Mínima obtida para todas as cepas avaliadas frente aos antifúngicos, empregando-se as metodologias NCCLS e EUCAST.....	48
Tabela 5- Análise descritiva da comparação entre os resultados de CIM obtidos para as metodologias NCCLS e EUCAST frente a Anfotericina B. Foram consideradas a concordância exata e a diferença de até duas diluições, de forma isolada (linha a) e forma acumulativa (linha b).....	49
Tabela 6- Análise descritiva da comparação entre os resultados de CIM obtidos para as metodologias NCCLS e EUCAST frente a Itraconazol. Foram consideradas a concordância exata e a diferença de até três diluições, de forma isolada (linha a) e forma acumulativa (linha b).....	50
Tabela 7- Análise descritiva da comparação entre os resultados de CIM obtidos para as metodologias NCCLS e EUCAST frente a Cetoconazol. Foram consideradas a concordância exata e a diferença de até quatro diluições, de forma isolada (linha a) e forma acumulativa (linha b).....	51

Tabela 8-	Análise descritiva da comparação entre os resultados de CIM obtidos para as metodologias NCCLS e EUCAST frente a Fluconazol. Foram consideradas a concordância exata e a diferença de até cinco diluições, de forma isolada (linha a) e forma acumulativa (linha b).....	52
Tabela 9-	Interpretação dos testes de suscetibilidade das cepas de <i>Candida</i> frente ao fluconazol.....	53
Tabela 10-	Interpretação dos testes de suscetibilidade das cepas de <i>Candida</i> frente a itraconazol.....	54
Tabela 11-	Interpretação dos testes de suscetibilidade das cepas de <i>Candida</i> frente a anfotericina B.....	55
Tabela 12-	Distribuição da diferença em diluições entre os métodos (EUCAST>NCCLS) para diferentes espécies frente a Anfotericina B.....	56
Tabela 13-	Distribuição da diferença em diluições entre os métodos (EUCAST>NCCLS) para diferentes espécies frente a Itraconazol.....	57
Tabela 14-	Distribuição da diferença em diluições entre os métodos (EUCAST>NCCLS) para diferentes espécies frente ao Cetoconazol.....	57
Tabela 15-	Distribuição da diferença em diluições entre os métodos (EUCAST>NCCLS) para diferentes espécies frente ao Fluconazol.....	58

	Pág.
Quadro 1- Diferenças entre a metodologia NCCLS M27-A e a técnica espectrofotométrica com RPMI-2% de glicose (EUCAST) (Rodrigues-Tudella, JLR, 2001).....	29

Pág.

Figura 1- Porcentagem de isolamento das diferentes espécies de <i>Candida</i> a partir de espécies clínicas de 3.297 pacientes, atendidos por diferentes especialidades médicas no HC-Unicamp nos anos de 1999 a 2003.....	43
Figura 2- Distribuição das cepas de leveduras isoladas de materiais clínicos coletados de pacientes de diferentes clínicas, no período de 1999 a 2003.....	44

RESUMO

Levando em consideração as características terciárias do Hospital das Clínicas da UNICAMP, com uma grande população de pacientes imunossuprimidos, conhecer a epidemiologia e o perfil de suscetibilidade dos principais patógenos fúngicos isolados, seria de grande valia. De janeiro de 1999 a dezembro de 2003, 3.926 cepas de *Candida spp.* foram isoladas de 3.297 pacientes. *C.albicans* foi a espécie mais freqüente com 64,4% dos isolados, seguida por *C. tropicalis* (11,8%), *C.glabrata* (10,8%) e *C.parapsilosis* (6,5%). Cepas de *C. albicans* foram mais isoladas de escarro (34,8%), urina (20,5%), lavado brônquico (11,6%) e swab perineal (8,3%). *C. parapsilosis* foi mais relacionada a cateteres (10,0%) e hemoculturas (24,1%), enquanto *C.tropicalis* (35,0%) e *C.glabrata* (50,0%) foram mais freqüentes em urina. Estes dados revelam as espécies mais prevalentes e a necessidade do conhecimento de sua suscetibilidade aos antifúngicos em uso, se não para nortear a terapia, ao menos como guia para terapêutica empírica. No presente estudo, 175 cepas de *Candida* isoladas a partir de culturas de sangue, cateter e urina: foram submetidas ao teste de suscetibilidade frente a anfotericina B, fluconazol, cetoconazol e itraconazol pelas técnicas NCCLS e EUCAST, para comparação estatística das CIMs obtidas. Tomando-se a concordância exata entre as 2 metodologias, os melhores resultados foram obtidos para *C. parapsilosis* frente a itraconazol (88,57%) e cetoconazol (85,71%). Com diferenças de até 1 diluição, resultados acima de 90% de concordância, foram obtidos para *C.krusei* frente a anfotericina B (97,14%) e fluconazol (94,2%), *C.glabrata* frente a itraconazol (97,14%) e *C.parapsilosis* frente a itraconazol (100,0%) e cetoconazol (91,4%). Com até 2 diluições de diferença 100% de concordância foi obtida frente a anfotericina B para todas as espécies avaliadas; para itraconazol frente a *C.glabrata*, *C.krusei* e *C.tropicalis*; para cetoconazol, frente a *C.parapsilosis* e *C.krusei* e para fluconazol frente a *C.glabrata*, *C.krusei* e *C.tropicalis*. Pôde-se observar que, para a maioria das drogas avaliadas, as CIMs mais altas foram obtidas com a metodologia NCCLS e que os testes realizados com as cepas de *C.parapsilosis* foram os que apresentaram mais resultados homogêneos entre as metodologias. De acordo com o documento NCCLS M27 A2, as cepas avaliadas foram classificadas quanto à sua suscetibilidade, para as duas metodologias empregadas. Frente ao fluconazol, os resultados foram bastante concordantes, exceto para *C. krusei*, onde a metodologia NCCLS apontou cepas mais resistentes. Para itraconazol, de modo geral, a metodologia NCCLS apontou cepas mais resistentes. Frente a anfotericina B

as cepas menos sensíveis foram observadas pela metodologia NCCLS, com exceção da *C.albicans*. Assim, em nossa instituição, no período avaliado, o índice de resistência das cepas isoladas frente ao fluconazol foi de 6,8%, para metodologia NCCLS e de 5,1% para EUCAST; frente ao itraconazol foi de 32,6% para metodologia NCCLS e de 31,4% para o EUCAST e frente a anfotericina B foi de 23,4% para NCCLS e de 9,1% para EUCAST. De modo geral, os dados de sensibilidade e resistência são compatíveis com os relatados na literatura consultada. Finalmente, um procedimento mais adequado à rotina de um laboratório de microbiologia, utilizaria leitura espectrofotométrica, após 24 e 48 h de incubação, em placas de fundo chato, de testes realizados pela metodologia NCCLS.

ABSTRACT

Considering the tertiary characteristics of the Clinical Hospital of the State University of Campinas, with a large number of immunocompromised patients, it would be very important to know the susceptibility pattern from the fungal pathogens. From January 1999 to December 2003, 3926 *Candida* strains were isolated from 3297 patients. *C.albicans* was the most frequent species with 64, 4%, followed by *C. tropicalis* (11, 8%), *C.glabrata* (10, 8%) and *C.parapsilosis* (6,5%). *C. albicans* strains were mostly isolated from sputum (34,8%), urine (20,5%), bronchoalveolar lavage (11,6%) and perinea swab (8,3%). *C. parapsilosis* was more related to catheters (10,0%) and blood cultures (24,1%), while *C.tropicalis* (35,0%) and *C.glabrata* (50,0%) were frequent in urine.

This data showed the most prevalent species and the necessity to know their susceptibility pattern to current in use antifungal drugs. In this work, 175 *Candida* strains isolated from blood, catheter and urine were submitted to antifungal susceptibility tests to amphotericin B, fluconazole, ketoconazole and itraconazole by NCCLS and EUCAST methodologies, for statistical comparison of MICs. Exact agreement of the two methodologies was obtained for 88,57% of *C. parapsilosis* strains when testing itraconazole and ketoconazole (85,71%). Until 1 dilution and results over 90% of agreement were obtained for *C.krusei* when testing amphotericin B (97,14%) and fluconazole (94,2%), *C.glabrata* tested with itraconazole (97,14%) and *C.parapsilosis* with itraconazole (100,0%) and ketoconazole (91,4%). With until 2 dilutions difference 100% agreement was obtained for all evaluated strains with amphotericin B, *C.glabrata*, *C.krusei* and *C.tropicalis* with itraconazole, *C.parapsilosis* and *C.krusei* with ketoconazole; *C.tropicalis*, *C.krusei* and *C.glabrata* for fluconazole. For the most drugs evaluated, higher MICs were observed with NCCLS methodology. *C.parapsilosis* strains showed, in general the best results.

According to the NCCLS M27 A2 document all strains, testes by the two methodologies, were classified by their susceptibility. Results shoed good agreement for fluconazole, except for *C.krusei* strains, pointed as more resistant by NCCLS. The same happened with all strains when testing itraconazole. Also for amphotericin B less sensible strains were pointed by NCCLS with exception to *C.albicans*.

So, in our institution, in the evaluated period, the resistance tax for fluconazole was 6,8% by NCCLS and 5,1% by EUCAST; for itraconazole was 32,6% by NCCLS and 31,4% by EUCAST and for amphotericin B 23,4% by NCCLS and 9,1% by EUCAST. In general, this data of susceptibility are compatible with literature relates. And finally, a routine performing test would be very good if utilize spectrophotometric lectures after 24 and 48h incubation, in flat microtitulation plates of NCCLS methodology tests.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Considerações gerais sobre os fungos

Em 1969, Whittaker e colaboradores, sugeriram a criação do reino *Fungi*, evidenciando o fato de que os fungos não atendiam características básicas para permanecerem no reino vegetal. Uma vez que não possuíam pigmento fotossintético, apresentavam parede de quitina e armazenavam glicogênio e não amido, não podiam continuar fazendo parte do Reino *Plantae* ou *Vegetaliae*, onde eram classificados até então (SIDRIN e MOREIRA, 1999).

São seres eucarióticos, isto é, possuem membrana nuclear que envolve os cromossomos e o nucléolo. Reticulo endoplasmático, aparelho de Golgi, vesículas mitocôndriais, vacúolos e demais organelas, estão imersas no citoplasma (SIDRIN & MOREIRA, 1999).

O Reino *Fungi* compreende organismos macroscópicos e microscópicos, que apresentam morfologias distintas: filamentosa e leveduriforme.

As leveduras são seres unicelulares e se distinguem dos fungos filamentosos por apresentarem uma forma de divisão celular diferenciada, isto é, se dividem por brotamento. São células geralmente ovais ou arredondadas, podendo algumas vezes apresentar formas alongadas e irregulares. A cultura é úmida, cremosa e de textura membranosa. Algumas podem produzir cápsula (SIDRIN e MORREIRA, 1999; LARONE, 1995; MURRAY, 1999).

Das centenas de espécies de leveduras, somente 10% produzem doenças nos seres humanos e animais. Geralmente são identificadas pela observação microscópica e macroscópica de suas estruturas desenvolvidas em meios de cultura específicos, em adição a testes fenotípicos e genotípicos, se necessário (MURRAY, 1999).

As leveduras do gênero *Candida* são usualmente confinadas a reservatórios humanos e animais, podendo ser recuperadas do solo, alimentos e ambiente hospitalar. São habitantes normais do trato genital feminino e gastrointestinal, podendo causar doenças em pacientes imunodeprimidos, uma vez que são consideradas patógenos oportunistas (MURRAY, 1999).

1.2- Aspectos clínicos e epidemiológicos

Infecções oportunistas causadas por espécies de *Candida* têm aumentado substancialmente nos últimos 15 anos, tornando-se um problema cada vez maior em pacientes imunodeprimidos (WRIGHT & WENZEL, 1997, HOVI *et al.*, 2000). Na década de 1980 deu-se uma explosão de infecções fúngicas.

Sérios fatores levam ao aumento destas infecções, tais como: doenças de base imunossupressoras como a SIDA, utilização prolongada de antibióticos de amplo espectro e aumento do número de pacientes com neutropenia secundária ao câncer ou transplantados.

Em estudos realizados em hospitais da Europa, foi possível observar que 85% de todas as hemoculturas positivas para fungos, tinham como agentes causais espécies de *Candida*, sendo *Candida albicans* responsável por 52% dos casos, *Candida glabrata* 20%, *Candida parapsilosis* 8% e *Candida krusei* 5% (KLEPSER *et al.*, 1998).

Falhas na resposta terapêutica aos antifúngicos podem também ser resultantes da resistência clínica, associada com fatores do hospedeiro, assim como, deficiência na resposta imune, presença de materiais protéicos e fatores farmacocinéticos (dosagem da droga, penetração, estabilidade e proteína ligante) (KLEPSER *et al.*, 1998).

1.3- Terapêutica de infecções por leveduras

O tratamento das infecções fúngicas sistêmicas é limitado devido às escassas opções terapêuticas, falhas na resposta clínica, resistência à terapia e alta toxicidade da drogas antifúngicas (ELEWSKI e OHIO, 1993; EPSTEIN *et al.*, 1996).

Agentes antifúngicos convencionais são geralmente fungistáticos, apresentando problemas principalmente em pacientes com sistema imune prejudicado. Esses agentes apenas impedem o crescimento fúngico proporcionando um rápido relapso ou incompleta erradicação do microrganismo. Somente a inibição do crescimento antifúngico pode não ser suficiente para prevenir a disseminação do microrganismo nesses pacientes (ELEWSKI e OHIO, 1993).

Os antifúngicos mais utilizados são: anfotericina B (poliênico), fluconazol, cetoconazol e itraconazol (triazóis) e 5- flucitosina (pirimidina) (ROCCO et al., 2000).

A anfotericina B, poliênico de ação fungicida se liga fisicamente com o ergosterol da membrana celular. Este mecanismo rompe a célula fúngica, causando extravasamento dos seus componentes e eventualmente morte celular (ELEWSKI e OHIO, 1993). Sua fórmula convencional é pouco tolerada com alto risco de comprometimento renal, principalmente se administrada concomitantemente a tratamento com outras drogas nefrotóxicas, tais como quimioterápicos, aminoglicosídeos, vancomicina e ciclosporina (CESARO et al., 1993; SUGAR,1990). No entanto, a anfotericina B permanece como a droga de escolha para suspeita e confirmação de infecção fúngica sistêmica (TOLLEMAR et al., 1999, ROCCO *et al.*,2000).

Cetoconazol, itraconazol e fluconazol inibem a síntese de ergosterol, interagindo com a C-14 α -demetilase, que é uma enzima do citocromo P-450, bloqueando a demetilação do lanosterol em ergosterol que, por sua vez, é o principal esteróide da membrana fúngica. Essa inibição prejudica a função da membrana, aumentando sua permeabilidade (SIDRIN e MOREIRA, 1999). Devido à enzima citocromo P-450 de mamíferos estar envolvida com síntese de importantes esteróides como a testosterona, cortisol e aldosterona, drogas com uma afinidade por esta enzima podem estar associadas com toxicidade (ELEWSKI e OHIO, 1993; CHRISTINE & TERREL, 1999).

Dentre as mais recentes opções terapêuticas está o voriconazol. O voriconazol é um monotriazol com larga ação antifúngica, incluindo as leveduras. Tem mostrado bons resultados em tratamentos de candidíase de orofaringe e aspergilose pulmonar. Demonstrando maior atividade sobre espécies de *Candida* e *Trichosporon* (UZUN et al., 2000).

1.4- Testes de suscetibilidade a antifúngicos

Há algumas décadas não havia necessidade de avaliar a suscetibilidade de leveduras frente a antifúngicos, devido à baixa frequência destas infecções, bem como, ao limitado número de agentes terapêuticos disponíveis. Em adição, o potencial de emergência de resistência aos agentes antifúngicos não era bem reconhecido. No entanto, o aumento das infecções fúngicas sistêmicas, mudanças na prática hospitalar, que incluem aumento no uso de terapêuticas que deprimem o sistema imunológico, tais como transplantes, o uso frequente e indiscriminado de antibacterianos de amplo espectro, instalação de sondas e cateteres, assim como a síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), tem aumentado a necessidade da padronização de um teste de suscetibilidade “in vitro” para auxiliar, não somente os clínicos na escolha terapêutica, mas também as indústrias farmacêuticas no desenvolvimento e avaliação de novas drogas (REX et al., 1996, PFALLER et al., 1996, HACEK et al., 1995).

Os testes de suscetibilidade aos antifúngicos foram derivados dos métodos de suscetibilidade aos antimicrobianos que tiveram seu início em 1956, com Bauer e Kirby e que, a partir de métodos de diluição em caldo, estabeleceram a correlação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) com os diâmetros de halo dos testes de difusão com discos. Desde então, essa metodologia vem sendo atualizada e utilizada pela maioria dos laboratórios de microbiologia (Bauer AW et al., 1966).

Durante algum tempo, testes de suscetibilidade aos antifúngicos foram realizados sem o cumprimento de padrões definidos. Estudos mais detalhados demonstraram que a reprodutibilidade do teste era um fator limitante. Para solucionar este problema, foi instituído um grupo de investigadores junto ao NCCLS (The National Committee for Clinical Laboratory Standards). Os estudos foram iniciados pela avaliação das diferentes variáveis envolvidas no teste “in vitro”, para leveduras, frente aos antifúngicos (REX JH et al., 1996, PFALLER et al., 1996).

Em 1982, foi designado o primeiro sub-comitê do NCCLS para padronização do teste e somente em 1985, foi publicado o primeiro relatório contendo pequenos estudos colaborativos.

Em 1992, foram definidos os fatores pré-analíticos e publicados no documento M27-P, depois adaptado para M27-T. Apenas em 1997 foi aprovado o documento para teste de suscetibilidade a antifúngicos, o M27-A, que contém um guia padronizado para realização do teste de microdiluição em caldo, os quais demonstram alta reprodutibilidade intra e interlaboratorial, permitindo a determinação da CIM, por meio de leitura visual, para anfotericina B, flucitosina fluconazol, cetoconazol e itraconazol (PFALLER et al., 2000, REX et al., 1996).

Em 2002 foi publicado o documento M27A2 que preconiza para leitura da CIM, o período de 24 e 48 horas em microdiluição em caldo, podendo ser utilizado método visual ou espectrofotométrico (NCCLS, 2002).

1.4.1- O Método padronizado pelo NCCLS

O NCCLS inicialmente seguiu metodologias em caldo para determinação e padronização do teste para leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus*. Assim foram investigadas as principais variáveis pré-analíticas como: tamanho ideal e modo de preparação do inóculo, meio de cultura, temperatura e tempo de incubação e a determinação de “ponto final” (PFALLER et al., 1997).

1.4.1.1- Inóculo

Partindo de concentrações de 10^2 a 10^6 UFC por mL, os pesquisadores perceberam que a CIM aumentava com o aumento no tamanho do inóculo. Mais tarde chegaram à conclusão de que o inóculo ideal seria de $0,5$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL, pois foi o que apresentou melhor concordância intra e interlaboratorial. Quanto à sua preparação, foram estudados três métodos diferentes: o espectrofotométrico, cartão de Wicherham e hemocitométrico. O método que mostrou ter maior reprodutibilidade e menor variabilidade intra e interlaboratorial foi o espectrofotométrico, que foi considerado simples e por fornecer leitura objetiva (REX et al., 1993).

1.4.1.2- Meio de cultura

Assim como para bactérias, o uso de diferentes meios de cultura pode ocasionar resultados substancialmente diferentes (REX JH et al., 1993). Deste modo, o meio de cultura a ser empregado deveria ser capaz de suportar crescimento adequado dos microrganismos a serem avaliados sem, causar qualquer interação com a atividade das drogas utilizadas no experimento (SIDRIM et al., 1999).

Pfaller et al., 1990, conduziram estudos multicêntricos comparando testes realizados em meios quimicamente definidos, incluindo Yeast Nitrogen Base (Difco Laboratories, Detroit, MI), RPMI 1640 (Sigma Chemical CO., St. Louis, MO), Synthetic Amino Acid Medium-Fungal (American Biorganics, North Tonawanda, NY) e High Resolution (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England). O mais alto nível de concordância entre laboratórios, considerando tempo e temperatura de incubação, foi de 87, observado com a utilização do meio RPMI 1640. Um meio quimicamente definido, livre de macromoléculas e que suporta crescimento adequado de espécies diversas de leveduras (SIDRIM *et al.*, 1999).

1.4.1.3- Temperatura e tempo de incubação

Um estudo colaborativo avaliando os mesmos 100 isolados, em 13 laboratórios diferentes, demonstrou para anfotericina B, cetoconazol e 5-flucitosina, resultados mais consistentes obtidos com temperatura de 35°C após 48hs de incubação. Com base nesses resultados, o NCCLS propôs como padrão, 48h de incubação a 35°C (REX et al., 1993) (NCCLS M 27 A-2, 2002).

1.4.1.4- Solubilidade das drogas

Alguns antifúngicos possuem solubilidade limitada. O fluconazol, por exemplo, possui boa solubilidade em água enquanto que anfotericina B, cetoconazol e itraconazol são solúveis em dimetilsulfóxido (DMSO) (NCCLS M27-A, 1997).

1.4.1.5- Degradação da droga

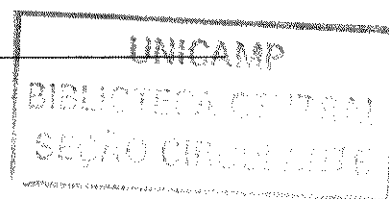
Após longo período de incubação e /ou contato com a luz em especial, a anfotericina B, sofre degradação. Portanto, os testes devem ser realizados no menor tempo possível e, ao abrigo da luz (TORNATORE et al., 1997).

1.4.1.6- Procedimentos de leitura

Outro fator importante na padronização do teste de suscetibilidade é a determinação do critério de leitura dos ensaios. Os testes com anfotericina B apresentam nítida definição do ponto de leitura, sendo a concentração inibitória mínima definida como a menor concentração da droga capaz de inibir qualquer crescimento visualmente perceptível nos ensaios (SIDRIM et al., 1999).

Os azóis, drogas consideradas fungistáticas, apresentam início de atuação retardado pela necessidade de entrada de droga na célula fúngica e necessária inibição do metabolismo celular. Durante esse período, geralmente ocorre crescimento do organismo utilizado como inóculo do ensaio, independente da concentração de antifúngico utilizada. Conseqüentemente, em alguns experimentos, a inibição tardia da multiplicação do microrganismo permite a visualização do seu tênue crescimento residual, sendo este fenômeno denominado de *trailing* ou arraste. A presença deste determina a necessidade de definição de um critério de leitura baseado na inibição relativa do crescimento do microrganismo avaliado (ESPINEL-INGROFF et al. 1992).

Nesse contexto, estudos realizados por Espinel-Ingroff et al., 1992 e Fromtling et al., 1993 definiram como critério de leitura de CIM para azóis, a identificação da menor concentração da droga capaz de inibir 50% do crescimento obtido com o controle positivo (CUENCA-ESTRELLA M et al , 2002). Utilizando este critério, Espinel-Ingroff et al. 1992, observaram reprodutibilidade interlaboratorial de 71 a 94% para ensaios envolvendo essas drogas, quando as leituras dos testes eram realizadas após 48 horas incubação a 35°C (SIDRIM et al., 1999, ESPINEL-INGROFF et al., 1994).



1.4.1.7- Determinação do ponto final

Embora testes de suscetibilidade tenham sido aprovados e valores de ponto final tenham sido propostos, a interpretação dos resultados ainda deve ser feita com muita cautela. De acordo com análises do NCCLS, CIM $\geq 64\mu\text{g/ml}$ para o fluconazol e $\geq 1\mu\text{g/ml}$ para itraconazol sugerem falha no tratamento, sendo estes microrganismos considerados resistentes. Para isolados com CIM para fluconazol de 16 a $32\mu\text{g/ml}$ e itraconazol de 0,25 a $0,5\mu\text{g/ml}$ a resposta clínica depende do máximo de droga que consegue alcançar a concentração sérica e estes microrganismos são considerados sensíveis – dose – dependente. Já com CIMs de $\leq 8\mu\text{g/ml}$ e $\leq 0,12\mu\text{g/ml}$ para fluconazol e itraconazol respectivamente os microrganismos são considerados sensíveis. É importante enfatizar que estes dados de ponto final são baseados em resposta ao tratamento de *C. albicans* em infecção de mucosa (ESPINEL-INGROFF, 1997).

Para anfotericina B, os resultados de CIM obtidos geralmente estão entre 0,25- $1\mu\text{g/ml}$. Microrganismos que possuem um valor de CIM maior do que $1\mu\text{g/ml}$ têm sido considerados resistentes (KLEPSEK et al., 1998).

1.4.2- O método preconizado pelo EUCAST

Em recentes publicações, um grupo europeu, EUCAST (European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing), agrupa as principais sugestões de alterações ao método do NCCLS, visando otimizar a realização dos testes de suscetibilidade a antifúngicos (EUCAST. DEF 3.1, 1.2, 2.1, 2000, RODRIGUES-TUDELLA et al., 1994 e 1996). O quadro 1 compara em detalhes as metodologias propostas pelos comitês NCCLS e EUCAST.

Quadro 1- Diferença entre a metodologia NCCLS M27 A-2 e a técnica espectrofotométrica com RPMI-2% de glicose (EUCAST) (Rodrigues-Tudella, JLR, 2001).

	M27 A-2	EUCAST
Metodologia	Macrodiluição em caldo, 1 ml Microdiluição em caldo, 0,2 ml	Microdiluição em caldo, 0,2 ml
Meio de cultura	RPMI 1640-2%glicose 0,165M MOPS, pH 7,0	RPMI 1640-2% glicose com 0,165M MOPS, pH 7,0.
Inoculo	0,5 – 2,5 x 10 ³ ufc/mL	0,5 – 2,5 x 10 ⁵ ufc/ml
Temperatura de incubação	35° C	35° C
Tempo de incubação	Espécies de <i>Candida</i> , 48 horas <i>Cryptococcus</i> , 72 horas	<i>Candida</i> , 24 e 48 horas
Determinação da CIM	<u>Visual</u> Anfotericina B: tubo opticamente claro Azóis: redução de 50% da turbidez em comparação com o crescimento do controle. <u>Espectrofotométrica</u> Anfotericina B: diminuição da densidade óptica (DO) em 95% em comparação com o controle de crescimento. Azóis: redução de 50%.	<u>Espectrofotométrica</u> Anfotericina B: diminuição da densidade óptica (DO) em 95% em comparação com o controle de crescimento. Azóis: redução de 50%.

1.5- Correlação “in vivo” e “in vitro”

Seria ideal que os resultados dos testes de suscetibilidade “*in vitro*” fornecessem uma confiável resposta “*in vivo*” para a terapia de infecções em humanos. Entretanto, como relatado anteriormente, as limitações da metodologia disponível permitem apenas uma modesta correlação entre os resultados “*in vitro*” do teste de suscetibilidade com a evolução clínica. Embora freqüentemente a resistência “*in vivo*” esteja relacionada a falha clínica, a sensibilidade “*in vitro*” nem sempre pode ser associada a sucesso na terapia (PFALLER et al., 1996).

Para a anfotericina B, a resistência é considerada incomum, entretanto, é mais observada entre as outras espécies de *Candida* que não *C.albicans*, em especial *C.lusitaniae*. Embora 94 a 99% das espécies de *Candida* sejam inibidas em concentrações $\leq 1,0\mu\text{g/ml}$, há uma questão com relação ao método NCCLS M27-A, que pode ser insensível para detectar isolados resistentes a esta droga. Utilização do meio de cultura “Antibiotic Medium 3” ou ágar base para o Etest®, tem sido proposta na tentativa de ajudar na detecção da resistência clinicamente importante da anfotericina B. Apesar disso, a falha clínica frente a anfotericina B, para candidíases, parece estar mais correlacionada com fatores do hospedeiro do que com resistência antifúngica intrínseca ou adquirida (PFALLER et al., 1996, YOON et al., 1999).

Para o fluconazol, antifúngico utilizado tanto no tratamento de candidíases sistêmicas quanto profundas, relatos de resistência têm ocorrido frequentemente com espécies de *Candida*, particularmente *Candida krusei* e *Candida glabrata*. Tem-se notado claramente que o método NCCLS M-27 A, detecta diferenças intrínsecas na suscetibilidade de espécies de *Candida* em modelo animal e em pacientes com AIDS, os quais tem candidíase orofaríngea (PFALLER et al., 1996).

A maioria das espécies de *Candida* tem alta suscetibilidade ao itraconazol “*in vitro*”, ou seja, mais de 90% são inibidas por concentrações $\leq 1,0\mu\text{g/ml}$ e 50 a 75% são inibidas por $\leq 0,12\mu\text{g/ml}$. Embora haja alguma evidência de que o itraconazol seja efetivo em alguns pacientes com AIDS, que tenham apresentado falha no tratamento com fluconazol, e que muitos desses isolados tem elevadas CIMs para itraconazol (0,5 a $1,0\mu\text{g/ml}$), acredita-se que altas doses de itraconazol devam ser necessárias para que seja alcançada resposta clínica (PFALLER et al., 1996).

O voriconazol demonstrou melhor atividade, com CIMs de $0,5\mu\text{g/mL}$ frente a isolados de várias espécies de *Candida*. Entretanto, deve-se considerar o voriconazol como uma alternativa viável entre os triazóis para tratamento de infecções causadas por espécies de *Candida* (DRAGO et al., 2004).

Levando em consideração as características terciárias do Hospital das Clínicas da Unicamp, com uma grande população de pacientes atendidos que se enquadra na grande maioria dos fatores de risco que predispõem às infecções fúngicas, especialmente as sistêmicas, conhecer a epidemiologia e o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos dos principais patógenos envolvidos é de grande valia.

No entanto, a implantação de uma metodologia prática, rápida e adequada a uma rotina laboratorial exigem uma avaliação criteriosa. Assim este trabalho propõe a avaliação das duas metodologias mais conceituadas e que apresentam os melhores índices de correlação, segundo a literatura disponível, a fim de estabelecer um protocolo que atenda as necessidades desta instituição.

2- OBJETIVOS

- Realizar levantamento retrospectivo de incidência das diferentes espécies de *Candida* em pacientes atendidos no HC-UNICAMP
- Avaliar o perfil de suscetibilidade a antifúngicos das diferentes espécies de *Candida* isoladas a partir de culturas de sangue, cateteres e urina.
- Comparar estatisticamente duas propostas de metodologia de avaliação de suscetibilidade a antifúngicos, NCCLS e EUCAST, frente a diferentes espécies de leveduras do gênero *Candida*.
- Estabelecer parâmetros analíticos para realização de testes de suscetibilidade a antifúngicos para leveduras do gênero *Candida*, adequados à rotina do Laboratório de Microbiologia-DPC-HC-UNICAMP.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Estudo retrospectivo de prevalência

Para esta avaliação foi realizado levantamento nos arquivos de rotina do setor de Micologia do Laboratório de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica HC-UNICAMP no período de 1999 a 2003. Foram consideradas todas as cepas de *Candida*, isoladas de diferentes espécimes clínicos coletados de pacientes atendidos nas diferentes especialidades clínicas e cirúrgicas do HC-UNICAMP.

3.2- Microrganismos

Após avaliação estatística, 175 cepas de diferentes espécies de *Candida* isoladas a partir de sangue, cateter e urina encaminhados para cultura de fungos de rotina do Setor de Micologia do Laboratório de Microbiologia Clínica – DPC – HC – UNICAMP, foram mantidas na Micoteca do Laboratório de Investigação em Fungos (LIF-FCM). Assim foram selecionadas as cepas do gênero *Candida*: 34 *Candida albicans*, 35 *Candida glabrata*, 35 *Candida krusei*, 35 *Candida parapsilosis* e 36 *Candida tropicalis* (Anexo 1).

3.3- Cálculo do tamanho amostral para proporção

Após resultado de testes preliminares com 10 cepas de cada uma das espécies do estudo, o cálculo foi assim realizado:

p	0,090
d	0,100
alfa	0,05
N	35

Onde **p** = proporção de indivíduos com a característica de interesse na população;

d = diferença desejada entre proporção amostral e proporção populacional (erro amostral) e **alfa** = níveis de significância (bilateral) (HULLEY e CUMMINGS, 1998).

3.4- Manutenção das cepas

As cepas foram mantidas em ágar Sabourand Dextrose e repicadas com 24h de antecedência do início de cada experimento. Vários repiques foram mantidos em água destilada estéril e reativados sempre que a cepa apresentou qualquer alteração de suas características macroscópicas, microscópicas e/ou bioquímicas.

3.5- Reativação de cepas

Uma alíquota do frasco contendo microrganismo e água foi transferida para um tubo contendo caldo BHI e incubado a 35°C por 24 horas. Depois, uma alíquota do crescimento foi transferida para uma placa de ágar Sabourand dextrose, incubada novamente a 35°C por 24 horas. Durante o estudo as cepas foram mantidas em ágar Sabourand dextrose a temperatura ambiente.

3.6- Identificação dos microrganismos

Todas as cepas foram submetidas a testes para identificação, que foram realizados de acordo com Lacaz e cols. 1991, metodologia desenvolvida na rotina do Setor de Micologia do Laboratório de Microbiologia DPC-HC-UNICAMP.

3.7- Pureza das cepas

A pureza das cepas foi confirmada por passagem em CHROMoagar® - *Candida* (França)

3.8- Testes de suscetibilidade

Foram realizados de acordo com as metodologias preconizadas pelo NCCLS M27 A2, 2002 e EUCAST (RODRIGUES-TUDELLA, *et al.*, 2001) para avaliação de concentração inibitória mínima (CIM).

3.8.1- Preparação do inóculo

Foram realizados repiques para obter amostras de 24 h, garantindo assim sua pureza e viabilidade das cepas. Uma alçada deste repique foi emulsionada em 5,0 mL de salina 0,85% estéril. Um mL dessa suspensão foi transferido para um tubo contendo 10 mL de salina 0,85% estéril (diluição 1:10) e realizada contagem das células em câmara de Neubauer. A partir do número de células contadas foi realizada nova diluição, para que fosse obtida a concentração final, de acordo com as fórmulas abaixo, onde “N” é o número de células contadas na câmara:

$$N \times 10^4 \times 1/N = 1 \times 10^4 \text{ UFC/ml (para NCCLS)}$$

$$N \times 10^6 \times 1/N = 1 \times 10^6 \text{ UFC/ml (para EUCAST)}$$

Depois que o inóculo foi adicionado à placa teste, houve uma nova diluição, restando um inóculo final de 10^3 UFC/ml (NCCLS) e 10^5 UFC/ml (EUCAST)

3.8.2- Meio de cultura

Foi utilizado o meio RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio (Sigma Chemical), suplementado com glicose (2%) tamponado com 0,165M de ácido morfilenopropanosulfônico (MOPS) (Sigma Chemical CO). O pH da solução foi ajustado para 7,0 com NaOH 1N, e a esterilização foi realizada por filtração a vácuo, em filtro 0,45µm (RSLHV2515 MILLEX-HV, Milipore, França), uma vez que não pode ser autoclavado para que não ocorra a degradação dos seus componentes. O meio pronto foi mantido sob refrigeração, por no máximo, 15 dias (NCCCLS M27-A, 1997).

3.8.3- Antifúngicos avaliados

Anfotericina B (Fungizon® Bristol-Myers Squibb), cetoconazol (Recordati Valdequímica Prod. Químicos), itraconazol (Galena) e fluconazol (Cipla).

3.8.3.1- Preparação da solução estoque de antifúngicos

Foram dissolvidos 12,8 mg de cada droga em 1,0 mL de DMSO com exceção da anfotericina B, que por ter sido utilizada na forma injetável, foi dissolvida diretamente em água destilada estéril.

3.8.4- Preparação da placa de diluição

Uma diluição seriada, da solução estoque de droga foi realizada com o objetivo de se obter dez concentrações diferentes de 128µg/mL à 0,03µg/mL.

3.8.5- Técnica de microdiluição em caldo

A avaliação foi realizada em placas de microtitulação, fundo “chato”, para ambas metodologias. As leituras foram realizadas nos comprimentos de onda de 450nm.

3.8.5.1- Execução e leitura dos testes de CIM – Metodologia NCCLS

Foram adicionados 20µL das diferentes concentrações de cada droga nos pocinhos das dez primeiras fileiras da placa de microtitulação, seguidos de 160µL do meio de cultura RPMI em todas as fileiras (1 a 12) e, finalmente, 20µL do inóculo em todos os pocinhos com exceção da 11ª fileira utilizada como controle negativo. As placas inoculadas foram incubadas a 35° C por 24 e 48 horas, e só então foi realizada a leitura.

O crescimento fúngico em cada pocinho foi comparado com o do controle positivo, observado visualmente com o auxílio de um espelho. Para anfotericina B, a CIM foi considerada como sendo a menor concentração da droga capaz de inibir qualquer crescimento visível no ensaio.

Para os azóis, que apresentam o fenômeno de “trailing” (crescimento residual), a CIM, foi considerada como sendo a menor concentração da droga que consegue inibir 50% do crescimento obtido no controle positivo. Para obtenção de um controle de leitura para esta porcentagem de inibição, foram transferidos 80µL do controle positivo para o controle negativo, obtendo-se assim uma diluição na razão de 1:1 do controle positivo, que representa inibição de 50% do crescimento. A seguir foram homogeneizados todos os pocinhos em que houve crescimento fúngico, com auxílio de micropipeta. Assim, a menor concentração da droga em que a turvação foi comparável a este novo controle foi considerado a CIM (ESPINEL et al., 1994).

As leituras foram realizadas tanto pelo modo visual, quanto espectrofotométrico.

3.8.5.2- Execução e leitura dos testes de CIM – Metodologia EUCAST

A preparação do teste é idêntica à utilizada pela metodologia do NCCLS, com a diferença apenas na concentração do inóculo. As placas foram incubadas a 35° C, por 24h e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro ELX 800 Universal Microplate Reader, Biotek Instruments, INC. em comprimento de onda de 450nm, obtendo-se resultados numéricos de densidade ótica, com registros por escrito . A leitura para a anfotericina foi 95% de diminuição da densidade ótica (DO) em comparação com o controle de crescimento. Para os azóis foi uma redução de 50% da densidade ótica em comparação ao controle de crescimento. Também foi realizada a leitura visual

3.8.6- Cepas padrão

Para controle dos testes de identificação e suscetibilidade a antifúngicos foram utilizadas as cepas padrão *Candida parapsilosis* ATCC® 22019 e *Candida krusei* ATCC® 6258. Para cada lote de placas de microtitulação preparadas, uma foi avaliada com a cepa padrão, tendo seus valores de CIM comparados com os valores estabelecidos pelo NCCLS M27-A2 (2002). Não havendo concordância com estes dados, todo o lote foi desprezado.

3.9- Análise estatística

Foi realizada pelo Serviço de Estatística da Câmara de Pesquisa FCM e foi utilizada para o cálculo do tamanho amostral, ou seja, a determinação do número mínimo de cepas a serem avaliadas para que a comparação das metodologias fosse possível e depois para a comparação dos resultados obtidos com as duas metodologias.

3.9.1- Concordância entre os métodos NCCLS e EUCAST na determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

Foi realizada a análise descritiva através de tabelas de frequências para variáveis categóricas.

Para as proporções de concordância foram calculados os intervalos de 95% de confiança. Para a comparação das CIMs em diferença de diluição, foi aplicado o teste de Wilcoxon para amostras relacionadas. O nível de significância foi de 5%(FLEISS, JL 1981).

Foram empregados nas análises os programas computacionais EPI INFO 6(versão 6.04b. CDC,1997,USA) e SAS SYSTEM for Windows(Statistical Analysis System)(versão 8.2 SAS Institute Inc, 1999-2001, Cary, NC, USA).

4- RESULTADOS

A partir dos estudos retrospectivos realizados, foi possível avaliar a porcentagem de isolamento das diferentes espécies de *Candida* dentre as 3.926 cepas isoladas a partir de espécies clínicas de 3.297 pacientes, atendidos por diferentes especialidades médicas no HC-Unicamp nos anos de 1999 a 2003. Os resultados podem ser visualizados nas figuras 1 a 2 e tabelas 1 e 2.

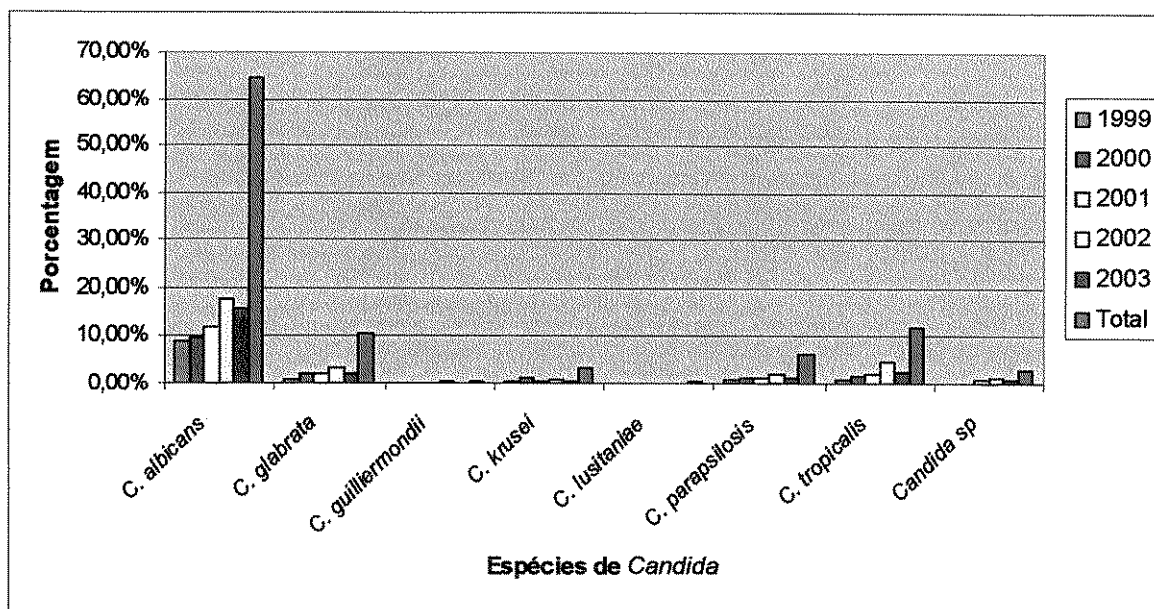


Figura 1- Porcentagem de isolamento das diferentes espécies de *Candida* a partir de espécies clínicas de 3.297 pacientes, atendidos por diferentes especialidades médicas no HC-Unicamp nos anos de 1999 a 2003.

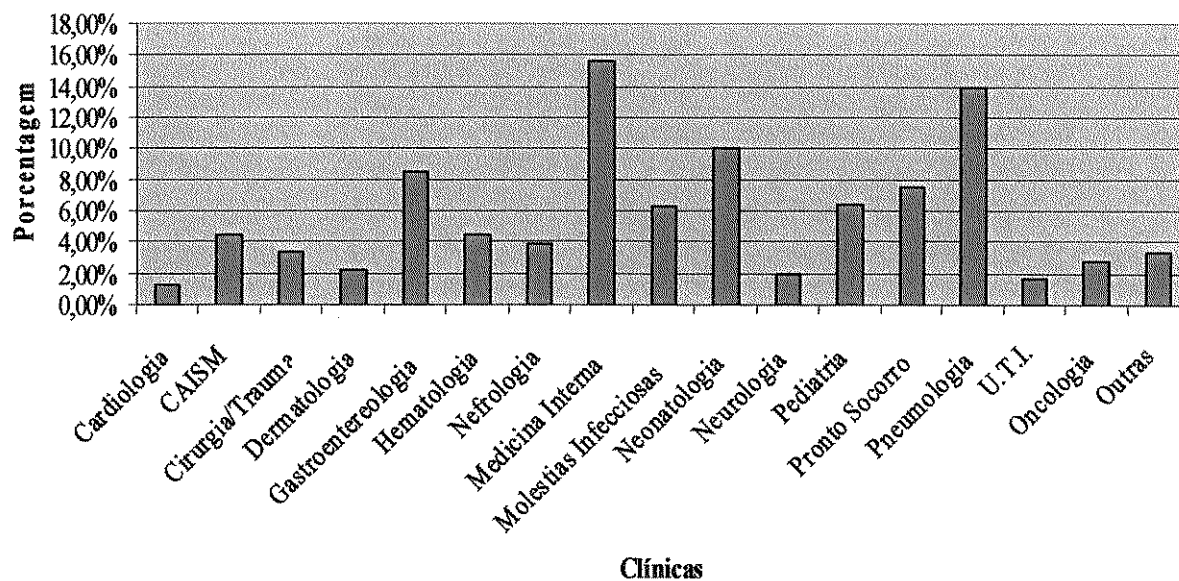


Figura 2- Distribuição das cepas de leveduras isoladas de materiais clínicos coletados de pacientes de diferentes clínicas, no período de 1999 a 2003.

Tabela 1- Distribuição das espécies de *Candida* por materiais clínicos coletados de pacientes do HC-UNICAMP, no período de janeiro de 1999 a dezembro 2003.

Material Clínico	<i>C. albicans</i> Nº(%)	<i>C. glabrata</i> Nº(%)	<i>C. guilliermondii</i> Nº(%)	<i>C. krusei</i> Nº(%)	<i>C. lusitanae</i> Nº(%)	<i>C. parapsilosis</i> Nº(%)	<i>C. tropicalis</i> Nº(%)	<i>Candida sp</i> Nº(%)
Sangue	131(6,9)	25(6,4)	3(23,1)	8(7,2)	3(33,3)	51(24,1)	48(13,1)	13(19,1)
Ponta Cateter	44(2,3)	7(1,8)	1(7,7)	5(4,5)	0(0,0)	21(10,0)	26(7,1)	3(4,4)
Lav.Brônquico	219(11,6)	37(9,5)	2(15,4)	8(7,2)	0(0,0)	13(6,2)	39(10,6)	6(8,8)
Urina	387(20,5)	190(50,0)	1(7,7)	37(33,3)	4(44,4)	26(12,3)	128(35,0)	26(38,2)
Swab orofaringe	91(4,8)	13(3,4)	0(0,0)	4(3,6)	0(0,0)	4(2,0)	20(5,5)	2(2,9)
Swab nasofaringe	5(0,3)	4(1,0)	0(0,0)	2(1,8)	0(0,0)	5(2,4)	2(0,5)	0(0,0)
Swab perianal	25(1,3)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	1(0,3)	1(1,5)
Swab perineal	156(8,3)	3(0,8)	0(0,0)	1(0,9)	0(0,0)	4(2,0)	1(0,3)	0(0,0)
Secreção vaginal	31(1,6)	16(4,1)	1(7,7)	3(2,7)	1(11,1)	7(3,3)	4(1,1)	0(0,0)
Secreção ocular	5(0,3)	3(0,8)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	3(1,4)	0(0,0)	0(0,0)
Secreção Traqueal	32(1,7)	10(2,6)	0(0,0)	1(0,9)	0(0,0)	1(0,5)	12(3,3)	0(0,0)
Unha	14(0,7)	1(0,3)	1(7,7)	0(0,0)	0(0,0)	22(10,4)	3(0,8)	1(1,5)
Líquido pleural	12(0,6)	2(0,5)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	2(0,9)	3(0,8)	0(0,0)
Líquido peritoneal	7(0,4)	2(0,5)	0(0,0)	2(1,8)	0(0,0)	4(2,0)	0(0,0)	0(0,0)
Líquor	3(0,2)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	8(3,8)	2(0,5)	1(1,5)
Lavado gástrico	42(2,2)	1(0,3)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	3(1,4)	8(2,2)	0(0,0)
Líquido ascítico	18(1,0)	8(2,1)	0(0,0)	2(1,8)	0(0,0)	3(1,4)	2(0,5)	3(4,4)
Escarro	656(34,8)	66(17,0)	2(15,4)	36(32,4)	1(11,1)	27(12,8)	64(17,5)	12(17,6)
Pele	7(0,4)	0(0,0)	1(7,7)	0(0,0)	0(0,0)	7(3,3)	0(0,0)	0(0,0)
TOTAL	1885	388	13	111	9	211	360	68

Tabela 2- Distribuição das espécies de *Candida* isoladas de pacientes, das diferentes clínicas do HC-UNICAMP, no período de janeiro de 1999 a dezembro 2003.

CLÍNICAS	ESPÉCIES					
	<i>C.albicans</i> (%)Nº	<i>C.glabrata</i> (%)Nº	<i>C.parapsilosis</i> (%)Nº	<i>C.tropicalis</i> (%)Nº	<i>Candida sp</i> (%)Nº	<i>C.kruse</i> (%)Nº
PNEUMONOLOGIA	(15,5)379	(13,4)50	(7,0)17	(12,3)56	(15,0)9	(10,7)14
CAISM	(4,6)112	(4,5)17	(5,4)13	(2,4)11	(5,0)3	(6,1)8
CARDIOLOGIA	(1,0)25	(2,7)10	(1,7)4	(2,6)12	(0,0)0	(0,8)1
GASTROENTEREOLOGIA	(8,9)217	(13,6)51	(5,4)13	(7,2)33	(10,0)6	(6,1)8
PRONTO SOCORRO	(7,4)181	(7,8)29	(7,0)17	(10,5)48	(6,6)4	(8,4)11
OUTRAS	(3,1)76	(3,7)14	(3,3)8	(1,8)8	(8,3)5	(0,8)1
DERMATOLOGIA	(1,1)28	(0,5)2	(14,0)34	(1,3)6	(6,6)4	(0,0)0
PEDIATRIA	(6,9)168	(0,8)3	(9,9)24	(10,2)47	(5,0)3	(5,3)7
NEUROLOGIA	(1,4)33	(1,1)4	(1,6)4	(3,3)15	(3,3)2	(2,3)3
NEONATOLOGIA	(15,0)366	(1,9)7	(5,3)13	(4,6)21	(0,0)0	(3,1)4
MEDICINA INTERNA	(14,6)357	(21,1)79	(10,7)26	(19,9)91	(16,6)10	(22,1)29
CIRURGIA DO TRAUMA	(3,4)84	(3,2)12	(4,1)10	(4,8)22	(1,6)1	(0,8)1
HEMATOLOGIA	(2,0)49	(8,3)31	(7,4)18	(3,3)15	(5,0)3	(15,2)20
ONCOLOGIA	(2,9)71	(4,3)16	(5,0)12	(3,1)14	(0,0)0	(3,8)5
NEFROLOGIA	(2,9)71	(6,1)23	(3,3)8	(3,3)15	(6,6)4	(2,3)3
UTI	(1,5)36	(1,1)4	(4,1)10	(3,3)15	(1,6)1	(0,8)1
MOLESTIAS INFECCIOSAS	(7,8)191	(5,9)22	(4,5)11	(6,1)28	(8,3)5	(11,5)15
Total	2444	374	242	457	60	131

Para implantação das metodologias, NCCLS e EUCAST, em especial a padronização das leituras, visual e espectrofotométrica, os testes foram preparados inicialmente para as cepas padrão.

Para o método NCCLS os testes foram preparados em placas de fundo “U” e também fundo “chato” para permitir ambas as leituras (visual e espectrofotométrica). Estas foram realizadas nos comprimentos de onda de 450nm a 350 nm, com a obtenção dos resultados finais demonstrados na tabela 3.

Tabela 3- Dados da CIM para *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019, durante o processo de padronização de leituras.

CEPAS	CIM dos antifúngicos em µg/mL							
	Anfotericina		Itraconazol		Cetoconazol		Fluconazol	
	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST
<i>C.parapsilosis</i> ATCC 22019	0,500	0,500	0,060	<0,060	<0,060	0,060	1,000	0,500
<i>C.krusei</i> ATCC 6258	1,000	0,500	0,060	<0,06	0,125	0,125	64,000	128,000

Para realização do cálculo do tamanho amostral para proporção, inicialmente foi necessário determinar o intervalo entre as CIMs obtidas para ambas as metodologias, frente às drogas em teste, para 10 cepas de cada uma das espécies mais frequentemente isoladas.

Estes dados preliminares são visualizados na tabela 4.

Tabela 4- Intervalos de CIM obtidos para as primeiras 10 cepas avaliadas frente aos antifúngicos, empregando-se as metodologias NCCLS e EUCAST.

Espécies	CIM Antifúngicos em µg/ml							
	Anfotericina B		Itraconazol		Cetoconazol		Fluconazol	
	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST
<i>C.albicans</i>	0,12-0,50	0,25-0,50	<0,06-0,12	<0,06-0,12	<0,06	<0,06-0,50	<0,25	<0,25-1,00
<i>C.tropicalis</i>	0,50-2,00	0,50-1,00	0,12-32,00	<0,06-32,00	<0,06-1,00	<0,06-1,00	0,25-8,00	0,50-16,00
<i>C.glabrata</i>	0,50-2,00	0,50-2,00	0,25-0,50	0,12-0,50	0,50-2,00	0,25-1,00	0,50-1,00	<0,25-0,50
<i>C.krusei</i>	0,25-2,00	0,50-2,00	0,12-0,25	0,25-0,50	0,50-1,00	0,25-1,00	16,00≥64,00	16,00≥64,00
<i>C.parapsilosis</i>	0,25-0,50	0,25-0,50	<0,12	<0,12	<0,06	<0,06	<0,12-64,00	0,25-64,00

De posse destes resultados, foi matematicamente determinado que o número ideal de cepas a serem analisadas para cada espécie seria de 35. Assim, mais 25 cepas de cada espécies foram avaliadas.

A concordância entre as duas metodologias foi calculada com intervalos de 95% de confiança e para comparação do número de diluições entre os métodos, foi aplicado o teste de Wilcoxon para amostras relacionadas. O nível de significância adotado foi de 5%.

Os dados brutos dos resultados de CIM obtidos para cada cepa encontram-se nos anexo 2 a 6. A comparação estatística entre os dados de CIM obtidos por meio de ambas as metodologia avaliadas encontram-se nas tabelas de 5 a 8. As leituras, visual e espectrofotométrica realizadas para cada metodologia foram idênticas. Deste modo, não foram elaboradas tabelas diferenciadas.

Tabela 5- Análise descritiva da comparação entre os resultados de CIM obtidos para as metodologias NCCLS e EUCAST frente a Anfotericina B. Foram consideradas a concordância exata e a diferença de até duas diluições, de forma isolada (linha a) e de forma acumulativa (linha b).

Espécies	Concordância entre as metodologias NCCLS e EUCAST			
	Exato n(%)	Diferença de 1 diluição n(%)	Diferença de 2 diluições n(%)	Total
<i>C.albicans</i>	(a)15 (44,12)	(a)15 (44,12) (b) 30(88,24)	4 (11,76) 34(100,00)	34
<i>C.glabrata</i>	14 (40,00)	17 (48,57) 31(88,31)	4 (11,43) 35(100,00)	35
<i>C.krusei</i>	20 (57,14)	14 (40,00) 34(97,14)	1 (2,86) 35(100,00)	35
<i>C.parapsilosis</i>	15 (42,60)	10 (28,57) 25 (71,17)	10 (28,57) 35 (100,00)	35
<i>C.tropicalis</i>	14 (38,89)	13 (36,11) 27(75,00)	9 (25,00) 36(100,00)	36
Total	78(44,50)	69(39,40) 147(84,00)	28(16,00) 175(100,00)	175

Tabela 6- Análise descritiva da comparação entre os resultados de CIM obtidos para as metodologias NCCLS e EUCAST frente a Itraconazol. Foram consideradas a concordância exata e a diferença de até três diluições, de forma isolada (linha a) e de forma acumulativa (linha b).

Concordância entre as metodologias NCCLS e EUCAST					
Espécies	Exato n(%)	Diferença de 1 diluição n(%)	Diferença de 2 diluições n(%)	Diferença de 3 diluições n(%)	Total
<i>C.albicans</i>	(a)19 (55,88)	(a)6 (17,65) (b)25(73,53)	2 (5,88) 27(79,41)	7 (20,59) 34(100,00)	34
<i>C.glabrata</i>	21 (60,00)	13 (37,14) 34(97,14)	1(2,80) 35(100,00)	0 (0,00)	35
<i>C.krusei</i>	18 (51,43)	8 (22,86) 26(74,29)	9 (25,71) 34(100,00)	0 (0,00) 0 (0,00)	35
<i>C.parapsilosis</i>	31 (88,57)	4 (11,43) 35(100,00)	0 (0,00) 0(0,00)	0 (0,00) 0 (0,00)	35
<i>C.tropicalis</i>	17 (47,22)	13 (36,11) 30(83,33)	6 (16,67) 36(100,00)	0 (0,00) 0(0,00)	36
Total	106(60,50)	44(25,00) 151(85,50)	18(10,28) 169(95,85)	7(4,00) 175(100,00)	175

Tabela 7- Análise descritiva da comparação entre os resultados de CIM obtidos para as metodologias NCCLS e EUCAST frente a Cetoconazol. Foram consideradas a concordância exata e a diferença de até quatro diluições, de forma isolada (linha a) e de forma acumulativa (linha b).

Concordância entre as metodologias NCCLS e EUCAST						
Espécies	Exato n(%)	Diferença de 1 diluição n(%)	Diferença de 2 diluições n(%)	Diferença de 3 diluições n(%)	Diferença de 4 diluições n(%)	Total
<i>C.albicans</i>	(a)26 (76,47)	(a)3 (8,82) (b)29(85,30)	1 (2,94) 30(88,30)	2 (5,88) 32(94,10)	2 (5,88) 34(100,00)	34
<i>C.glabrata</i>	10 (28,57)	14 (40,00) 24(68,57)	10 (28,57) 34(97,14)	0 (0,00) 0 (0,00)	1 (2,86) 35(100,00)	35
<i>C.krusei</i>	10(28,57)	21 (60,00) 31(88,57)	4 (11,43) 35(100,00)	0 (0,00) 0 (0,00)	0 (0,00) 0 (0,00)	35
<i>C.parapsilosis</i>	30(85,71)	2 (5,71) 32(91,40)	3 (8,57) 35(100,00)	0 (0,00) 0 (0,00)	0 (0,00) 0 (0,00)	35
<i>C.tropicalis</i>	21 (58,33)	7 (19,44) 28(77,80)	3 (8,33) 31(86,10)	3 (8,33) 34(94,40)	2 (5,56) 36(100,00)	36
Total	97(55,40)	47(26,85) 144(82,30)	21(12,00) 165(94,30)	5(2,85) 170(97,00)	5(2,85) 175(100,00)	175

Tabela 8- Análise descritiva da comparação entre os resultados de CIM obtidos para as metodologias NCCLS e EUCAST frente a Fluconazol. Foram consideradas a concordância exata e a diferença de até cinco diluições, de forma isolada (linha a) e de forma acumulativa (linha b).

Concordância entre as metodologias NCCLS e EUCAST						
Espécies	Exato n(%)	Diferença de 1 diluição n(%)	Diferença de 2 diluições n(%)	Diferença de 3 diluições n(%)	Diferença de 4 diluições n(%)	Total
<i>C.albicans</i>	(a)21(61,76)	(a)9 (26,47)	3 (8,82)	0 (0,00)	1 (2,94)	34
		(b)30(88,23)	33(97,10)	0 (0,00)	34(100,00)	
<i>C.glabrata</i>	19(54,30)	10 (28,57)	6 (17,14)	0 (0,00)	0 (0,00)	35
		29(82,86)	35(100,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	
<i>C.krusei</i>	14(40,00)	20 (57,14)	2 (5,70)	0 (0,00)	0 (0,00)	35
		33(94,20)	35(100,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	
<i>C.parapsilosis</i>	28(80,00)	2 (5,71)	2 (5,71)	2 (5,71)	1 (2,86)	35
		30(85,71)	32(91,42)	34(97,10)	35(100,00)	
<i>C.tropicalis</i>	18(50,00)	9 (25,00)	9 (25,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	36
		27(75,00)	36(100,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	
Total	100(57,10)	50(28,57)	22(12,57)	2(1,40)	2(1,14)	175
		149(85,14)	171(97,70)	173(98,80)	175(100,00)	

Nas tabelas de 5 a 8, foram consideradas as diferenças entre CIM sem considerar qual a metodologia revelou as diferenças mais altas. Para isto, foram preparadas as tabelas de 9 a 12, onde é possível notar o número exato e a porcentagem de cepas para as quais as CIMs do NCCLS e EUCAST foram iguais, onde as CIMs do EUCAST foram mais altas do que pelo NCCLS e também ao contrário, onde as CIMs do NCCLS foram mais altas do que pelo EUCAST.

Tabela 9- Distribuição da diferença em diluições entre os métodos (EUCAST e NCCLS) para diferentes espécies frente a Anfotericina B

Métodos	Diferença em diluições dos resultados de CIM	Número de cepas de cada espécie para as quais foram observadas as diferenças de diluições na CIM					Total
		<i>C.albicans</i> (n/%)	<i>C.glabrata</i> (n/%)	<i>C.krusei</i> (n/%)	<i>C.parapsilosis</i> (n/%)	<i>C.tropicalis</i> (n/%)	
EUCAST > NCCLS	2	1	1	1	2	0	5
		0,57 ^a	0,57	0,57	1,14	0,00	2,86
		2,94 ^b	2,86	2,86	5,71	0,00	0,00
	1	61,77 ^c	54,28	68,57	71,43	0,00	60,57
		5	4	3	8	3	23
		2,86	2,28	1,71	4,57	1,71	13,14
NCCLS = EUCAST	0	14,71	11,42	8,57	22,86	8,33	0,00
		58,83	51,42	65,71	65,72	47,22	57,71
		15	14	20	15	14	78
	1	8,57	8,00	11,43	8,57	8,00	44,57
		44,12	40,00	57,14	42,86	38,89	
NCCLS > EUCAST	1	10	13	11	2	10	46
		5,71	7,42	6,29	1,14	5,71	26,28
		29,41	37,14	31,43	5,71	27,78	0,00
	2	73,53	77,14	88,57	48,57	66,67	70,85
		3	3	0	8	9	23
		1,71	1,71	0,00	4,57	5,14	13,14
Total de cepas avaliadas	8,82	8,57	0,00	22,86	25,00	0,00	
	82,5	85,71	0,00	71,43	91,67	83,99	
	34	35	35	35	36	175	

(a)= porcentagem frente ao total de cepas avaliadas; (b)=porcentagem relativa dentro da espécie;

(c) porcentagem acumulativa da coluna.

Tabela 10- Distribuição da diferença em diluições entre os métodos (EUCAST e NCCLS) para diferentes espécies frente a Itraconazol

Métodos	Diferença em diluições dos resultados de CIM	Número de cepas de cada espécie para as quais foram observadas as diferenças de diluições na CIM					Total
		<i>C.albicans</i>	<i>C.glabrata</i>	<i>C.krusei</i>	<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.tropicalis</i>	
		(n/%)	(n/%)	(n/%)	(n/%)	(n/%)	
EUCAST > NCCLS	2	0	0	1	0	2	3
		0,00 ^a	0,00	0,57	0,00	1,14	1,71
		0,00 ^b	0,00	2,86	0,00	5,56	0,00
	1	0,00 ^c	0,00	68,58	0,00	69,45	73,14
		3	3	5	2	6	19
		1,71	1,71	2,86	1,14	3,43	10,86
NCCLS = EUCAST	0	8,82	8,57	14,29	5,71	16,67	0,00
		64,79	77,14	65,72	94,28	63,89	71,43
		19	21	18	31	17	106
	1	10,86	12,00	10,29	17,71	9,71	60,57
		55,88	60,00	51,43	88,57	47,22	
		3	11	3	2	7	26
NCCLS > EUCAST	1	1,71	6,28	1,71	1,14	4,00	14,85
		8,82	31,42	8,57	5,71	19,44	0,00
		64,7	91,42	60,00	94,28	66,66	75,42
	2	2	0	8	0	4	14
		1,14	0,00	4,57	0,00	2,29	8,00
		5,88	0,00	22,86	0,00	11,11	0,00
Total de cepas avaliadas	3	70,58	0,00	82,86	0,00	77,77	83,42
		7	0	0	0	0	7
		4,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,00
		20,59	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		91,17	0,00	0,00	0,00	0,00	87,42
		34	35	35	35	36	175

(a)= porcentagem frente ao total de cepas avaliadas; (b)=porcentagem relativa dentro da espécie; (c) porcentagem acumulativa da coluna.

Tabela 11- Distribuição da diferença em diluições entre os métodos (EUCAST e NCCLS) para diferentes espécies frente ao Cetoconazol

Métodos	Diferença em diluições dos resultados de CIM	Número de cepas de cada espécie para as quais foram observadas as diferenças de diluições na CIM					Total
		<i>C.albicans</i> (n/%)	<i>C.glabrata</i> (n/%)	<i>C.krusei</i> (n/%)	<i>C.parapsilosis</i> (n/%)	<i>C.tropicalis</i> (n/%)	
EUCAST > NCCLS	4	2	0	0	0	2	4
		1,14 ^a	0,00	0,00	0,00	1,14	2,29
		5,88 ^b	0,00	0,00	0,00	5,56	0,00
		88,23 ^c	0,00	0,00	0,00	0,00	68,58
	3	0	0	0	0	1	1
		0,00	0,00	0,00	0,00	0,57	0,57
		0,00	0,00	0,00	0,00	2,78	0,00
						80,55	66,29
	2	1	1	0	0	3	5
		0,57	0,57	0,00	0,00	1,71	2,86
		2,94	2,86	0,00	0,00	8,33	0,00
		82,35	45,72			77,77	65,72
	1	1	5	2	1	4	13
		0,57	2,86	1,14	0,57	2,29	7,43
		2,94	14,29	5,71	2,86	11,11	0,00
		79,41	42,86	34,28	88,57	69,44	62,86
NCCLS = EUCAST	0	26	10	10	30	21	97
		14,86	5,71	5,71	17,14	12,00	55,43
		76,47	28,57	28,57	85,71	58,33	
NCCLS > EUCAST	1	2	9	19	1	3	34
		1,14	5,14	10,86	0,57	1,71	19,43
		5,88	25,71	54,29	2,86	8,33	0,00
		82,35	54,28	82,86	88,57	66,66	74,86
	2	0	9	4	3	0	16
		0,00	5,14	2,29	1,71	0,00	9,14
		0,00	25,71	11,43	8,57	0,00	0,00
		0,00	80,00	94,29	97,14	0,00	84,00
	3	2	0	0	0	2	4
		1,14	0,00	0,00	0,00	1,14	2,29
		5,88	0,00	0,00	0,00	5,56	0,00
		88,23				72,22	86,29
	4	0	1	0	0	0	1
		0,00	0,57	0,00	0,00	0,00	0,57
		0,00	2,86	0,00	0,00	0,00	
			82,86				
Total de cepas avaliadas		34	35	35	35	36	175

(a)= porcentagem frente ao total de cepas avaliadas; (b)=porcentagem relativa dentro da espécie; (c) porcentagem acumulativa da coluna.

Tabela 12- Distribuição da diferença em diluições entre os métodos (EUCAST e NCCLS) para diferentes espécies frente ao Fluconazol

Métodos	Diferença em diluições dos resultados de CIM	Número de cepas de cada espécie para as quais foram observadas as diferenças de diluições na CIM					Total
		<i>C.albicans</i> (n/%)	<i>C.glabrata</i> (n/%)	<i>C.krusei</i> (n/%)	<i>C.parapsilosis</i> (n/%)	<i>C.tropicalis</i> (n/%)	
EUCAST > NCCLS	5	1	0	0	1	0	2
		0,57 ^a	0,00	0,00	0,57	0,00	1,14
		2,94 ^b	0,00	0,00	2,86	0,00	0,00
	3	94,1 ^c			94,29		87,42
		0	0	0	2	0	9
		0,00	0,00	0,00	1,14	0,00	5,14
	2	0,00	0,00	0,00	5,71	0,00	0,00
					91,43		86,28
		3	1	1	1	7	21
	1	1,71	0,57	0,57	0,57	4,00	12,00
		8,82	2,86	2,85	2,86	19,44	0,00
		91,16	60,00	59,99	85,72	90,00	81,14
	0	7	1	6	1	7	22
		4,00	0,57	3,42	0,57	4,00	12,57
		20,59	2,86	17,14	2,86	20,59	0,00
NCCLS = EUCAST	0	82,34	57,15	57,14	82,86	70,59	69,71
		21	19	14	28	18	100
		12,00	10,86	8,00	16,00	10,29	57,14
NCCLS > EUCAST	1	61,76	54,29	40,00	80,00	50,00	
		2	9	14	1	2	28
		1,14	5,14	8,00	0,57	1,14	16,00
		5,88	25,71	40,00	2,86	5,56	0,00
	2	67,64	80,00	80,00	82,86	55,56	73,14
		0	5	0	1	5	11
		0,00	2,86	0,00	0,57	2,86	6,28
		0,00	14,29	0,00	2,86	13,89	0,00
Total de cepas avaliadas		34	35	35	35	36	175

(a)= porcentagem frente ao total de cepas avaliadas; (b)=porcentagem relativa dentro da espécie; (c) porcentagem acumulativa da coluna.

A fim de tentar interpretar os resultados de CIM obtidos para as 175 cepas estudadas, estas foram classificadas, independentemente da metodologia empregada no teste, como sensível, sensível-dose-dependente e resistente de acordo com Rex et al, 1997(tabelas 13 e 15).

Tabela 13- Interpretação dos testes de suscetibilidade das cepas de *Candida* frente ao Fluconazol

Espécies	Sensível		Sensível-dose-dependente		Resistente	
	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
<i>C.albicans</i>	34(100,0)	34(100,0)	0	0	0	0
<i>C.glabrata</i>	34(97,1)	34(97,1)	0	0	1(2,9)	1(2,9)
<i>C.parapsilosis</i>	34(97,1)	34(97,1)	0	0	1(2,9)	1(2,9)
<i>C.krusei</i>	0	0	25(71,4)	28(80,0)	10(28,6)	7(20,0)
<i>C.tropicalis</i>	35(97,2)	34(94,4)	1(2,8)	2(5,6)	0	0

Tabela 14- Interpretação dos testes de suscetibilidade das cepas de *Candida* frente a Itraconazol (REX et al, 1997)

Espécies	Sensível		Sensível-dose-dependente		Resistente	
	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
<i>C.albicans</i>	34(100,0)	34(100,0)	0	0	0	0
<i>C.glabrata</i>	0	0	1(14,3)	3(28,6)	34(85,8)	32(65,8)
<i>C.parapsilosis</i>	33(94,3)	35(100,0)	2(5,7)	0	0	0
<i>C.krusei</i>	6(17,1)	14(40,0)	28(80,0)	19(54,3)	1(2,9)	2(5,7)
<i>C.tropicalis</i>	7(19,4)	10(27,7)	7(19,4)	5(13,8)	22(61,1)	21(58,3)

Tabela 15- Interpretação dos testes de suscetibilidade das cepas de *Candida* frente a Anfotericina B (REX et al, 1997)

Espécies	Sensível		Resistente	
	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
<i>C.albicans</i>	34(100,0)	34(100,0)	0	0
<i>C.glabrata</i>	31(71,4)	34(97,1)	4(28,6)	1(2,86)
<i>C.parapsilosis</i>	22(62,9)	28(80,0)	13(37,1)	7(20,0)
<i>C.krusei</i>	20(57,1)	27(77,1)	15(42,9)	8(22,9)
<i>C.tropicalis</i>	27(75,0)	36(100,0)	9(25,0)	0

5- DISCUSSÃO

Infecções sistêmicas por leveduras são responsáveis por alta mortalidade entre os pacientes imunossuprimidos, submetidos a cuidados intensivos, pós-cirúrgicos, e pacientes neutropênicos (FIDEL et al., 1999; UZUM et al., 2000).

As espécies de *Candida* são mais frequentemente isoladas da cavidade oral e são detectadas como colonizantes em aproximadamente 31 a 55% dos indivíduos saudáveis. Os índices de colonização aumentam de acordo com a severidade da doença e tempo de hospitalização. *Candida albicans* é isolada em cerca de 70 a 80% dos pacientes infectados, enquanto que, o isolamento de outras espécies de *Candida* era pouco frequente. Entretanto, dados mais recentes, relatam um aumento no isolamento de espécies não albicans, especialmente de *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (TESTORE et al., 2004).

Neste estudo, de janeiro de 1999 a dezembro de 2003, 3.926 cepas de *Candida* foram isoladas, a partir de espécimes clínicos de 3.297 pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Unicamp. *Candida albicans* foi o microrganismo mais frequentemente isolado 64,4%, seguido de *C.tropicalis* com 11,8%, *C.glabrata* com 10,8%, *C.parapsilosis* com 6,5% e 3,5% de *C. krusei*, como demonstrado na figura 1.

Candida glabrata sempre foi considerada uma levedura saprófita, relativamente não patogênica, componente da microbiota de indivíduos saudáveis e, raramente, agente causal de infecções sistêmicas em humanos. Atualmente, na dependência do local da infecção, pode ser considerada a terceira espécie mais comumente isolada. Neste estudo o isolamento de *C.glabrata* também ocupa o terceiro lugar, presente em 10,8% dos isolamentos.

Embora sejam muito variáveis as doenças de base dos pacientes envolvidos neste estudo, foi possível perceber uma maior quantidade de isolados de *Candida albicans* 64,4%, seguidos de *Candida tropicalis* 11,8%, *Candida glabrata* 10,8% e *Candida parapsilosis* 6,5%. Tal prevalência se aproxima dos padrões observados em outros hospitais da América Latina, onde em hemoculturas, *C.albicans* predomina com 51,6% seguida da *C.parapsilosis* com 25,8%, *C.tropicalis* 13,3%, *C.glabrata* 3,3%(ANTUNES et al.,2004).

As clínicas que obtiveram o maior número de isolamentos de cepas de *Candida* a partir de espécies clínicas de seus pacientes foram: medicina interna (15,6%), pneumonologia (13,9%), neonatologia (10,1%), gastroenterologia (8,5%), pronto socorro (7,6%), pediatria (6,4%) e moléstias infecciosas (6,3%) (Figura 2).

Neste estudo com os pacientes hospitalizados no HC – UNICAMP, cepas de *C. albicans* foram mais isoladas de escarro (34,8%), urina (20,5%), lavado brônquico (11,6%) e swab perineal (8,3%), *Candida parapsilosis* está mais frequentemente relacionada a presença de catéteres (10,0%) e hemoculturas (24,1%), enquanto que *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, foram mais frequentes em urina, com 50,0%, 35,0% e 33,3% respectivamente (Tabela 2).

Quanto ao isolamento das diferentes espécies de *Candida* dos pacientes das diversas especialidades médicas do hospital, *C. albicans* foi mais frequentemente isolada de pacientes da pneumologia (15,5%), *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* de pacientes da medicina interna com 22,1%, 21,1% e 19,9% dos isolados respectivamente e *C. parapsilosis* com 14% dos isolamentos de pacientes da dermatologia (Tabela 3).

Anteriormente ao desenvolvimento dos azóis, havia pouca necessidade clínica para os testes de suscetibilidade. O uso de drogas sistêmicas no tratamento de infecções fúngicas, como anfotericina B, introduzida nos anos 50, era relativamente simples. Com o advento da 5-flucitosina, nos anos 70 e subseqüentemente dos azóis nos anos 80 e 90, a situação se tornou mais complexa (DENNING et al., 1997).

Atualmente, o uso de antifúngicos profiláticos, tem sido cada vez mais difundido, especialmente entre pacientes imunossuprimidos, para redução da colonização e na tentativa de prevenir as infecções sistêmicas. Tal procedimento, porém, aumenta a necessidade de uma avaliação do perfil de suscetibilidade das cepas isoladas, a fim de acompanhar o desenvolvimento de resistência. Deste modo, as técnicas padronizadas pelo NCCLS (TESTORE et al., 2004) têm sido as mais utilizadas, embora algumas variáveis pré-analíticas ainda possam ser questionadas.

Este trabalho buscou avaliar comparativamente estas variáveis pré-análíticas, por meio da realização concomitante de uma técnica semelhante proposta por um órgão, Europeu, o EUCAST (European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing) (CUENCA-ESTRELA et al., 2002).

Ambas as técnicas são bastante semelhantes em vários aspectos (Quadro1), diferenciando-se essencialmente na concentração do inóculo final, que para NCCLS é $0,5 - 2,5 \times 10^3$ UFC/mL, enquanto para o EUCAST é de $0,5 - 2,5 \times 10^5$ UFC/mL. O período de incubação do teste é de 24 horas para o EUCAST, uma vez que um inóculo maior permite uma leitura mais rápida. São necessárias leituras de 24 a 48 horas para o teste realizado de acordo com o NCCLS.

As placas de microtitulação utilizadas para o EUCAST, são de “fundo chato”, para permitir leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm. Para o NCCLS as microplacas são de “fundo U”, que permitem leitura visual. No documento M27 A2, a leitura espectrofotométrica já é discutida (CUENCA-ESTRELA et al., 2002; NCCLS M27 A2, 2002).

Neste trabalho, as leituras para o NCCLS foram realizada tanto visual quanto espectrofotometricamente. As leituras não foram relatadas em diferentes tabelas uma vez que resultaram em CIM iguais.

Para este estudo, foram realizados testes de suscetibilidade para 175 cepas selecionadas dentre as cepas isoladas a partir de cultura de sangue, cateter e urina: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* para ambas metodologias. Nos anexos 2 a 6 estão relatados todos os resultados de CIM para as quatro drogas avaliadas para todas as cepas de cada uma das espécies.

Para o início do estudo comparativo foram avaliadas, por ambas as metodologias, as cepas padrão ATCC preconizadas para uso no controle de qualidade dos testes (tabela 4), podendo-se observar, uma boa correlação entre os resultados obtidos com duas metodologias. Neste momento, também foi realizada a metodologia NCCLS em placas de fundo chato, para avaliação da leitura. Para preparação do inóculo, utilizou-se a contagem em câmara para garantia de concentração fixa: sempre 1×10^3 UFC/mL para NCCLS e 1×10^5 UFC/mL para EUCAST.

Para determinação do número ideal de cepas teste para permitir uma comparação estatística adequada entre as duas metodologias, inicialmente o teste foi realizado para 10 cepas de cada espécie. Pelo intervalo de variação entre as CIM obtidas, foi calculado o “n” de cada espécie. Estes dados encontram-se na tabela 5.

Deste modo, foram avaliadas ao todo 35 cepas $\pm$ 1 de cada espécie, para ambas as metodologias, NCCLS e EUCAST.

Nas tabelas de 6 a 9, constam as análises descritivas da comparação entre os resultados de CIM obtidos para as duas metodologias, considerando-se a concordância exata entre as metodologias e até 4 diluições de diferença.

Tomando-se apenas a concordância exata entre as 2 metodologias, os melhores resultados foram obtidos para as cepas de *C. parapsilosis* frente a itraconazol (88,57%) (Tabela 7) e cetoconazol (85,71%) (Tabela 8).

Considerando a diferença de até 1 diluição e apenas resultados que apontaram acima de 90% de concordância, os melhores dados foram obtidos para *C.krusei* frente a anfotericina B (97,14%) (Tabela 6) e fluconazol (94,2%) (Tabela 9), *C.glabrata* frente a itraconazol (97,14%) (tabela 7) e *C.parapsilosis* frente a itraconazol (100,0%) (Tabela 7) e cetoconazol (91,4%) (Tabela 8).

Com até 2 diluições de diferença, os melhores resultados foram obtidos frente a anfotericina B com 100,0% de concordância, para todas as espécies avaliadas (Tabela 6). Para itraconazol 100% de concordância entre as metodologias foi obtida frente a *C.glabrata*, *C.krusei* e *C.tropicalis*, aceitando-se a diferença de 2 diluições (Tabela 7). Na tabela 8 pode-se observar que 100% de concordância somente foi possível para as cepas de *C.parapsilosis* e *C.krusei*, frente a cetoconazol. Frente a fluconazol, aceitando-se até 2 diluições de diferença entre as CIM de ambas as metodologias, apenas para *C.albicans* a concordância foi de 97,1 ao invés de 100,0% (Tabela 9).

Outros autores, comparando estas metodologias (CUENCA-ESTRELLA et al., 2002), consideram apenas diferenças de até, no máximo, 2 diluições, obtendo concordâncias de 80,7 – 100%, por agente antifúngico. Neste trabalho, nas mesmas condições, as variações foram de 79,1 a 100%.

Na tentativa de selecionar o método mais confiável em cada uma das situações, considerando para tal a metodologia que oferecia resultados de CIM mais altos, foram elaboradas tabelas de 10 a 13.

Nestas tabelas, estão destacados os valores de concordância exata entre as CIMs obtidas por ambas as metodologias (NCCLS=EUCAST), já citados nas tabelas anteriores e também é possível visualizar qual a metodologia que apresentou as CIMs mais altas, frente a cada valor de diferença entre as diluições. Assim, na tabela 10, quando houve para *C. albicans*, frente a anfotericina B, a diferença de até 1 diluição, a CIM obtida para o NCCLS foi correspondente a 73,53% das cepas, contra 58,83% do EUCAST. De modo geral pode-se observar que, para a maioria das drogas avaliadas, as CIMs mais altas foram obtidas com a metodologia NCCLS. Frente ao itraconazol (tabela 11) a exceção ocorreu com as cepas de *Candida krusei* apenas na avaliação de diferença de até uma diluição a favor da metodologia EUCAST. Para o cetoconazol (tabela 12) a exceção foi *Candida tropicalis* na avaliação de diferença de até uma e duas diluições a favor da metodologia EUCAST, e para o fluconazol (tabela 13) as exceções foram a *Candida albicans* e *Candida tropicalis* nas avaliações de diferença de até 2 diluições a favor da metodologia EUCAST.

De modo geral, os testes realizados com as cepas de *C. parapsilosis* foram os que apresentaram mais resultados homogêneos entre ambas as metodologias.

Este tipo de análise, não foi relatada, até o momento por outros autores.

Para a segurança do paciente, talvez seja importante considerar as CIMs mais altas. No entanto, qual destas CIMs tem melhor correlação com o que ocorre “in vivo”, ainda não se pode afirmar. Até mesmo os conceitos de sensibilidade e resistência ainda são bastante restritos (REX et al., 1997).

Na tentativa de estabelecer um parâmetro para interpretação dos testes de suscetibilidade, o NCCLS, propôs os seguintes valores de corte, para fluconazol, um microrganismo com $CIM \leq 8\mu\text{g/mL}$, é considerado sensível, entre 16 e $32\mu\text{g/mL}$, sensível-dose-dependente e, $\geq 64\mu\text{g/mL}$, é considerado resistente. Para itraconazol, $CIM \leq 0,12\mu\text{g/mL}$ indica sensibilidade, entre 0,25-0,5 $\mu\text{g/mL}$, sensível-dose-dependente e

$\geq 1\mu\text{g/mL}$ resistente. De acordo com a literatura frente a anfotericina B, aproximadamente 94% das espécies de *Candida* são inibidas numa concentração de $1\mu\text{g/mL}$ (PFALLER *et al.*, 2000 e REX *et al.*, 2000).

Levando-se em consideração a recomendação do documento NCCLS M27 – A2 (2002) as 175 cepas avaliadas foram classificadas quanto à sua suscetibilidade, frente aos resultados obtidos para as duas metodologias empregadas (tabelas 14 a 16).

Frente ao fluconazol (tabela 14), os resultados foram bastante concordantes, exceto para *C. krusei*, onde a metodologia NCCLS revelou cepas mais resistentes. Para o itraconazol (tabela 15), de modo geral, a metodologia NCCLS apontou cepas mais resistentes. Frente a anfotericina B (tabela 16) as cepas menos sensíveis foram observadas pela metodologia NCCLS, com exceção da *Candida albicans*.

Avaliando os dados de CIM frente a itraconazol e anfotericina B, as cepas menos sensíveis foram reveladas pelo NCCLS. Dados estes, compatíveis com os observados nas tabelas de 9 a 12.

Candida albicans, que tem sido o patógeno mais frequentemente isolado em infecções fúngicas, é comumente sensível às drogas disponíveis. Por sua vez, algumas espécies apresentam resistência intrínseca, não dependente da exposição à droga. Por exemplo, *C. krusei*, que possui CIM bastante alta para o fluconazol. Similarmente, a CIM frente ao fluconazol para cepas de *C. glabrata* pode ser associada com suscetibilidade intermediária ou resistência, quando estas são isoladas de pacientes submetidos a profilaxia com este antifúngico (SILVA, 2001). Mesmo que inicialmente sensível ao fluconazol, pode rapidamente se tornar resistente a esse agente durante a terapia. Falha clínica associada com desenvolvimento de resistência a anfotericina B é principalmente limitada a cepas de *C. lusitaniae* (DENNING *et al.*, 1997; FAVEL *et al.*, 2000).

Do ponto de vista clínico, cepas consideradas resistentes microbiologicamente, podem responder perfeitamente a um tratamento, pois a concentração do fármaco no local da infecção pode ser muito mais elevada que a CIM daquele organismo. Uma cepa é resistente a um antimicrobiano quando a CIM é mais elevada que o habitual para aquela

determinada espécie. Para definir a CIM habitual, é necessário realizar testes de suscetibilidade e determinar qual é a distribuição e a moda das CIM (valor que se repete o maior número de vezes) (TUDELA *et al.*, 2001).

A suscetibilidade “in vitro” para diferentes espécies de *Candida* frente a anfotericina B, fluconazol, itraconazol e cetoconazol, tem sido estudada por muitos pesquisadores. O largo valor obtido para maioria das espécies apresenta uma variedade na resposta “in vitro” para as drogas mais comuns usadas nas instituições médicas. Segundo a literatura, a CIM de anfotericina B frente a *C. parapsilosis* pela técnica de microdiluição em caldo é de 0,25 a 2,0µg/mL, para fluconazol, de 0,5 a 4,0µg/mL, para itraconazol, de 0,12 a 0,5µg/mL e para o cetoconazol, de 0,03 a 0,25µg/mL (NCCLS M27-A2, 2002).

De modo geral, os valores de CIM por microdiluição em caldo, neste estudo, encontra-se em acordo com a literatura (CUENCA-ESTRELLA, *et al.*, 2002).

Em nossa instituição o Hospital das Clínicas da Unicamp, considerado uma instituição de atendimento terciário que atende a um grande número de pacientes que fazem uso de antifúngicos, o índice de resistência das cepas isoladas. Frente ao fluconazol o índice de resistência é de 6,8%, para metodologia NCCLS e de 5,1% para EUCAST. Frente ao itraconazol é de 32,6% para metodologia NCCLS e de 31,4% para o EUCAST. E frente a anfotericina B foi de 23,4% para NCCLS e de 9,1% para EUCAST.

De modo geral, os dados de sensibilidade e resistência são compatíveis com os obtidos por PFALLER *et al.*, 2000 e REX *et al.*, 2000.

Finalmente, após todas estas análises, um procedimento mais adequado à rotina de um laboratório de microbiologia, estaria assim constituído:

- Meio de cultura: RPMI 2% glicose com 0,165m MPOS pH 7,0;
- Temperatura de incubação: 35° C;
- Inóculo: 0,5 a 2,5 x 10³ UFC/mL;
- Tipo de placa de microtitulação: fundo chato

As leituras seriam realizadas após 24 h e 48 h de incubação, com a determinação da CIM por espectrofotometria, considerando para anfotericina B, redução da DO em 95% e para os azóis, redução da DO em 50%.

A necessidade de realização de testes de suscetibilidade a antifúngicos é incontestável, no entanto, vários critérios devem ser observados para que os resultados possam ser adequadamente utilizados. Entretanto, a metodologia mais adequada, independentemente de suas dificuldades técnicas, será aquela que permitir a obtenção da melhor correlação de resultados “in vivo e” in vitro”.

6- CONCLUSÕES

- Cepas de *Candida albicans* prevaleceram sobre as demais espécies, embora exista um grande número de isolados de outras espécies.
- As clínicas de gastroenterologia, medicina interna, neonatologia e pneumonologia foram as que mais se destacaram no isolamento de espécies de *Candida*.
- As espécies de *Candida* foram mais isoladas a partir de materiais clínicos como: escarro, urina, swab perineal e lavado brônquico.
- De modo geral, a correlação entre as duas metodologias foi de 80 - 100%, aceitando-se a diferença de até 2 diluições.
- Se forem consideradas as CIM altas mais seguras, para a maioria das drogas e cepas estudadas seria mais adequada a aplicação do método NCCLS.
- Existem prós e contras em ambas as metodologias avaliadas e talvez uma seleção de prós, de ambas, podem resultar em uma terceira, a mais adequada à realização rotineira e que permita um reduzido número de erros por fatores pré-analíticos.
- A melhor metodologia será aquela com aceitável correlação “in vitro”, “in vivo”, qualidade esta que, até o momento, nenhum dos protocolos propostos para avaliação de suscetibilidade a antifúngicos possui.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES AGV, PASQUALOTTO AC, DIAZ M C, AZEVEDO PAD', SEVREO LC – Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** **46 (5)**: 239-241, 2004.

ARTHINGTON-SKAGGS BA, LEE-YANG W, CIBLAK MA, FRADE J P, BRANDT ME, HAJJEH RA, HARRISON LH, SOFAIR AN, WARNOCK DW. COMPARISON OF Visual and Spectrophotometric Methods Of Broth Microdilution MIC End Point Determination And Evaluation Of A Sterol Quantitation Method For In Vitro Susceptibility Testing Of Fluconazole And Itraconazole Against Trailing And Nontrailing *Candida* Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **46(8)**:2477-2481.

BAUER AW, KIRBY WMM, SHERRIS, JC, TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Am.J.Clin.Pathol**, **45**: 493-96 1966.

CHRISTINE L & TERREL CL – antifungal agents: Part II – The Azoles. **Mayo Clin Proc** **74**: 78-100, 1999.

CUENCA-ESTRELLA M, DIAZ-GUERRA TM, MELLADO E, RODRIGUES-TUDELLA JL. Influence of glucose supplementation and inoculum size on growth kinetics and antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. **J.Clin.Microbiol.** **39(2)**: 525-32, 2001.

CUENCA-ESTRELLA M; LEE-YANG W; CIBLAK MA; SKAGGS BAA; MELLADO E; WARNOCK DW; TUDELA JLR. Comparative Evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST Broth Microdilution Procedures for Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Species. **Antimicrob. Agents Chemother**, **46(11)**:3644-7, 2002.

CUENCA-ESTRELLA M; MOORE CB; BARCHESI F; BILLE J; CHRYSSANTHOU E; DENNING DW; DONNELLY JP; DROMER F; DUPONT B; REX JH; RICHARDSON MD; SANCAK B; VERWEIJ PE; RODRIGUEZ-TUDELA JL. Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). **Clinical Microbiology e Infection** **9(6)**:467, 2003.

DA SILVA M – Estudo de prevalência e avaliação da suscetibilidade a antifúngicos de espécies de *Cândida* isoladas a partir de espécimes clínicos de pacientes portadores de malignidade hematológicas. – **Dissertação de mestrado da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2001.**

DRAGO M; SACLTRITO MM; MORACE G; GISIA-2 GROUP – In vitro activity of voriconazole and other antifungal agents against clinical isolates of *Candida glabrata* and *Candida krusei*. **EUR J Clin Microbiol Infect Dis 23(8): 619-24, 2004.**

DENNING DW; EVANS EG; KLIBBLER CC; RICHARDSON MD; ROBERTS MM; ROGERS TR; WARNOCK DW; WARREN RE – Guidelines for the Investigation of Invasive Fungal Infections in Hematological Malignancy and Solid Organ Transplantation. British Society for Medical Mycology. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis 16(6): 424-36, 1997.**

HECTOR RF. Compounds Active against Cell Walls of Medically Important Fungi. **Clinical Microbiology Reviews 6(1): 1-21, 1993.**

ELEWSKI BE; OHIO C; Mechanism of Action of Systemic Antifungal Agents. **J Am Acad Dermatol 28: 28-34, 1993.**

EPSTEIN JB; RANSIER A; LUNN R; CHIN E; JACOBSON JJ; REECE D; ARBOR A- Prophylaxis of Candidiasis in Patients with Leukemia and Bone Marrow Transplant. **Oral Sug Oral Med Pathol Oral Radiol Endod 81: 291-6, 1996.**

ESPINEL-INGROFF A; MOORE LS; GALGANI JN – Evaluation of 80% Inhibition Standards for the Determination of Fluconazole Minimum Inhibitory Concentration in Three Laboratories. **Diagn Microbiol Infect Dis 20: 81-86, 1994.**

ESPINEL-INGROFF A – Clinical Relevance of Antifungal Resistance. **Infect Dis Clin North Am 11(4): 929-44, 1997.**

ESPINELL-INGROFF A, BARTLETT M, BOWDEN R, CHIN NX, COOPER C, Jr, FOTHERGILL A, MCGINNIS MR, MENESES P, MESSER SA, NELSON PW, ODDS FC, PASARELLI L, PETER J, PFALLER MA, REX JH, RINALDI MG, SHANKLAND S, WALSH TJ, WEITZMAN I. Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. **J.Clin.Microbiol.**, **35**(1): 139-43, 1997.

ESPINELL-INGROFF A, KISH CW, KERKERING TM, FROMTLING RA, BARTIZAL K, GALGANI JN, VILLAREAL K, PFALLER MA, GERARDEN T, RINALDI MG. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution tests. **J.Clin.Microbiol.**, **30**(12):3138-45, 1992.

EUCAST Definitive Document E.DEF 1.2: Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Infect.**, **6**(9): 503-8, 2000.

EUCAST Definitive Document E.DEF 2.1: Determination of antimicrobial susceptibility test breakpoints. **Clin Microbiol.Infect.**, **6**(10): 570-2, 2000.

EUCAST Definitive Document E.DEF 3.1: Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. **Clin Microbiol.Infect.**, **6**(9): 509-15, 2000.

EWRIGHT WL; WENZEL RP- Nosocomial *Candida*- Epidemiology, Transmission and Prevention. **Infect Dis Clin North Am** **11**(2): 411-25, 1997.

FLEISS, JL. Statistical Methods for Rates and Proportions. 2^a Ed. **John Wiley & Sons Inc.** Nova Iorque.

FROMTLING RA, GALGANI JN, PFALLER MA. Multicenter evaluation of a broth macrodilution antifungal susceptibility test for yeasts. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **36**:39-45, 1993.

GODOY P;TIRABOSCHI IN; SEVERO LC; BUSTAMANTE B;CALVO B; ALMEIDA LP;DA MATTA DA; COLOMBO AL. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp.bloodstream isolates from Latin American hospitals. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **98(3)**:401-5, 2003.

HACEK DM, NOSKIN GA, TRAKAS K, PETERSON LR. Inicial use of a broth microdilution method suitable for in vitro testing of fungal isolates in a clinical microbiology laboratory. **J.Clin.Microbiol.**, **33(7)**: 1884-89, 1995.

HOVI L; PIHKALA UMS; VETTENRANTA K; SAXEN H – Invasive Fungal Infections in Pediatric Bone Marrow Transplant recipients: Single Center Experience of 10 Years. **Bone Marrow Transplant** **26**: 999-1004,2000.

KELLOG JA, MANZELLA JP, BANKERT DA. Frequency of low-level bacteriemia in children from birth to fifteen years of age. **J.Clin.Microbiol.**, **38(6)**: 2181-85, 2000.

LUNEL FMV; MEIS JFGM; VOSS A – Nosocomial Fungal Infections: Candidemia. **Diagn Microbiol Infect Dis** **34**: 213-20, 1999.

KLEPSE ME; LEWIS RE; PFALLER MA – Therapy of *Candida* Infections: Susceptibility Testing Resistance, and therapeutic Options. **Ann Pharmacother** **32**: 353-61, 1998.

GODOY P;TIRABOSCHI IN; SEVERO LC; BUSTAMANTE B; CALVO B; ALMEIDA LP; DA MATTA DA; COLOMBO AL – Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida spp.* bloodstream isolates from Latin American hospitals. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **98(3)**: 401-5, 2003.

LARONE DV – **Medically Important Fungi: a Guide to Identification**. 3rd Ed, Washington, American Society for Microbiology, 1995.

LUNEL FMV; MEIS JFGM; VOSS A. Nosocomial Fungal Infections:Candidemia. **Diagn Microbiol Infect Dis** **34**: 213-20,1999.

MURRAY PR - **Manual of Clinical Microbiology**. 7rd Ed, Washington, American Society for Microbiology, 1999.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27. NCCLS, Villanova, Pennsylvania, 1997.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2. NCCLS, Villanova, Pennsylvania, 2002.

PFALLER MA –Epidemiology of nosocomial candidiasis: the importance of molecular typing. **Braz.J.Infect.Dis.**, 4(4): 161-67, 2000.

PFALLER MA; REX JH; RINALDI MG – Antifungal Susceptibility Testing: Technical Advances and Potential Clinical Applications. **Clin Infect Dis** 24: 776-84, 1997.

PFALLER MA, MESSER AS, BOLMSTROM A, ODDS FC, REX JH. Multisite reproducibility of the Etest MIC method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. **J.Clin.Microbiol.**, 34(7): 1691-3, 1996.

PFALLER MA, RINALDI MG, GALGANI JN. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. **Antimicrob.Agents Chemother.**, 34:1648-54, 1990.

REX JH; WALSH TJ; SOBEL JD; FILLER SC; PAPPAS PG ; DISMUKES WE; EDWARDS JE – Practice Guidelines for the Treatment of Candidiasis. **Clin Infect Dis**30:662-78,2000.

REX JH, PFALLER MA, LANCASTER M, ODDS FC, BOLMSTROM A, RINALDI MG. Quality control guidelines for National Committee for Clinical laboratory standards-recommended broth macrodilution testing of ketoconazole and itraconazole. **J.Clin.Microbiol.**, 34(4): 816-17, 1996.

REX JH; PFALLER MA; GALGIANI JN; BARTLETT MS; INGROFF AE; GHANNOUM MA; LANCASTER M; ODDS FC; RINALDI MG; WALSH TJ; BARRY AL – Development of Interpretative Breakpoints for Antifungal Susceptibility Testing: Conceptual Framework and Analysis of In Vitro – In Vivo Correlation Data for Fluconazole, Itraconazole and *Candida* Infection. **Clin Infect Dis** 24: 235-47, 1997.

REX JH, PFALLER MA, RINALDI MG, POLAK A, GALGIANI, JN. Antifungal susceptibility testing. **Clin. Microbiol. Rev.**, 6: 367-381, 1993.

ROCCO RT; REINERT ES; SIMMS HH. Effects of Fluconazole Administration in Critically III Patients (Analysis of Bacterial and Fungal Resistance). **Arch Surg** 135: 160-65, 2000.

RODRIGUES TUDELLA JL, RODERO L, CUENCA-ESTRELLA M, CORDOBA S. III Curso Hispano-Argentino de Micologia Medica – Determinaciona de la Resistencia a los Antifúngicos en el laboratorio- Apostila de Curso, 2001.

RODRIGUEZ TUDELLA JL and MARTINEZ S. Improved medium for fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 38(1): 45-8, 1995.

RODRIGUEZ TUDELLA JL, BERENGUER JV, MARTINEZ S, SANCHEZ R. Comparison of a spectrophotometric microdilution method with RPMI-2% glucose with the National Committee for Clinical Laboratory Standards reference macrodilution method M27-P for in vitro susceptibility testing of amphotericin B, flucytosine and fluconazole against *Candida albicans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 40: 1998-2003, 1996.

SIDRIM JJC, MOREIRA JLB. Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica. 1ª Ed, Rio de Janeiro, Guanabara, 1999.

YOON AS, VAZQUEZ JA, STEFAN PE, SOBEL JD, AKINS RA. High-frequency in vitro reversible switching of *Candida lusitanae* clinical isolates from amphotericin susceptibility to resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 43(4): 836-45, 1999.

TOLLEMAR J; GROSS N; DOLGIRAS N; JARSTRAND C; RINGDÉN O; HAMARSTROM L – Fungal Prophylaxis by Reduction of Fungal Colonization by Oral Administration of Bovine anti-*Candida* Antibodies in Bone Marrow Transplant Recipients. **Bone Marrow Transplantation** **23**: 283-90, 1999.

TESTORE G P, DORI LUCA, BUNOMINI A R, SCHITO G C, SORO O, FORTINA G, ANDREONI S, CARLONE N, TULLIO V, ANDREONI M - *In vitro* fluconazole susceptibility of 1565 clinical isolates of *Candida* species evaluated by the disk diffusion method performed using NCCLS M44-A guidelines. **Diag. Microbiol. and Infec. Dis.** **50**: 187-192 (2004).

WRIGHT WL; WENZEL RP – Nosocomial *Candida* – Epidemiology, Transmission and Prevention. **Infect Dis Clin North Am** **11(2)**: 411-25, 1997.

8- ANEXOS

Anexo 1A - Dados de coleta e isolamento de leveduras do gênero *Candida* a partir de espécimes clínicos coletados de pacientes do HC-UNICAMP

Nº LIF	ROTINA	DATA	PACIENTE	HC	CLÍNICA	MATERIAL	D. CLÍNICOS	IDENTIFICAÇÃO
4862	18/1-ob	13/fev	CSO	824747-6	GO	urina	ni	<i>C. tropicalis</i>
4866	21-ob	13/fev	ECJ	499063-3	Neuro	urina	avc	<i>C. tropicalis</i>
4883	41/1-ob	27/fev	GR	834312-5	Trauma	sangue	sepse	<i>C. tropicalis</i>
4907	63-ob	10/mar	AMSP	834420-5	Trauma	urina	ni	<i>C. tropicalis</i>
4924	95/1-ob	24/mar	AAD	628958-7	UTI	sangue	ni	<i>C. tropicalis</i>
4931	100/1-ob	27/mar	EC	837467-7	Gastro	sangue	ni	<i>C. tropicalis</i>
5045	163-ob	29/abr	ACS	841245-4	Trauma	ponta de cateter	ni	<i>C. tropicalis</i>
5103	208-ob	16/mai	GGG	841614-8	Trauma	urina	ni	<i>C. tropicalis</i>
5182	1786	14/mai	DAJ	714359-8	Pediatria	urina	ITU	<i>C. tropicalis</i>
5204	247-ob	10/jun	CBH	774220-9	UTI	urina	sepse	<i>C. tropicalis</i>
5243	300-ob	14/jul	EHS	801252-0	neuro	ponta de cateter	ni	<i>C. tropicalis</i>
5588	406-ob	16/set	VSR	856047-2	Pediatria	urina	febre a/e	<i>C. tropicalis</i>
5598	416-2-ob	22/set	BAS	551066-6	Gastro	ponta de cateter	bact. Febre leucocitose	<i>C. tropicalis</i>
5624	450-1-ob	12/out	MVR	822964-2	Urologia	sangue	a/e	<i>C. tropicalis</i>
5924	542/03-ob	20/dez	ALBM	841720-3	Hemato	sangue	mm	<i>C. tropicalis</i>
5934	553/03-ob	30/dez	CPC	867921-7	Cir. trauma	ponta de cateter	ni	<i>C. tropicalis</i>
5824	522-1/03-ob	9/dez	JTS	856301-6	Urologia	sangue	ni	<i>C. tropicalis</i>
5810	499/03-ob	16/nov	JWN	851485-3	Gastro	sangue	ni	<i>C. tropicalis</i>

3076	472	4/fev	JS	7890555	Pneumo	Pta cateter	febre	<i>C. tropicalis</i>
3092	677-1OB	5/fev	GCS	7165449	Onco	Sangue	Neutropenia	<i>C. tropicalis</i>
3112	014-1OB	12/fev	FMNS	7913864	Caism	Sangue	febre	<i>C. tropicalis</i>
3249	83-OB	19/mar	SO	7966158	Ortop	Sangue	febre	<i>C. tropicalis</i>
3257	91-OB	26/mar	RJS	7975113	Neuro	Urina	Sc. Uretral	<i>C. tropicalis</i>
3261	96-OB	27/mar	NC	7121106	Cir. Vasc	Urina	a/e	<i>C. tropicalis</i>
3779	275-OB	28/jun	LJSO	6568604	Gastro	Sangue	febre	<i>C. tropicalis</i>
3796	296	5/jul	O A	8102602	Cardio	Sangue	Sepsis	<i>C. tropicalis</i>
3810	319-1	16/jul	A . N	6605943	Cir. Trauma	Sangue	febre	<i>C. tropicalis</i>
3952	369	5/ago	AAI	4320927	Neuro	Sangue	TCE	<i>C. tropicalis</i>
4080	3536	19/ago	FS	8136093	Pneumo	Pta cateter	febre	<i>C. tropicalis</i>
4111	437	8/set	JSL	7221209	Ped	Sangue	Sepsis	<i>C. tropicalis</i>
4267	486-1-OB	14/out	DCL	8029832	Gastro	Sangue	febre	<i>C. tropicalis</i>
4490	616-1-OB	16/dez	AAFC	7733408	Gastro	Sangue	NI	<i>C. tropicalis</i>
4813	662-ob	14/jan	DAO	95344-1	Urologia	urina	Bex. Neurogênica	<i>C. tropicalis</i>
4818	669-ob	22/jan	CMA	830505-6	Pneumo	urina	febre	<i>C. tropicalis</i>
4849	05/1-ob	8/fev	AJR	688917-1	Cardio	urina	ni	<i>C. tropicalis</i>

Anexo 1B - Dados de coleta e isolamento de leveduras do gênero *Candida* a partir de espécimes clínicos coletados de pacientes do HC-UNICAMP

Nº LIF	ROTINA	DATA	PACIENTE	HC	CLÍNICA	MATERIAL	D. CLÍNICOS	IDENTIFICAÇÃO
4711	510-2	5/fev	JFT	829685-7	Med.Interna	BAL	sida	<i>C.parapsilosis</i>
4727	571	11/fev	SAQE	578710-4	Nefro	urina	IRC	<i>C.parapsilosis</i>
4865	20-ob	14/fev	JPD	595532-5	Onco	urina	ni	<i>C.parapsilosis</i>
4908	66-ob	10/mar	AEBG	833582-5	Pediatria	sangue	ni	<i>C.parapsilosis</i>
4951	117-ob	28/mar	ER	719326-6	Trauma	sangue	ni	<i>C. parapsilosis</i>
5033	149-ob	23/abr	AP	833828-7	UTI	ponta de cateter	prn atípica	<i>C. parapsilosis</i>
5082	1422	15/abr	JCL	810541-4	Nefro	urina	ni	<i>C. parapsilosis</i>
5163	237-ob	8/jun	JO	818072-9	Hemato	ponta de cateter	neutropenia febril	<i>C. parapsilosis</i>
5241	297-ob	14/jul	CSRS	846325-4	UTI	urina	ni	<i>C. parapsilosis</i>
5480	377-ob	20/ago	CALC	834123-2	gastro	sangue	ni	<i>C. parapsilosis</i>
5541	3369	22/ago	IASS	851705-1	NEFRO	urina	irc	<i>C. parapsilosis</i>
5544	3390	23/ago	MGC	792848-9	NEFRO	urina	ni	<i>C.parapsilosis</i>
5591	410-ob	19/set	MEN	31244920	PS	urina	dor abdminal	<i>C.parapsilosis</i>
5642	463-ob	17/out	VR	794492-0	Pediatria	sangue	febre	<i>C.parapsilosis</i>
5668	3774	17/set	ANLM	793477-3	PS	ponta de cateter	infecção fúngica	<i>C.parapsilosis</i>
2985	624-OB	10/jan	JMS	1328005	Gastro	Urina	HAS	<i>C. parapsilosis</i>
3099	684-1OB	7/fev	MF	7650301	Med int.	Sangue	NI	<i>C. parapsilosis</i>

Nº LIF	ROTINA	DATA	PACIENTE	HC	CLÍNICA	MATERIAL	D. CLÍNICOS	IDENTIFICAÇÃO
3120	024-IOB	17/fev	JBR	7892820	EGA	Sangue	febre	<i>C. parapsilosis</i>
3124	027-OB	15/fev	HSMGG	7574529	Ped	LCR	Meningite	<i>C. parapsilosis</i>
3167	73-OB	18/mar	JVB	7919688	Ped	Urina	IRC	<i>C. parapsilosis</i>
3356	1183	25/mar	GV	7974458	MI	LCR	Neuro	<i>C. parapsilosis</i>
3778	274-OB	28/jun	VOS	2586848	Ped	Sangue	DMSO	<i>C. parapsilosis</i>
3807	314-1	14/jul	MAS	7890864	Cir. Trauma	Sangue	NI	<i>C. parapsilosis</i>
3954	371	5/ago	KAP	6414607	Ped	Sangue	Infecção	<i>C. parapsilosis</i>
4288	4225	29/set	JAM	4755502	Med interna	Urina	NI	<i>C. parapsilosis</i>
4306	4295	2/out	IPL	4878011	Onco	Urina	NI	<i>C. parapsilosis</i>
4348	568-OB	18/nov	AOJ	8231073	UTI	Sangue	Sepsis	<i>C. parapsilosis</i>
4475	602-OB	12/dez	MS	8252378	Gastro	Pta cateter	NI	<i>C. parapsilosis</i>
5920	538/03-ob	20/dez	AN	867104-1	Med.Intern a	sangue	febre	<i>C. parapsilosis</i>
5791	471/03-ob	23/out	GBAC	847723-7	Pediatria	ponta de cateter	foi	<i>C. parapsilosis</i>
5795	479/03-ob	3/nov	GC	859242-5	Med.Intern a	urina	febre	<i>C. parapsilosis</i>
5879	4926	11/dez	MICF	826764-8	Nefro	Liq. peritoneal	irc	<i>C. parapsilosis</i>
5835	533/03-ob	13/dez	MSR	561326-2	Gastro	sangue	febre	<i>C. parapsilosis</i>
5921	539/03-ob	21/dez	WS	77698-7	Gastro	sangue	pós op. + febre infiltrado	<i>C. parapsilosis</i>
5842	4646	19/nov	ALA	864875-1	Pneumo	BAL	LSD	<i>C. parapsilosis</i>

Anexo 1C - Dados de coleta e isolamento de leveduras do gênero *Candida* a partir de espécimes clínicos coletados de pacientes do HC-UNICAMP

Nº LIF	ROTINA	DATA	PACIENTE	HC	CLÍNICA	MATERIAL	D. CLÍNICOS	IDENTIF.
4645	231	18/jan	ARS	831403-9	Med.Int.	urina	ni	<i>C.albicans</i>
4793	638-ob	2/jan	AA	503042-4	MI	sangue		<i>C.albicans</i>
4807	654-ob	8/jan	CASC	152984-3	UTI	sangue	febre	<i>C.albicans</i>
4821	674-ob	24/jan	LNM	826942-8	Caism	urina	ni	<i>C.albicans</i>
4816	666-ob	17/jan	MHPT	767970-9	Pediatria	sangue	febre	<i>C.albicans</i>
4856	12-ob	11/fev	JFM	831295-0	Gastro	sangue	ni	<i>C.albicans</i>
4874	32/1-ob	20/fev	LBO	384142-3	Trauma	sangue	ni	<i>C.albicans</i>
4885	42/1-ob	27/fev	OCS	676516-1	Cardio	sangue	eba?	<i>C.albicans</i>
4888	45-ob	27/fev	AHAS	820065-8	MI	urina	febre	<i>C.albicans</i>
4913	77-ob	14/mar	AFB	622077-7	Endócrino	urina	ni	<i>C.albicans</i>
4915	81-ob	17/mar	JVCA	837782-5	Pediatria	sangue	ni	<i>C.albicans</i>
4929	99-ob	26/mar	JJC	417770-0	Neuro	ponta de cateter	ni	<i>C.albicans</i>
4939	108-ob	28/mar	MCF	836947-0	Trauma	sangue	ni	<i>C.albicans</i>
4958	124-ob	5/abr	JOB	08782-6	PS	sangue	pnm	<i>C.albicans</i>

Nº LIF	ROTINA	DATA	PACIENTE	HC	CLÍNICA	MATERIAL	D. CLÍNICOS	IDENTIF.
5057	192-ob	11/mai	AFC	598911-6	PS	urina	dor baixo ventre	<i>C.albicans</i>
5062	199-ob	15/mai	EOM	841058-8	Med.Interna	sangue	pnm	<i>C.albicans</i>
5063	202-ob	15/mai	OB	842688-6	Gastro	sangue	ni	<i>C.albicans</i>
5081	1420	15/abr	AS	395245-6	Pneumo	LPL	neo pulmão	<i>C.albicans</i>
5105	211-ob	18/mai	JM	477292-6	MI	sangue	sida	<i>C.albicans</i>
5114	223-ob	29/mai	BG	484817-9	Med.Interna	urina	ni	<i>C.albicans</i>
5158	230-ob	3/jun	JGC	846000-6	Gastro	sangue	pancreatite	<i>C.albicans</i>
5056	191-ob	10/mai	AGC	30566371	PS	sangue ponta de cateter	ni	<i>C.albicans</i>
5206	256-ob	13/jun	AB	842637-7	UTI		sepse	<i>C.albicans</i>
5238	294-ob	11/jul	FMN	849001-1	Pediatrics	sangue	ni	<i>C.albicans</i>
5240	296-ob	16/jul	AJ	84991667	Med.Interna	sangue	ni	<i>C.albicans</i>
5245	303-ob	15/jul	MI	847548-5	neuro	sangue	ni	<i>C.albicans</i>
5346	2361	24/jun	ACA	830855-9	Neuro	ponta de cateter	sepse	<i>C.albicans</i>
5404	343-ob	31/jul	CAP	24880	Neuro	urina	secre. Urinária	<i>C.albicans</i>
5491	393-ob	8/set	CAS	31166049	caism	urina	nf	<i>C.albicans</i>

Nº LIF	ROUTINA	DATA	PACIENTE	HC	CLÍNICA	MATERIAL	D. CLÍNICOS	IDENTIF.
5561	3483	28/ago	HSM	841423-7	Pediatría	urina	irc+febre	<i>C.albicans</i>
5604	427-ob	7/out	JAD	176817-8	Cir. Trauma	sangue	choque séptico	<i>C.albicans</i>
5622	448-2-ob	15/out	AAB	860925-4	Cir. trauma	sangue	febre	<i>C.albicans</i>
5265	327-1-ob	28/jul	SRO	830606-6	ni	sangue	ni	<i>C.albicans</i>
5817	507/03ob	30/nov	AL	8629844	GASTRO	LPL	SEPSE	<i>C.albicans</i>

Anexo 1D - Dados de coleta e isolamento de leveduras do gênero *Candida* a partir de espécimes clínicos coletados de pacientes do HC-UNICAMP

Nº LIF	ROTINA	DATA	PACIENTE	HC	CLÍNICA	MATERIAL	D. CLÍNICOS	IDENTIF.
3110	009-OB	11/fev	HSR	7010470	Cir. Trauma	Sangue	NI	<i>C. glabrata</i>
3155	60-OB	9/mar	NFM	7759644	Onco	Sangue	NI	<i>C. glabrata</i>
3160	66-OB	10/mar	JRF	4819560	Cardio	Sangue	IR	<i>C. glabrata</i>
3848	368	31/jul	FAC	7504839	EGA	Sangue	febre	<i>C. glabrata</i>
3883	2760	4/jul	ABC	3738816	Med interna	Urina	ITU	<i>C. glabrata</i>
4580	5219	7/dez	NBS	5867180	Med interna	Pta cateter	febre	<i>C. glabrata</i>
4682	381	28/jan	KCLSS	610701-8	Caism	urina		<i>C.glabrata</i>
4686	419	30/jan	IR	30129147	PS	urina	ITU	<i>C.glabrata</i>
4870	27-ob	18/fev	MID	833902-9	Trauma	sangue	ni	<i>C.glabrata</i>
4919	90-ob	20/mar	SS	837472-2	UTI	urina	ni	<i>C.glabrata</i>
4947	113-ob	28/mar	CBRM	441283-9	Med.Interna	urina	ni	<i>C.glabrata</i>
5015	1188	28/mar	NSF	549424-0	Med.Interna	urina	itu	<i>C.glabrata</i>

Nº LIF	ROTINA	DATA	PACIENTE	HC	CLÍNICA	MATERIAL	D. CLÍNICOS	IDENTIF.
5027	136/1-ob	20/abr	QJCM	840123-2	Med.Interna	urina	ferimento	<i>C.glabrata</i>
5044	162-ob	29/abr	ECS	835078-8	Med.Interna	sangue	ni	<i>C.glabrata</i>
5076	1388	11/abr	MAS	835100-7	Gastro	LAS	ascite	<i>C.glabrata</i>
5091	1464-1	22/abr	MMSB	841629-3	Med.Interna	urina	ITU	<i>C.glabrata</i>
5102	206-ob	15/mai	TAA	802855-9	Pediatria	urina	ITU	<i>C.glabrata</i>
5108	214/2-ob	20/mai	MBR	712755-2	PS	urina	ITU	<i>C.glabrata</i>
5239	295-ob	16/jul	IB	770976-2	Trauma	sangue	ni	<i>C.glabrata</i>
5253	312-ob	21/jul	EF	848801-2	gastro	sangue	bacteremia	<i>C.glabrata</i>
5267	328-ob	28/jul	AM	847275-0	gastro	sangue	ni	<i>C.glabrata</i>
5300	2005	29/mai	AMR	839953-0	Med.	urina	hsa	<i>C.glabrata</i>
5327	2257	16/jun	EPR	847132-2	Vascular	urina	ni	<i>C.glabrata</i>
5336	2311	18/jun	AF	844809-6	Onco	LAS	ascite+sepsis	<i>C.glabrata</i>
5407	346-ob	31/jul	DL	330348-1	Med.Interna	urina	febre	<i>C.glabrata</i>
5488	389-ob	2/set	ISC	240488-6		urina	dm	<i>C.glabrata</i>

Nº LIF	ROTINA	DATA	PACIENTE	HC	CLÍNICA	MATERIAL	D. CLÍNICOS	IDENTIF.
5577	3543	2/set	CAB	209011-0	NEFRO	urina	tx-renal	<i>C.glabrata</i>
5585	401-ob	8/set	IRO	769325-2	Gastro	urina	febre	<i>C.glabrata</i>
5614	437-1-ob	8/out	FAD	855282-7	Med.Interna	sangue	febre	<i>C.glabrata</i>
5685	3849	22/set	CANP	701150-1	Cir.	urina	infecção	<i>C.glabrata</i>
5836	534/03-ob	13/dez	HC	866937-9	PS	sangue	sepsse	<i>C.glabrata</i>
5804	490/03-ob	12/nov	GJ	846132-5	Med.Interna	urina	febre	<i>C.glabrata</i>
5829	526-2/03- ob	13/dez	IMV	841386-3	Hemato	urina	febre	<i>C.glabrata</i>
5800	487-1/03- ob	10/nov	MSM	852621-6	Med.Interna	urina	sepsse	<i>C.glabrata</i>
5935	554/03-ob	30/dez	NCDB	373752-9	UTI	urina	ni	<i>C.glabrata</i>

Anexo 1E - Dados de coleta e isolamento de leveduras do gênero *Candida* a partir de espécimes clínicos coletados de pacientes do HC-UNICAMP

Nº LIF	ROTINA	DATA	PACIENTE	HC	CLÍNICA	MATERIAL	D. CLÍNICOS	IDENTIF.
3241	74-OB	16/mar	RIB	6316029	Nefro	Urina	IR	<i>C. Krusei</i>
3241	74-OB	16/mar	RIB	6316029	Nefro	Urina	IR	<i>C. Krusei</i>
3746	2427-1	17/jun	GCC	8039934	Gastro	LAS	Ascíte	<i>C. Krusei</i>
3978	402	20/ago	RCS	4164519	MI	Urina	NI	<i>C. Krusei</i>
4468	595-OB	3/dez	MCS	470629	EGA	Urina	NI	<i>C. Krusei</i>
4804	650-ob	8/jan	EAC	790425-9	TMO	sangue	TMO	<i>C.krusei</i>
4867	22-ob	13/fev	IBO	826064-6	Caism	urina	disúria	<i>C.krusei</i>
4903	59-ob	6/mar	GAR	640849-0	Nefro	urina	nefrolitíase	<i>C.krusei</i>
4903	59-ob	6/mar	GAR	640849-0	Nefro	urina	nefrolitíase	<i>C.krusei</i>
5110	217-ob	22/mai	JLSS	504933-4	Nefro	urina	litíase	<i>C.krusei</i>
5113	222-ob	25/mai	BT	763442-4	PS	Liq. Peritoneal	ni	<i>C.krusei</i>
5156	228-ob	2/jun	EFC	706165-1	Onco	urina	ITU	<i>C.krusei</i>
5221	266-ob	17/jun	CM	669162-9	Med.Interna	urina	itu	<i>C.krusei</i>
5405	344-ob	31/jul	APO	848309-4	Caism	urina	ni	<i>C.krusei</i>
1031	2122	17/jan	EAA	7062425	Pneumo	Urina	Gestante	<i>C. krusei</i>
1818	75	5/jan	AC	329+917	GASTRO	URINA	Choque séptico	<i>C. krusei</i>
2294	3305	30/jun	TFO	6964284	NEFRO	URINA	Rotina	<i>C. krusei</i>
2929	5804	13/dez	NMS	6352805	HEMATO	SEC/SEIO/MA X/D	Sinusite	<i>C. krusei</i>
1817	189	5/jan	MLS	7081241	CIR/NEUR O	URINA	ITU	<i>C. krusei</i>

Nº LIF	ROTINA	DATA	PACIENTE	HC	CLÍNICA	MATERIAL	D. CLÍNICOS	IDENTIF.
2910	1874	19/dez	MAF	7864403	CAISM	URINA	a/e	<i>C. krusei</i>
2804	4846	30/out	DBTL	6849478	P S/CLIN	URINA	Febre a/e	<i>C. krusei</i>
2492	3180	3/set	AMB	7715692	CAISM	URINA	Pré OP	<i>C. krusei</i>
2128	2151	28/mai	GRS	6364745	MED/INTE R	URINA	IRC a/e	<i>C. krusei</i>
2074	1847	20/abr	IFS	7579624	MED/INTE R	URINA	ITU por fungo	<i>C. krusei</i>
2574	1739	21/set	IMG	7689324	ONCO	URINA	Ca mama	<i>C. krusei</i>
3800	302-1	11/jul	JEA	26003321	Cardio	Sangue	NPP+cefepime	<i>C. Krusei</i>
1822	24	5/jan	RLG	7437153	PED	PTA/CATETER	Febre	<i>C. krusei</i>
2731	6008-2	4/out	IMVM	7472456	HEMATO	SANGUE	Leucopenia	<i>C. krusei</i>
1001	5495	20/dez	DRCLT	5787277	Hemato	Pta catéter	Pós-TMO	<i>C. krusei</i>
1096	531	21/fev	AJR	6630530	Hemato	Pta catéter	NI	<i>C. krusei</i>
1705	5441	17/out	NZV	7350048	Ped	Pta catéter	NI	<i>C. krusei</i>
1805	541	29/dez	AC	329797	Gastro	Sangue	Sepse	<i>C. krusei</i>
993	3390	29/dez	B B	7025702	Pneumo	Sangue	Linfoma	<i>C. krusei</i>
781	1398	13/set	F C A P	6804925	PED	Sangue	NI	<i>C. krusei</i>
5794	478/03-ob	3/nov	MFS	863051-0	Cardio	urina	ni	<i>C.krusei</i>

ANEXO 2- Resultados de CIM obtidos para cepas de C.albicans frente a anfotericina, itraconazol,cetoconazol e fluconazol por meio das duas metodologias

CEPAS	anfotericina		Itraconazol		Cetoconazol		Fluconazol	
C.albicans	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST
	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)
5622	0,500	0,500	0,060	0,060	<=0,06	<=0,06	0,250	1,000
4793	0,125	0,060	0,060	0,060	<=0,06	<=0,06	0,250	1,000
5238	0,250	0,500	0,060	<=0,06	<=0,06	<=0,06	0,250	0,500
4821	1,000	0,500	0,060	0,060	<=0,06	<=0,06	0,250	1,000
5346	0,250	0,500	0,060	<=0,06	<=0,06	<=0,06	0,250	0,500
5056	0,250	0,250	0,060	0,125	<=0,06	0,125	<=0,25	0,250
5240	0,500	0,500	0,060	<=0,06	<=0,06	<=0,06	0,250	0,250
4807	0,500	0,500	<=0,06	<=0,06	<=0,06	0,500	<=0,25	0,250
5062	0,500	0,500	<=0,06	0,060	<=0,06	0,500	<=0,25	<=0,25
5206	0,500	0,250	0,125	0,125	<=0,06	<=0,06	0,250	0,125
5622	0,500	0,500	0,060	0,060	<=0,06	<=0,06	0,250	1,000
4793	0,125	0,060	0,060	0,060	<=0,06	<=0,06	0,250	1,000
5238	0,250	0,500	0,060	<=0,06	<=0,06	<=0,06	0,250	0,500
4821	1,000	0,500	0,060	0,060	<=0,06	<=0,06	0,250	1,000
5346	0,250	0,500	0,060	<=0,06	<=0,06	<=0,06	0,250	0,500
5056	0,250	0,250	0,060	0,125	<=0,06	0,125	<=0,25	0,250
5240	0,500	0,500	0,060	<=0,06	<=0,06	<=0,06	0,250	0,250
4807	0,500	0,500	<=0,06	<=0,06	<=0,06	0,500	<=0,25	0,250
5062	0,500	0,500	<=0,06	0,060	<=0,06	0,500	<=0,25	<=0,25
5206	0,500	0,250	0,125	0,125	<=0,06	<=0,06	0,250	0,125
4856	1,000	0,500	0,125	<=0,03	<=0,03	0,030	0,250	0,250
5491	1,000	0,500	0,125	0,125	<=0,03	<=0,03	0,125	0,250
4888	0,500	1,000	0,125	0,125	<=0,03	<=0,03	0,250	0,250
4874	0,500	0,250	0,125	<=0,03	<=0,03	<=0,03	0,250	0,250
4645	1,000	0,250	0,125	<=0,03	<=0,03	<=0,03	0,250	0,250
4885	1,000	0,500	<=0,03	<=0,03	<=0,03	<=0,03	0,250	0,250
5158	0,500	0,500	<=0,03	<=0,03	<=0,03	<=0,03	0,250	0,250
5265	0,500	0,500	<=0,03	<=0,03	<=0,03	<=0,03	0,500	0,500
4915	0,500	1,000	0,125	<=0,03	0,125	<=0,03	0,250	0,250
5561	0,250	1,000	0,125	0,125	0,125	0,125	0,250	0,250
5063	0,500	0,250	0,125	<=0,03	0,125	0,125	0,250	0,250
5057	0,500	0,250	<=0,03	<=0,03	0,125	<=0,03	0,250	0,250
4816	1,000	0,250	0,125	<=0,03	<=0,03	<=0,03	0,250	0,250
5081	1,000	0,500	<=0,03	<=0,03	<=0,03	<=0,03	0,250	0,250

ANEXO 3- Resultados de CIM obtidos para cepas de *C.tropicalis* frente a anfotericina, itraconazol,cetoconazol e fluconazol por meio das duas metodologias

CEPAS <i>C.tropicalis</i>	anfotericina		Itraconazol		Cetoconazol		Fluconazol	
	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST
	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)
5045	2,000	0,500	0,250	0,125	0,500	1,000	0,500	0,500
4924	2,000	0,500	0,125	0,125	<=0,06	<=0,06	8,000	16,000
5598	0,500	0,500	0,125	0,125	<=0,06	<=0,06	0,250	0,500
5934	2,000	0,500	0,125	0,060	<=0,06	0,500	1,000	0,500
4883	2,000	0,500	0,250	0,125	<=0,06	<=0,06	1,000	4,000
5243	2,000	0,500	0,125	0,060	<=0,06	<=0,06	0,500	1,000
5824	0,500	0,500	0,125	<=0,06	<=0,06	<=0,06	0,500	0,500
5924	2,000	0,500	2,000	0,500	1,000	0,500	16,000	16,000
5810	1,000	0,500	0,250	0,125	0,060	0,250	0,500	0,500
4931	1,000	1,000	32,000	32,000	0,250	1,000	0,500	1,000
3261	1,000	1,000	1,000	1,000	0,030	<=0,03	1,000	0,250
3112	1,000	1,000	1,000	1,000	0,030	0,030	0,250	0,250
5204	0,500	0,250	0,500	0,500	<=0,03	<=0,03	2,000	0,500
3076	0,500	1,000	1,000	1,000	<=0,03	<=0,03	0,250	0,250
4862	1,000	1,000	1,000	2,000	0,030	0,030	0,250	0,500
5588	1,000	1,000	1,000	1,000	<=0,03	<=0,03	0,250	0,250
5103	1,000	1,000	1,000	2,000	<=0,03	<=0,03	0,250	0,250
4849	1,000	1,000	1,000	1,000	<=0,03	<=0,03	0,250	0,500
5264	1,000	1,000	1,000	1,000	<=0,03	0,125	0,250	0,250
4111	2,000	1,000	0,250	1,000	<=0,03	<=0,03	1,000	0,250
5182	1,000	1,000	1,000	1,000	0,250	0,030	2,000	1,000
4907	0,500	1,000	4,000	8,000	2,000	8,000	4,000	8,000
3257	0,500	0,250	1,000	1,000	<=0,03	<=0,03	0,125	0,500
3952	0,500	0,250	1,000	2,000	0,030	0,030	0,500	0,500
5624	0,500	0,500	1,000	0,500	0,030	<=0,03	0,500	0,500
3779	0,500	0,250	1,000	1,000	<=0,03	<=0,03	0,500	0,500
3810	2,000	0,500	0,500	1,000	0,125	<=0,03	0,500	2,000
4490	2,000	1,000	1,000	1,000	0,030	0,500	0,500	2,000
3796	1,000	0,500	1,000	1,000	<=0,03	<=0,03	0,500	0,500
4813	1,000	0,500	0,125	0,500	<=0,03	<=0,03	2,000	0,500
4866	0,500	1,000	1,000	2,000	<=0,03	0,030	0,500	0,500
3249	0,500	0,500	2,000	1,000	<=0,03	<=0,03	0,500	0,500
3092	1,000	0,500	0,500	0,125	<=0,03	<=0,03	0,500	0,500
4267	0,500	0,500	1,000	1,000	<=0,03	0,030	0,500	0,500
4818	0,500	0,125	0,125	0,125	<=0,03	<=0,03	0,500	0,500
4080	1,000	0,250	1,000	0,250	<=0,03	0,030	1,000	0,250

ANEXO 4- Resultados de CIM obtidos para cepas de *C. glabrata* frente a anfotericina, itraconazol,cetoconazol e fluconazol por meio das duas metodologias

CEPAS <i>C. glabrata</i>	anfotericina		Itraconazol		Cetoconazol		Fluconazol	
	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST
	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)
4580	0,100	0,500	64,000	32,000	1,000	0,500	0,500	0,500
5836	0,100	0,500	32,000	16,000	1,000	0,500	0,500	0,500
3848	0,500	0,250	8,000	8,000	0,500	0,250	0,500	0,500
4870	0,500	0,500	16,000	32,000	8,000	0,500	0,500	0,500
5239	0,500	0,500	16,000	8,000	0,500	0,250	0,500	<=0,25
5044	1,000	0,500	32,000	32,000	1,000	1,000	0,500	0,500
5614	1,000	0,500	32,000	32,000	2,000	0,500	1,000	0,500
3110	0,500	0,500	64,000	16,000	1,000	0,500	0,500	0,500
5267	1,000	0,500	32,000	16,000	0,500	0,500	0,500	0,500
5253	0,500	0,500	32,000	32,000	1,000	1,000	0,500	0,500
5685	1,000	1,000	2,000	2,000	2,000	1,000	1,000	0,500
3091	1,000	1,000	64,000	64,000	2,000	0,500	0,500	0,125
4919	0,500	1,000	2,000	2,000	2,000	0,500	0,500	0,125
5935	1,000	1,000	2,000	2,000	2,000	0,500	0,500	0,125
5336	0,250	0,500	1,000	1,000	2,000	0,500	1,000	0,500
5585	1,000	1,000	64,000	64,000	1,000	0,250	0,500	0,500
5091	1,000	1,000	2,000	2,000	1,000	1,000	0,500	0,500
5015	0,500	1,000	2,000	1,000	1,000	2,000	0,500	0,500
5102	1,000	1,000	1,000	1,000	2,000	2,000	0,250	0,250
5407	2,000	1,000	1,000	1,000	1,000	2,000	0,250	0,250
5829	1,000	0,250	64,000	64,000	4,000	8,000	64,000	64,000
3155	1,000	0,500	2,000	2,000	4,000	8,000	0,500	0,500
5488	2,000	0,500	1,000	1,000	1,000	1,000	0,500	1,000
5804	1,000	0,500	1,000	0,500	2,000	0,500	0,500	0,250
5300	0,500	0,500	1,000	2,000	1,000	1,000	0,500	0,500
5108	0,500	2,000	1,000	1,000	2,000	1,000	0,500	0,500
5800	1,000	0,250	1,000	1,000	2,000	1,000	1,000	0,500
5577	1,000	1,000	2,000	1,000	4,000	1,000	2,000	0,500
5076	2,000	1,000	1,000	0,500	4,000	1,000	1,000	0,500
5027	0,500	0,500	1,000	0,500	2,000	1,000	0,500	0,250
4947	0,500	1,000	0,500	1,000	0,500	1,000	0,250	1,000
5833	1,000	0,500	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,500
4682	2,000	1,000	32,000	16,000	16,000	16,000	32,000	16,000
3160	1,000	1,000	2,000	2,000	8,000	8,000	1,000	1,000
4686	1,000	0,500	2,000	2,000	1,000	4,000	0,500	0,500

ANEXO 5- Resultados de CIM obtidos para cepas de *C.parapsilosis* frente a anfotericina, itraconazol,cetoconazol e fluconazol por meio das duas metodologias

CEPAS <i>C.parapsilosis</i>	anfotericina		Itraconazol		Cetoconazol		Fluconazol	
	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST
	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)
4908	0,250	0,500	<=0,125	<=0,125	<=0,06	<=0,06	0,500	0,500
4951	0,250	0,500	<=0,125	<=0,125	<=0,06	<=0,06	<=0,125	0,250
5642	0,250	0,500	<=0,125	<=0,125	<=0,06	<=0,06	<=0,125	0,500
5835	0,250	0,500	<=0,125	0,125	<=0,06	<=0,06	<=0,125	2,000
5033	0,250	0,500	<=0,125	<=0,125	<=0,06	<=0,06	1,000	0,500
5480	0,250	0,500	<=0,125	0,125	<=0,06	<=0,06	0,500	0,500
5668	0,250	0,250	<=0,125	<=0,125	<=0,06	<=0,06	2,000	2,000
5791	0,500	0,250	<=0,125	<=0,125	<=0,06	<=0,06	0,500	0,500
5163	0,250	0,500	<=0,125	<=0,125	<=0,06	<=0,06	<0,125	0,500
5920	0,250	0,500	<=0,125	<=0,125	<=0,06	<=0,06	64,000	64,000
4711	0,500	2,000	0,125	0,125	0,030	0,030	0,500	1,000
4288	2,000	0,500	0,125	0,125	0,125	0,030	0,250	0,250
4348	0,500	0,500	0,125	0,125	0,030	0,030	0,250	0,250
3120	0,500	0,500	0,125	0,125	0,030	0,030	0,250	0,250
5921	0,500	0,500	0,125	0,125	0,030	0,030	0,250	0,250
3954	0,500	0,500	0,125	0,125	0,030	0,030	0,250	0,250
4475	2,000	0,500	0,125	0,125	0,030	0,030	0,250	0,250
5541	0,500	0,500	0,125	0,125	0,030	0,030	0,250	0,250
2985	0,500	0,500	0,125	0,125	0,030	0,030	0,250	0,250
3099	0,500	2,000	0,125	0,125	0,030	0,030	0,250	0,250
5591	0,500	0,500	0,125	0,125	0,030	0,030	0,250	0,250
5544	0,500	0,500	0,125	0,125	0,030	0,030	0,250	0,250
3356	2,000	0,500	0,125	0,125	0,030	0,030	0,250	0,250
4306	2,000	0,500	0,125	0,125	0,030	0,030	0,250	0,250
3778	2,000	0,500	0,125	0,125	0,030	0,030	0,250	0,250
3124	2,000	0,500	0,125	0,125	0,030	0,030	0,250	0,250
5795	0,500	0,500	0,125	0,125	0,125	0,030	0,250	0,250
3807	2,000	2,000	0,125	0,125	0,125	0,250	0,250	0,250
5879	2,000	2,000	0,125	0,125	0,030	0,030	0,250	0,250
3167	2,000	0,500	0,125	0,125	0,125	0,030	0,250	0,250
4855	2,000	2,000	0,250	0,125	0,030	0,030	0,250	0,250
5241	2,000	2,000	0,250	0,125	0,250	0,125	0,250	0,250
4727	2,000	0,500	0,125	0,125	0,030	0,030	0,250	0,250
5082	2,000	2,000	0,125	0,125	0,030	0,030	0,250	0,250
5842	0,500	0,250	0,125	0,125	0,030	0,030	0,500	0,125

ANEXO 6- Resultados de CIM obtidos para cepas de *C.krusei* frente a anfotericina, itraconazol,cetoconazol e fluconazol por meio das duas metodologias

CEPAS <i>C.krusei</i>	anfotericina		itraconazol		Cetoconazol		Fluconazol	
	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST
	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)	MIC(ug/mL)
3800	8,000	8,000	0,250	0,250	1,000	0,500	16,000	32,000
1001	8,000	8,000	0,250	0,250	0,500	0,250	16,000	16,000
993	8,000	8,000	0,250	0,250	0,500	0,250	16,000	16,000
781	8,000	8,000	0,250	0,250	0,500	0,500	16,000	16,000
1822	8,000	8,000	0,250	0,250	1,000	1,000	16,000	32,000
1096	8,000	0,000	0,250	0,500	0,500	0,500	>=64	>=64
2731	0,000	8,000	0,250	0,500	0,500	0,500	>=64	32,000
4804	4,000	8,000	0,250	0,250	0,500	0,250	16,000	>=64
1805	8,000	8,000	0,250	0,250	0,500	0,250	16,000	>=64
1705	0,500	0,500	0,125	0,250	0,500	0,250	32,000	32,000
1818	1,000	2,000	0,500	0,500	1,000	1,000	32,000	16,000
3277	1,000	1,000	0,500	0,500	1,000	0,500	32,000	16,000
3746	1,000	0,500	0,125	0,500	2,000	1,000	32,000	32,000
2294	2,000	1,000	0,500	1,000	2,000	1,000	32,000	32,000
5405	1,000	0,500	0,500	0,500	1,000	0,500	32,000	16,000
2929	1,000	1,000	0,500	0,500	2,000	0,500	32,000	64,000
1817	0,500	0,500	0,125	0,125	<=0,03	<=0,03	64,000	64,000
2910	1,000	1,000	0,500	0,125	0,500	0,250	16,000	32,000
2804	1,000	1,000	0,500	0,125	1,000	0,500	32,000	16,000
2492	2,000	1,000	0,500	0,125	1,000	1,000	32,000	16,000
4468	2,000	1,000	0,500	0,500	1,000	0,500	32,000	32,000
2128	1,000	0,500	0,500	0,125	1,000	0,500	64,000	32,000
4867	1,000	1,000	0,500	0,125	2,000	0,500	64,000	32,000
5110	2,000	2,000	0,500	0,125	0,500	0,250	16,000	16,000
2074	2,000	1,000	0,500	0,500	2,000	1,000	32,000	32,000
3978	2,000	1,000	0,250	0,125	2,000	1,000	8,000	32,000
5156	1,000	1,000	0,500	1,000	1,000	1,000	32,000	16,000
5794	1,000	1,000	0,500	0,500	1,000	1,000	32,000	16,000
5113	2,000	1,000	0,125	0,125	1,000	2,000	32,000	16,000
4949	0,250	1,000	0,250	0,125	2,000	0,500	64,000	32,000
3241	1,000	0,500	1,000	0,250	0,500	0,250	64,000	64,000
4903	1,000	1,000	0,250	0,125	2,000	0,500	32,000	64,000
5221	1,000	1,000	0,125	0,125	0,500	0,500	32,000	32,000
2574	0,500	0,250	0,500	0,125	0,500	1,000	64,000	32,000
1031	0,250	0,500	0,125	0,125	1,000	0,500	32,000	64,000