



Michela De Luca Ferrari

**Nova plataforma de microarranjo de DNA para
identificação de espécies diferentes de *Candida albicans*
e perfil de suscetibilidade a antifúngicos em isolados de
candidemia**

**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

MICHELA DE LUCA FERRARI

**Nova plataforma de microarranjo de DNA para identificação
de espécies diferentes de *Candida albicans* e perfil de
suscetibilidade a antifúngicos em isolados de candidemia**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de
Campinas para obtenção de título de Doutora em Clínica Médica, área de
concentração Clínica Médica .

Orientação: Profa. Dra. Mariangela Ribeiro Resende
Co-Orientação: Profa. Dra. Maria Luiza Moretti

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA POR
MICHELA DE LUCA FERRARI, E ORIENTADA PELA
PROF^a. DRA MARIANGELA RIBEIRO RESENDE

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

F412n Ferrari, Michela De Luca, 1978-
Nova plataforma de microarranjo de DNA para identificação de espécies diferentes de *Candida albicans* e perfil de suscetibilidade a antifúngicos em isolados de candidemia / Michela De Luca Ferrari. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Mariangela Ribeiro Resende.
Coorientador: Maria Luiza Moretti.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Candida*. 2. Microarranjos de DNA. 3. Candidemia. 4. Teste de suscetibilidade. I. Resende, Mariangela Ribeiro, 1966-. II. Moretti, Maria Luiza, 1953-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Visual analysis of DNA microarray data for identification of Non-*albicans Candida* from candidemia isolates

Palavras-chave em inglês:

Candida
DNA microarray
Candidemia
Suceptibility tests

Área de concentração: Clínica Médica

Títuloção: Doutora em Clínica Médica

Banca examinadora:

Mariangela Ribeiro Resende [Orientador]
Marcia de Souza Carvalho Melhem
Lucieni de Oliveira Conterno
Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho
Francisco Hideo Aoki

Data de defesa: 28-11-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MICHELA DE LUCA FERRARI

ORIENTADORA: PROF. DR. MARIANGELA RIBEIRO RESENDE

COORIENTADOR: MARIA LUIZA MORETTI

MEMBROS:

1. PROF. DR. MARIANGELA RIBEIRO RESENDE

2. PROF. DR. MARCIA DE SOUZA CARVALHO MELHEM

3. PROF. DR. LUCIENI DE OLIVEIRA CONTERNO

4. PROF. DR. PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO

5. PROF. DR. FRANCISCO HIDEO AOKI

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28 de novembro de 2013

Dedicatória

Á Deus, pelo amor incomparável, por todas as bênçãos, pela força e coragem, pelos pequenos e belos detalhes, por cada pessoa que colocastes neste caminho de lutas e vitórias.

Á minha mãe Maria Inês e a meu pai Vivaldo pelo exemplo de vida, amor e dedicação e pelo apoio incondicional em todos os momentos.

A minha querida irmã Melissa, Caetano, Amanda e Paola pela constante e carinhosa presença, trazendo incentivo, vida e alegria.

AGRADECIMENTOS

Á Profa Dra Mariângela Ribeiro Resende por todos os inúmeros ensinamentos, dedicação, convivência durante esta longa jornada e pela grande oportunidade de desenvolvimento desta tese.

Á Profa Dra Maria Luiza Moretti pela preciosa oportunidade, incentivo e ensinamentos.

À Profa Dra Angélica Zaninelli Schreiber pelo essencial auxílio, apoio, amizade e confiança.

Ao Prof. Dr. Plínio Trabasso pela valiosa contribuição durante a execução do trabalho bem como na elaboração do artigo científico

À Luzia Lyra pelos ensinamentos, grande apoio e amizade.

Ao prof. Dr. Yuzuru Mikami, da Universidade de Chiba, pelo apoio, ensinamentos constantes e confiança.

Á Fundação de amparo á pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos colegas do laboratório de epidemiologia molecular e doenças infecciosas Franqueline Reichert, Marcela Souza e em especial Adenilza Silva, pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos pós-graduandos Renato Moraes e Renata Fagnani pela sincera amizade, convivência e apoio incondicional em todos os momentos, tornando mais leves os momentos de dificuldade.

A equipe do laboratório de epidemiologia molecular e doenças infecciosas Ériwan Ribeiro e Ariane Busso Lopes pelo auxílio na parte operacional e também por todo carinho, amizade e convivência.

A todos os colegas da Seção de epidemiologia hospitalar.

As amigas Renata Scantimburgo e Marcia Maria Pedroso pelos sábios conselhos.

Á minha irmã Melissa e sobrinhas Amanda e Paola pela constante compreensão e carinho.

Á Maurícia Panaro pelo apoio e auxílio durante a realização deste trabalho.

Ao Luis Frederico Minicelli por toda dedicação, carinho e compreensão.

À todos que deixei de citar, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Meu sincero e profundo agradecimento.

Introdução: As espécies não-*Candida albicans* têm emergido como agentes causais de infecções sistêmicas, e tem apresentado diversos perfis de suscetibilidade. **Objetivos:** avaliar o desempenho de uma nova plataforma de microarranjo de DNA para a identificação de espécies não-*Candida albicans* isoladas de hemoculturas e o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos. **Metodologia:** estudo retrospectivo envolvendo isolados de pacientes com candidemia de um hospital terciário no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2010. Os isolados previamente identificados pelo Vitek 2® foram submetidos à PCR utilizando-se as regiões ITS1, ITS4 e ITS4, ITS5 e posteriormente à plataforma de microarranjo e sequenciamento de DNA respectivamente. A plataforma de microarranjo de DNA continha 32 espécies fúngicas, incluindo nove espécies não-*Candida albicans*. O teste de suscetibilidade foi realizado para anfotericina B, 5-flucitosina, itraconazol, fluconazol, voriconazol e micafungina utilizando-se o método de microdiluição em caldo (CLSI M27-A3). Os resultados de CIM foram interpretados de acordo com o CLSI, 2008 e comparados aos pontos de corte clínicos (PCC) definidos no documento M27-S4. Os PCCs para fluconazol e *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* foram: ≤ 2 µg/ml sensível (S), 4 µg/ml suscetível dose dependente (SDD) e ≥ 8 µg/ml resistente (R), enquanto que para *C. glabrata* ≤ 32 µg/ml SDD e ≥ 64 µg/ml R. Frente à voriconazol, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* foram: $\leq 0,125$ µg/ml S, intermediário (I) 0,25-0,5 µg/ml e ≥ 1 µg/ml, enquanto que para *C. krusei* ≤ 5 µg/ml S, 1 µg/ml I e ≥ 2 µg/ml R. Suscetibilidade, intermediário e resistência a micafungina para *C. tropicalis* e *C. krusei* foram $\leq 0,25$ µg/ml, 0,5 µg/ml e ≥ 1 µg/ml enquanto que ≤ 2 µg/ml foi S, 4 µg/ml I e ≥ 8 µg/ml R para *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*. Frente a micafungina *C. glabrata* foram: $\leq 0,06$ µg/ml S, 0,1 µg/ml I e $\geq 0,25$ µg/ml R. **Resultados:** a concordância entre o microarranjo e o sequenciamento de DNA foi de 97,6%. Dentre os 167 isolados identificados pelo Vitek 2® como espécie não-*C. albicans*, a plataforma de microarranjo identificou corretamente uma *C. glabrata*, uma *C. guilliermondii*, uma *C. albicans* e uma *C. kefyr* que haviam sido identificadas como *Candida* spp ou espécie não-*C. albicans* pelo VITEK 2®. Não identificou *C. haemulonii*, *C. rugosa*, *C. lipolytica* e *Dipodascus capitatus* considerando que estas espécies não faziam parte da composição da plataforma. O microarranjo de DNA apresentou ótimo desempenho para a identificação do Complexo *C. parapsilosis*, entretanto somente o sequenciamento discriminou *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Dentre os 155 isolados de espécies não-*C. albicans*, excluindo 11 isolados de *C. krusei*, um isolado (2,8%) de *C. glabrata* foi R ao fluconazol. Considerando os PCCs, resistência ao fluconazol foi encontrada quatro isolados: um (2,8%) *C. glabrata* e três (1,5%) *C. tropicalis*. Sensibilidade ao voriconazol para os 166 isolados foi de 98,8% e 96,4% segundo CLSI e PCCs respectivamente. Resistência ao itraconazol foi encontrada em 2,8% dos isolados de *C. glabrata*. Todos os isolados foram sensíveis a anfotericina B e micafungina. **Conclusão:** a plataforma de microarranjo de DNA mostrou bom desempenho para a identificação de espécies não-*C. albicans* e representa uma ferramenta útil para a identificação da espécie. Com exceção de *C. krusei*, elevada suscetibilidade ao fluconazol foi observada. De acordo com os PCCs, quatro isolados foram considerados resistentes a fluconazol enquanto que uma foi resistente de acordo com parâmetros do CLSI, 2008.

ABSTRACT

Background: non-*albicans* *Candida* species are an emerging cause of bloodstream infections with different susceptibility profiles. **Objectives:** to evaluate the performance of one new visual DNA-microarray platform for identification of *non-albicans Candida* spp and the antifungal susceptibility profile. **Methods:** a retrospective cohort was performed involving patients with candidemia at a Brazilian tertiary care facility, from January 2006 to December 2010. From target isolates, previously identified by Vitek 2®, PCR for ITS1, ITS4 regions and ITS4, ITS5 was performed followed by DNA-microarray analysis and sequencing. DNA-microarray platform was developed in a glass slide involving 32 fungi species, including 9 *non-albicans Candida*. Susceptibility tests were performed for amphotericin B, 5-flucitosyne, itraconazole, fluconazole, voriconazole and micafungin using the broth microdilution method according to CLSI M27-A3. CLSI interpretation was compared to clinical breakpoints (CBPs) defined in M27-S4 document. The CBPs to fluconazole for *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. glabrata* were: $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ susceptible (S), $4 \mu\text{g/ml}$ susceptible dose-dependent (SDD) and $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ (R), whereas $\leq 32 \mu\text{g/ml}$ was SDD and $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ (R) for *C. glabrata* isolates. For voriconazole and *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* were $\leq 0.125 \mu\text{g/ml}$ S, $0.25\text{--}0.5 \mu\text{g/ml}$ intermediary (I) and $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ R, whereas $\leq 5 \mu\text{g/ml}$ was S, $1 \mu\text{g/ml}$ I and $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ R for *C. krusei* isolates. Micafungin susceptible, intermediary and resistance of *C. tropicalis* and *C. krusei* were respectively $\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$, $0.5 \mu\text{g/ml}$ and $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ whereas $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ was S, $4 \mu\text{g/ml}$ I and $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ R for *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii*. Micafungin susceptibility, intermediary and resistance for *C. glabrata* were $\leq 0.06 \mu\text{g/L}$, $0.1 \mu\text{g/ml}$ and $\geq 0.25 \mu\text{g/ml}$. **Results:** of 167 isolates with primary identification by VITEK 2 as non-*albicans Candida*, we observed 97.6% of agreement between DNA-microarray and sequencing. DNA-microarray was able to identify, one *C. glabrata*, one *C. guilliermondii*, one *C. albicans* and one *C. kefyr* that were previously identified as *Candida* spp or non-*albicans Candida* by VITEK 2 but did not identify *C. haemulonii*, *C. rugosa*, *C. lipolytica* and *Dipodascus capitatus* considering that these species were absent on slide composition. DNA-microarray revealed a good performance for identification of *C. parapsilosis* Complex, however only DNA sequencing discriminated *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*. Among 155 isolates of non-*albicans Candida*, excluding 11 isolates of *C. krusei*, one isolated (2.8%) of *C. glabrata* was R to fluconazole. Considering CBPs, resistance to fluconazole was found in four isolates: one (2.8%) *C. glabrata* and three (1.5%) *C. tropicalis*. Voriconazole susceptibility for all 166 non-*albicans C.* isolates was 98.8% and 96.4% by CLSI, 2008 and CBs respectively. Itraconazole resistance was found in 2.8% of *C. glabrata* isolates. All isolates were susceptible to amphotericin B and micafungin. **Conclusion:** the microarray platform showed good performance for identification of non-*albicans Candida* and represents a reliable and useful tool for identification specie specific. High fluconazole susceptibility was showed, except for *C. krusei*. CBPs interpretation identified four strains fluconazole-resistant whereas by CLSI M27-A3 only one was resistant.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

	Página
TABELA 1. Exemplos de desempenho dos métodos comerciais.....	40
FIGURA 1. Espectros de massa (m/z 3,000 a 10,000) obtidos através do MALDI-TOF de <i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida krusei</i> e <i>Candida parapsilosis</i> revelando diferenças entre as espécies. Adaptado de: Marklein G <i>et al</i> , 2009.....	46
FIGURA 2. Métodos para avaliação de suscetibilidade aos agentes antifúngicos utilizados no laboratório clínico. Adaptado de Pfaller <i>et al</i> , 2012.....	47
TABELA 2. Diferenças entre as metodologias preconizadas pelo CLSI (M27-A3) e Eucast (Edef 7.1 e 7.2) para a avaliação de suscetibilidade aos agentes antifúngicos	49
TABELA 3. Comparação dos pontos de corte estabelecidos pelo CLSI (M27-A3) e Eucast (Edef 7.2) para a avaliação de suscetibilidade aos agentes antifúngicos.....	51
FIGURA 3. Algoritmo da realização dos métodos laboratoriais.....	64
TABELA 4. Caracterização da coloração da colônia através do meio CROMAgar segundo a espécie de <i>Candida</i>	65
FIGURA 4. Desenho da plataforma de microarranjo de DNA elaborada pelo <i>Medical Mycology Reserch Center</i> avaliada no estudo.....	67

TABELA 5.	Condições de PCR utilizada para a metodologia de microarranjo de DNA para amplificação da região ITS1, 5.8S RNA ribossômico e ITS 2	69
FIGURA 5.	Plataforma de microarranjo de DNA. Resultados representativos de hibridização são observados no círculo de cada plataforma e o controle positivo (sequência comum a todos os fungos) está localizada a extrema direita de cada plataforma de microarranjo.....	71
TABELA 6.	Condições utilizadas na reação de sequenciamento (Applied Biosystems, USA).....	73
TABELA 7.	Condições de PCR utilizada no sequenciamento para a amplificação da região ITS1, 5.8S RNA ribossômico e ITS 2 do DNA genômico.....	73
TABELA 8.	Interpretação da concentração inibitória mínima dos antifúngicos avaliados segundo CLSI, 2008.....	76
TABELA 9.	Interpretação da concentração inibitória mínima dos antifúngicos avaliados segundo CLSI, 2012.....	76
FIGURA 6.	Seleção dos isolados de <i>Candida</i> spp incluídos no período de 2006 a 2010.....	81
TABELA 10.	Distribuição dos 167 isolados de espécies não- <i>Candida albicans</i> incluídos segundo a identificação pelo método Vitek 2® (bioMérieux), no período de 2006 a 2010.	82
TABELA 11.	Distribuição anual dos 167 isolados de espécies não- <i>Candida albicans</i> , no período de 2006 a 2010.....	83

TABELA 12.	Caracterização geral dos 162 pacientes incluídos com candidemia por espécies não- <i>Candida albicans</i> e <i>Candida</i> spp, no período de 2006 a 2010.....	84
FIGURA 7.	Resultado das lâminas após a realização da técnica de microarranjo de DNA para a identificação das espécies não- <i>Candida albicans</i>	86
TABELA 13.	Distribuição da identificação dos 167 isolados de espécies não- <i>Candida albicans</i> pelo microarranjo de DNA comparados ao sequenciamento.....	87
TABELA 14.	Identificação pelo método de sequenciamento do DNA dos 167 isolados de espécies não- <i>Candida albicans</i> incluídos.....	89
FIGURA 8.	Cromatograma do sequenciamento <i>C. glabrata</i> (ITS4 e ITS5).....	90
FIGURA 9.	Cromatograma de sequenciamento <i>C. guilliermondii</i> (ITS4 e ITS5).....	90
TABELA 15.	Comparação dos resultados de identificação dos 167 isolados de espécies não- <i>Candida albicans</i> através do método de microarranjo de DNA e sequenciamento de DNA.....	92
TABELA 16.	Descrição dos resultados discordantes nas diferentes metodologias do estudo.....	93
FIGURA 10.	Distribuição temporal por espécie dos 167 isolados de espécies não- <i>Candida albicans</i> de acordo com o sequenciamento, no período de 2006 a 2010.....	94

TABELA 17.	Distribuição anual por espécie dos 165* isolados de espécies não- <i>Candida albicans</i> de acordo com o sequenciamento, no período de 2006 a 2010.....	95
TABELA 18.	Distribuição por espécies dos 166 isolados de espécies não- <i>Candida albicans</i> segundo a suscetibilidade aos agentes antifúngicos de acordo com CLSI, 2008.....	97
TABELA 19.	Interpretação dos testes de suscetibilidade realizados pela metodologia de microdiluição em caldo comparando os pontos de corte do documento CLSI, 2008 e os pontos de corte clínicos.....	100
TABELA 20.	Estudos de identificação fúngica a partir de diferentes espécimes clínicos por meio do microarranjo de DNA.....	107
TABELA 21.	Estudos de identificação fúngica a partir de hemoculturas por meio do microarranjo de DNA.....	108
TABELA 22.	Estudos nacionais de candidemia de base hospitalar de suscetibilidade aos antifúngicos.....	113
TABELA 23.	Estudos internacionais de candidemia para avaliação de suscetibilidade	114
TABELA 24.	Resistência de isolados de <i>Candida glabrata</i> em estudos nacionais e internacionais.....	117

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Blast	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CBS	<i>Centraal bureauvoor Schimmel cultures</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and laboratory standards institute</i>
°C	Grau Celcius
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EIA PCR	<i>PCR enzymatic immune assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FAPESP	Fundação de Amparo á Pesquisa do Estado de São Paulo
FCM- Unicamp	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade estadual de Campinas
FDA	<i>Food and drug administration</i>
h	Hora
HC-Unicamp	Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
I	Intermediário
IO	Infecção oportunista
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
JICA	<i>Japan International Cooperation Agency</i>

MMRC	<i>Medical Mycology Reserch Center – Chiba University</i>
MALDI-TOF MS	Espectrometria de massa por dessorção-ionização de <i>Laser</i> em matriz
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mg/mL	Miligrama por mililitro
mM	Milimolar
min	Minutos
µg	Micrograma
µL	Microlitro
ng	Nanograma
PCR	Reação em cadeia de polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
pb	Pares de base
PCC	Pontos de corte clínicos
PCE	Pontos de corte epidemiológico
R	Resistente
S	Sensível
SDD	Sensível dose dependente
UFC	Unidade formadora de colônia
YEPD	<i>Yeast extract peptone dextrose</i>

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	xv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xxiii
1. INTRODUÇÃO.....	35
1.1. Aspectos epidemiológicos da candidemia.....	36
1.2. Diagnóstico laboratorial da candidemia na era pós- genômica.....	38
1.2.1. Métodos fenotípicos.....	39
1.2.2. Métodos genotípicos de identificação de espécies fúngicas.....	41
1.2.2.1. Plataformas de microarranjo de DNA.....	43
1.2.3. Análise proteômica: Método de espectrometria de massa por dessorção- ionização de laser em matriz (MALDI-TOF MS).....	44
1.3. Testes de suscetibilidade aos antifúngicos.....	46
1.3.1. Métodos de diluição em caldo.....	47
1.3.2. Métodos de difusão em disco.....	51
1.3.3. Métodos comerciais.....	52
2. OBJETIVOS.....	55

3. PACIENTES E MÉTODOS.....	59
3.1. Período do estudo.....	61
3.2. Desenho do estudo.....	61
3.3. Caracterização do local de estudo.....	61
3.4. População de estudo e seleção dos isolados.....	61
3.4.1. Seleção dos isolados.....	61
3.4.2. Critérios de inclusão.....	62
3.4.3. Critérios de exclusão.....	63
3.5. Métodos.....	63
3.5.1 Métodos laboratoriais microbiológicos e moleculares.....	63
3.5.1.1. Reativação dos isolados.....	64
3.5.1.2. Análise de hibridização do Microarranjo de DNA.....	65
3.5.1.2.1. Controle de qualidade.....	70
3.5.1.3. Sequenciamento de DNA.....	72
3.5.1.4. Método de microdiluição em caldo.....	74
3.6. Análise dos resultados.....	77
3.6.1. Análise de desempenho da plataforma de microarranjo de DNA.....	77
3.6.2. Avaliação da suscetibilidade aos agentes antifúngicos.....	77
3.6.3. Análise estatística.....	77
3.7. Aspectos éticos da pesquisa.....	78

3.8. Suporte financeiro.....	78
4. RESULTADOS.....	79
4.1. Caracterização da população de estudo.....	81
4.2. Identificação das espécies não- <i>Candida albicans</i> pelo método microarranjo de DNA.....	85
4.3. Identificação das espécies não- <i>Candida albicans</i> pelo método de sequenciamento.....	88
4.4. Comparação entre os diferentes métodos.....	90
4.5. Distribuição anual dos isolados de espécies não- <i>C. albicans</i> de acordo com a espécie identificada pelo sequenciamento de DNA..	93
4.6. Suscetibilidade dos isolados aos agentes antifúngicos.....	95
4.6.1. Comparação dos resultados de suscetibilidade aos antifúngicos entre o CLSI, 2008 e os pontos de corte clínicos.....	98
5. DISCUSSÃO.....	101
5.1. Distribuição temporal das espécies de <i>Candida</i> spp em episódios de candidemia no HC-Unicamp.....	103
5.2. Desempenho da nova plataforma de microarranjo de DNA para a identificação visual de espécies não- <i>Candida albicans</i>	104

5.3. Perfil de suscetibilidade aos antifúngicos dos isolados de espécies não- <i>Candida albicans</i>.....	111
5.4. Considerações finais.....	119
6. CONCLUSÃO.....	121
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125
8. ANEXOS.....	149
ANEXO 1. Métodos utilizados na rotina para a identificação dos isolados de espécies não- <i>Candida albicans</i> provenientes do sangue.....	151
ANEXO 2. Construção do banco de isolados do estudo.....	154
ANEXO 3. Dados de inserção das sondas da plataforma de microarranjo de DNA no GenBank.....	155
ANEXO 4. Parecer do Comitê de ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.....	160
ANEXO 5. Perfil de suscetibilidade de espécies de <i>Candida</i> spp.....	162
ANEXO 6. CIM dos 166 isolados de <i>Candida</i> spp aos antifúngicos avaliados.....	163
ANEXO 7. Manuscrito aceito para publicação no <i>Journal of Clinical Microbiology</i>	167

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Epidemiológicos da candidemia

As infecções fúngicas oportunistas continuam sendo causa de mortalidade e morbidade em pacientes gravemente enfermos e imunocomprometidos, como aqueles portadores de HIV, com câncer, em uso de quimioterapia para tumores sólidos ou hematológicos entre outros. Nos países em desenvolvimento, o diagnóstico de algumas infecções oportunistas tem sido considerado um problema prioritário, devido às dificuldades diagnósticas, necessidade de novas tecnologias e investimentos financeiros. Outra questão relevante refere-se ao desenvolvimento crescente de resistência aos antimicrobianos (1).

Os gêneros *Candida* spp. e *Aspergillus* spp têm sido envolvidos mais frequentemente como patógenos nesse grupo de pacientes. Estudos nacionais e internacionais demonstram que as leveduras do gênero *Candida* têm sido consideradas entre os principais agentes de infecção sistêmica, sendo o fungo isolado de infecção da corrente sanguínea (2). Em estudo multicêntrico brasileiro em hospitais terciários observou-se incidência de candidemia de 2,5 casos por 1.000 admissões, superior aos reportados em hospitais terciários nos Estados Unidos (0,28- 0,96/1.000) e Europa (0,17-0,76/1.000) (3, 4, 5, 6, 7). Recente estudo de vigilância de cinco anos, realizado no Hospital de Clínicas da Unicamp, demonstrou uma densidade de incidência de 0,54 casos por 1,000 pacientes - dia (8).

O perfil de distribuição proporcional das espécies de *Candida* tem se alterado sendo que nos últimos anos o isolamento de espécies não-*C. albicans* tem atingindo até 62% de todos os episódios (Brasil, América do Norte, Europa e América latina) (9, 10, 11). O impacto na redução da ocorrência de infecções por leveduras *Candida albicans*

ocasionado pelo uso profilático dos azólicos fez emergir as infecções causadas por *Candida* resistentes ao fluconazol como *Candida glabrata* e *Candida krusei*. A elevação de infecções por leveduras não-*Candida* em pacientes imunocomprometidos também tem sido observada (1,12).

Considerando a diversidade dos agentes causadores de candidemia e a emergência de espécies raras e menos suscetíveis, a identificação acurada da espécie implica em decisões clínicas e terapêuticas.

1.2. Diagnóstico laboratorial da candidemia na era pós-genômica

O atual diagnóstico laboratorial de candidemia na maior parte dos centros é baseado nos métodos convencionais ou sistemas automatizados de hemocultura. Embora estes sistemas tenham sido considerados um grande avanço para a investigação de candidemia nos últimas décadas, a acurácia destes métodos tem apresentado variações de 43% a 95% (13,14). Estudo envolvendo métodos mais sensíveis evidenciou falha na detecção em até 65% dos casos (15).

Considerando que a apresentação clínica da candidemia geralmente é inespecífica, decisões clínicas empíricas são necessárias, antes do conhecimento dos resultados da cultura. Nos últimos anos, a detecção precoce de candidemia por meio de métodos moleculares baseados em PCR representou uma elevação na sensibilidade e redução significativa do tempo de detecção se comparados aos métodos de hemocultura convencionais (16,17)

1.2.1. Métodos fenotípicos

Em muitas situações, os métodos fenotípicos permitem a identificação acurada da espécie. Estes métodos baseiam-se no crescimento das colônias em meios sólidos e na detecção das estruturas reprodutivas através da incubação do isolado no meio de esporulação apropriado. O reconhecimento das características estruturais (forma, tamanho, cor e modo de ligação) é utilizado no processo de identificação complementado pelos métodos bioquímicos, fisiológicos e de termotolerância. Para a identificação da espécie são empregados meios de cultura diferenciais para a detecção de estruturas reprodutivas, testes baseados na fisiologia fúngica e testes sorológicos (18, 19, 20).

Como resultado de modificações na morfologia celular, falha na esporulação e mutações genéticas a identificação fenotípica clássica pode ocasionar diagnósticos imprecisos. Recentes avanços na taxonomia filogenética têm revelado espécies clinicamente importantes ainda não conhecidas, que se apresentam morfologicamente indistinguíveis. Além disto, em alguns casos o tempo necessário para o processamento e identificação de algumas espécies pode ser crítico para pacientes de alto risco. Na dependência da espécie implicada, o tempo de crescimento e as características macromorfológicas e micromorfológicas são bastante variáveis necessitando experiência técnica apurada para a identificação (13,21).

Os métodos fenotípicos comerciais disponíveis, classificados como manuais e automatizados, baseiam-se na assimilação de açúcares e outros substratos (Tabela 1). Quando associados a métodos suplementares (macro e micromorfologia), os testes

comerciais para identificação manual tem apresentado desempenho de 68% a 97,4% e podem gerar resultados em até 72 horas (22, 23, 24, 25, 26).

Dentre os métodos fenotípicos automatizados os mais difundidos para a identificação de leveduras são o Vitek® (BioMérieux), Vitek 2® (BioMérieux), Microscan Rapid Yeast Ident (Baxter) e o AutoMicrobic (BioMérieux).

Estes sistemas informatizados são baseados em métodos bioquímicos de identificação e são de grande utilidade para laboratórios clínicos de grande porte. Entretanto a acurácia destes métodos tem apresentado variações de 43% a 95% para a identificação de espécies comuns e raras (14, 27). Devido às limitações dos métodos clássicos, têm sido propostos diversos métodos genotípicos para a detecção qualitativa, quantitativa e identificação das infecções fúngicas invasivas.

Tabela 1. Exemplos do desempenho dos métodos fenotípicos comerciais.

Sistema	Tipo	Acurácia	Referência
API Candida	Manual	68 %	Fricker <i>et al</i> , 1996 (22)
		97,4%	Buchaille <i>et al</i> , 1998 (23)
Auxacolor	Manual	43% - 94,1%	Paugam <i>et al</i> , 1999 (24) Melatidis <i>et al</i> , 2011 (14)
Candida fast	Manual	88,8%	Gundes <i>et al</i> , 2001 (25)
Microscan	automatizado	86,9%	Land <i>et al</i> , 1991 (26)
Vitek 2 YST	automatizado	94,8%	Aubertine <i>et al</i> , 2006 (27)
		98%	Melatidis <i>et al</i> , 2011 (14)

1.2.2. Métodos genotípicos de identificação de espécies fúngicas

Com o objetivo de preencher as lacunas deixadas pelos testes fenotípicos, métodos baseados na análise do genoma e de outros componentes fúngicos têm sido desenvolvidos para a identificação dos diversos fungos (leveduras e filamentosos).

Os métodos baseados na amplificação de ácidos nucleicos definem alvos gênero ou espécie-específicos e são os mais amplamente utilizados. Estes testes em geral estão focados na detecção de *Candida* spp e de *Aspergillus* spp, no entanto, nos últimos anos, à medida que o perfil epidemiológico e de suscetibilidade se alteram há necessidade de definição espécie-específica bem como de outras espécies emergentes (1,13).

A definição dos alvos em geral se baseia nas regiões 18S e 28S do ribossoma para a análise de gênero, enquanto que para a análise de espécies e de clados, as regiões ITS e as regiões dominantes variáveis (D1 e D2) são mais apropriadas (28). As regiões ITS e D1/D2 permanecem as regiões mais frequentemente sequenciadas, entretanto várias outras tem sido estudadas como o loci universal EF-1 (fator de alongamento translacional), a β -tubulina e o gene *RPB2* (codificador da segunda maior unidade da RNA polimerase (29, 30, 31).

A reação em cadeia da polimerase em único passo e não automatizada, embora muito útil para estudos taxonômicos não é prática para os laboratórios clínicos que trabalham com diversas espécies e com grande volume. Na tentativa de solucionar esta questão diversos métodos têm sido desenvolvidos como o *randomly amplified polymorphic*

DNA (RAPD), rep PCR, PCR-*restriction fragment lenght polymorphism* (RFLP), PCR-*enzymatic immune assay* (EIA) e a PCR em tempo real (32,33).

O RAPD apresenta baixa reprodutibilidade, sendo, portanto de baixa utilidade; a rep PCR requer a ampliação do painel de espécies, bem como um maior número de isolados com representatividade geográfica; a nested PCR permite aprimorar a especificidade do método através de duas fases com diferentes iniciadores, sendo a segunda com iniciadores internos espécie-específicos; a PCR-RFLP é útil, entretanto pode ser influenciada pela presença de introns; a PCR-EIA embora capaz de identificar várias espécies, tem sido superado por outros formatos mais modernos como os microarranjos de DNA e Luminex (34,35).

A PCR em tempo real tem sido considerada promissora, pois permite a quantificação do DNA pela monitorização em tempo real, ou seja, à medida que a reação ocorre, ocorre a ligação de uma molécula ao produto do DNA que se acumulará a cada ciclo (36). As principais vantagens desta metodologia são: elevar a especificidade através da discriminação de amplificações inespecíficas, identificar espécies desconhecidas baseado na curva cinética de fusão e ainda a possibilidade de diferenciar colonização de infecção verdadeira baseado na carga fúngica, embora esta característica ainda necessite validação clínica (37).

O sequenciamento apresenta uma excelente especificidade sendo considerado o padrão ouro para a identificação molecular dos fungos, entretanto no formato tradicional é laborioso e de elevado custo (30).

Baseado em sequências previamente definidas e com vistas a permitir um amplo espectro de identificação os microarranjos de DNA têm sido desenvolvidos em diversos formatos (lâmina de vidro, membranas ou placas) através da plotagem de múltiplas sequências de oligonucleotídeos de interesse e a identificação da levedura ou do fungo filamentosos com precisão (38).

1.2.2.1. Plataformas de Microarranjo de DNA

Há mais de uma década, a tecnologia das plataformas de DNA vem sendo empregada para a detecção e identificação simultânea de vários agentes patogênicos. A análise por microarranjos de DNA permite a detecção, identificação bem como a avaliação da resistência aos fármacos. Além disso, o monitoramento das respostas do hospedeiro à infecção e a terapia representa um campo em expansão e promissor para o desenvolvimento de novos testes diagnósticos que permitam avaliar de forma combinada o microrganismo e o hospedeiro (39).

Tem sido evidenciado a extensa aplicabilidade da plataforma de microarranjo de DNA para diversos patógenos (40). Lin e colaboradores (41) demonstraram a aplicação para a identificação de múltiplos patógenos infecciosos, para avaliação sindrômica das doenças respiratórias. Diversos formatos de microarranjos vêm sendo propostos e avaliados nos últimos anos que acoplado ao PCR convencional ou ao PCR multiplex, permitem em uma única reação a detecção e identificação simultânea de um painel de patógenos. Khodakov e colaboradores (42) descreveram uma nova abordagem de identificação e quantificação simultânea do vírus da imunodeficiência (HIV-1) e do vírus da hepatite B e C em amostras de plasma de doadores.

Os sistemas de detecção utilizados nas plataformas de microarranjos de DNA são baseados em métodos ópticos e incluem a detecção visual, fluorescência, luminescência e ressonância. Métodos de detecção que utilizam a fluorescência e luminescência são considerados mais sensíveis, entretanto utilizam equipamentos automatizados (*scanners*) de elevado custo (até \$500) para a leitura. A detecção colorimétrica visível a olho nú é uma opção de menor custo, sendo realizada através da adição de enzima que produz um substrato que resulta em um precipitado insolúvel e permite a expressão de pontos de coloração que não necessitam equipamentos ópticos de visualização (43).

O método de microarranjo de DNA se destaca pela facilidade de interpretação e elevado desempenho. Apresenta alta especificidade e sensibilidade através da análise paralela de uma grande diversidade de sequências distintas. Além disto, pode ser executado em cerca de cinco horas a partir da hemocultura, bem mais rápido dos que os métodos bioquímicos, o que pode ser definitivo na evolução clínica do paciente (44).

1.2.3. Análise proteômica: Método de Espectrometria de massa por dessorção-ionização de laser em matriz (MALDI-TOF MS).

Mais recentemente o método MALDI-TOF MS emergiu como um método promissor para a identificação de isolados clínicos de leveduras e fungos. Baseado em espectrometria de massa, a técnica de ionização suave gera um perfil espectral ou impressão digital das proteínas, que se apresenta único e específico em cada espécie (45) (Figura 1).

O método é acurado na identificação a partir do subcultivo em meio sólido para *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans*, no entanto tem apresentado desempenho subótimo (41,2% a 82,5%) para a identificação de fungos raros. Dentre os gêneros que apresentam baixo desempenho estão incluídos *Aurobasidium* spp, *Cryptococcus* spp, *Pichia* spp e *Geotrichum* spp (46, 47, 48). Já a identificação de espécies do gênero *Candida* diretamente da hemocultura tem apresentado elevada acurácia (91% a 100%), entretanto o método tem falhado na identificação de culturas mistas e com densidade de fungos inferior ao limiar estabelecido para a metodologia (47).

Outra limitação relaciona-se a base de dados disponíveis nas bibliotecas, já que o sucesso da identificação está diretamente relacionado à disponibilidade dos dados. Estudos multicêntricos de larga escala são necessários para a avaliação de impacto e utilidade do MALDI-TOF MS para o laboratório clínico (46).

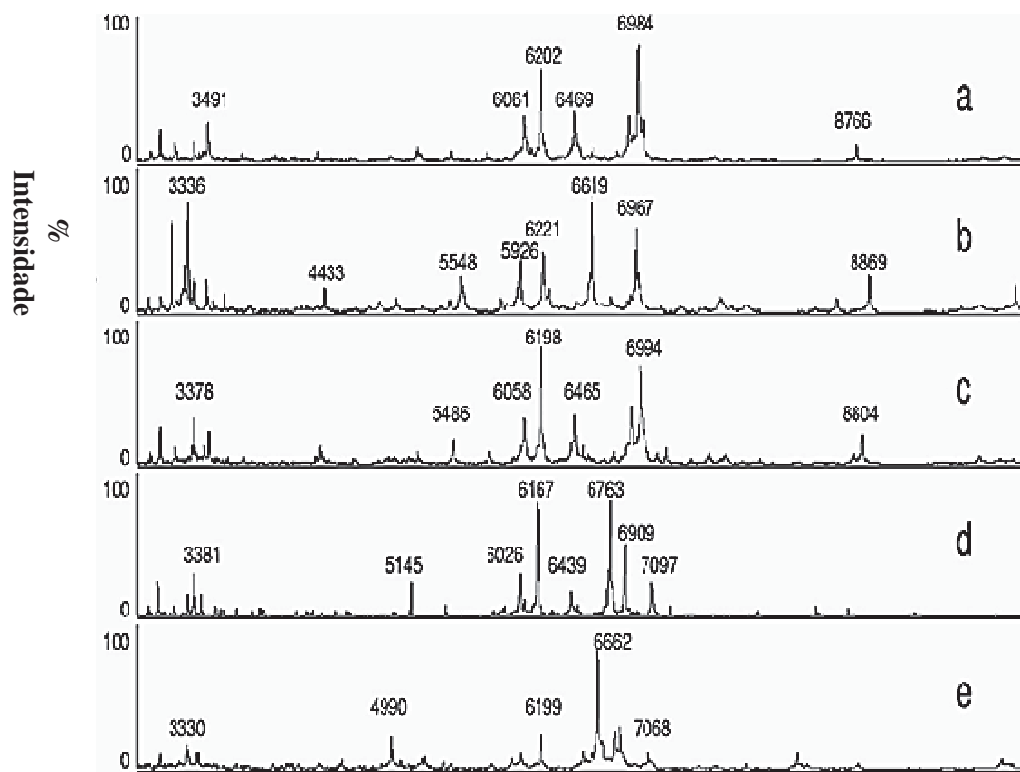


Figura 1. Espectros de massa (m/z 3,000 a 10,000) obtidos através do MALDI-TOF MS de *Candida albicans* (a), *Candida glabrata* (b), *Candida tropicalis* (c) *Candida krusei* (d) e *Candida parapsilosis* revelando diferenças entre as espécies. Adaptado de: Marklein G *et al*, 2009 (36).

1.3. Testes de suscetibilidade aos antifúngicos

Até o início da década de 1990, os testes de suscetibilidade aos antifúngicos não eram padronizados e por consequência não apresentavam boa reprodutibilidade intra e interlaboratorial. Desde então, numerosos estudos atestaram a influencia de fatores técnicos nos resultados *in vitro*. Neste sentido, o *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) e o

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Eucast) padronizaram metodologias para os testes de suscetibilidade *in vitro* (49).

Atualmente, os métodos disponíveis para uso em laboratório clínico são os métodos de diluição em caldo, os baseados em ágar e os comerciais (49).

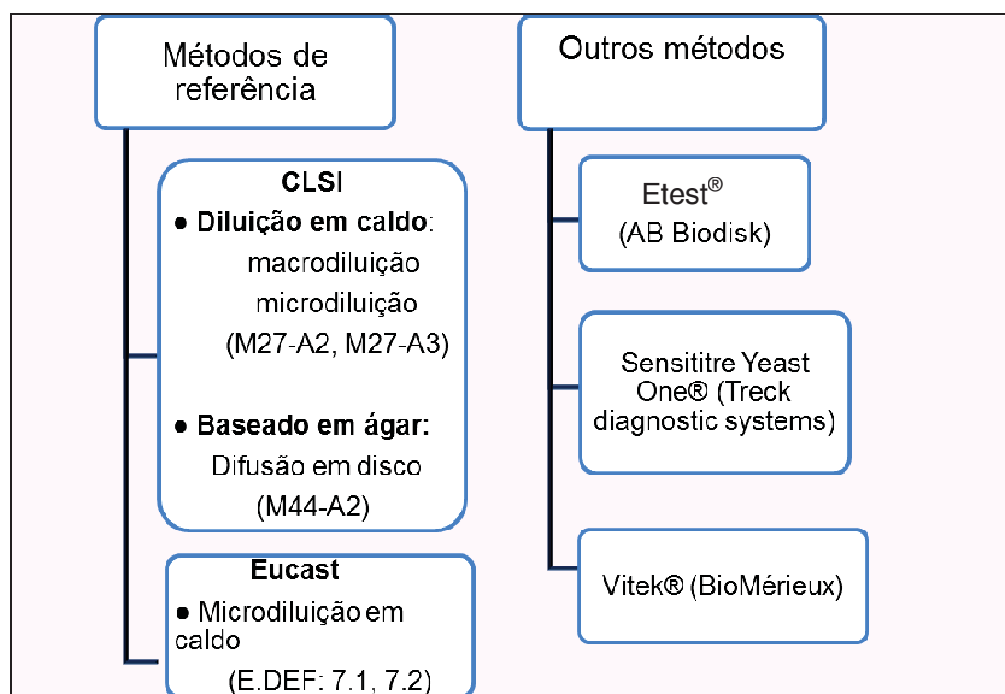


Figura 2. Métodos para avaliação de suscetibilidade aos agentes antifúngicos utilizados no laboratório clínico. Adaptado de Pfaller *et al*, 2012 (50).

1.3.1. Métodos de diluição em caldo

Atualmente a metodologia de referência utilizada para o antifungigrama é o método de diluição em caldo. Há dois padrões reconhecidos internacionalmente para os

testes de suscetibilidade aos antifúngicos para *Candida* spp: o método de microdiluição em caldo desenvolvido pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) (documentos M27-A2 e M27-A3) (51,52) e o método desenvolvido pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (Eucast) (documentos Edef 7.1 e 7.2) (53, 54).

O procedimento padrão preconizado pelo EUCAST para leveduras fermentativas baseou-se no documento M27-A2 e incorporou modificações com vistas a facilitar a aplicabilidade do método. Comparando-se ao M27-A2, que preconiza incubação e leitura de até 48 h as modificações incluíram: período de incubação e leitura espectrofotométrica de 24 h, utilização de meio RPMI 1640 suplementado com 2% de glicose, concentração do inóculo de $0,5 \times 10^5$ - $2,5 \times 10^5$ UFC /mL, microplacas de fundo plano e diferentes pontos de corte. A comparação entre as duas metodologias estão detalhadas na tabela 2 (53).

O subcomitê de testes de suscetibilidade aos antifúngicos do CLSI e colaboradores tem desenvolvido diversos estudos com a finalidade de obter a congruência com a metodologia preconizada pelo Eucast. Neste sentido, a diminuição do tempo de incubação e leitura para 24 horas tem sido validada (CLSI-24 h) para anfotericina B, fluconazol, 5-fluocitocina, itraconazol, posaconazol e voriconazol (55). Os resultados obtidos tem apresentado boa concordância essencial e categórica com os resultados obtidos utilizando-se o período de incubação de 48 horas bem como elevada concordância com os resultados obtidos por meio da metodologia proposta pelo Eucast (56, 57).

Embora a metodologia de referência seja confiável e de grande utilidade, ainda apresenta limitações. Além de ser laboriosa para a realização na rotina dos laboratórios clínicos requer até 48 h para a obtenção dos resultados. Outro aspecto relevante refere-se à

anfotericina B, que além de gerar um restrito intervalo de variação, não permite a discriminação consistente entre isolados suscetíveis e resistentes de espécies de *Candida* spp (51, 58).

Com o objetivo de desenvolver metodologias de fácil execução e mais aplicáveis a rotina dos laboratórios clínicos, metodologias alternativas têm sido avaliadas (56).

Tabela 2. Diferenças entre as metodologias preconizadas pelo CLSI (M27-A3) e Eucast (Edf 7.1 e 7.2) para a avaliação de suscetibilidade aos agentes antifúngicos (51, 53, 54).

Característica	CLSI (M27-A3)	Eucast (Edf 7.2)
Concentração do Inóculo	0,5–2,5 X 10 ³ CFU ml ⁻¹	0,5–2,5 X 10 ⁵ CFU ml ⁻¹
Meio de cultura	RPMI 1640 + 0,2% glucose	RPMI 1640 + 2% glucose
Tipo de placas de microdiluição	Fundo em formato de U	Fundo plano
Temperatura	35 C°	35 C° - 37 C°
Tempo de incubação e Ponto final de leitura	24 - 48 h	18 - 24 h
Leitura	Visual	Espectrofotométrica
Determinação CIM	*100% anfotericina B	50% azólicos, 5-FC e equinocandinas
	50%: azólicos, 5-FC e equinocandinas	90% anfotericina B

*100%: menor concentração do antifúngico capaz de inibir qualquer crescimento visível; 50%: menor concentração do antifúngico que consegue inibir 50% do crescimento obtido no controle positivo; 90%: redução de 90% em comparação ao controle positivo.

Interpretação dos resultados

Diferentes pontos de corte foram definidos pelo CLSI e Eucast. No documento M27-A3, os pontos de corte foram definidos por antifúngico para todas as espécies do gênero *Candida* spp. O documento Edef 7.2 define pontos de corte clínicos espécie-específicos e pontos de corte epidemiológicos e tem determinado pontos de corte para as equinocandinas. A comparação entre os pontos de corte para as espécies não-*C. albicans* do documento M27-A3 e Edef 7.2 são descritos na tabela 3 (51,52,53,54).

Nos últimos anos, o subcomitê de testes de suscetibilidade aos antifúngicos do CLSI e colaboradores, tem estabelecido pontos de corte epidemiológicos (PCE) e novos pontos de corte clínicos espécie- específicos (PCC) para os triazóis e equinocandinas para espécies de *Candida* spp. Adicionalmente, tem sido reportada a elevada concordância entre as concentrações inibitórias mínimas (CIM) obtidas através do CLSI 24 h e EUCAST bem como similaridade dos valores dos PCE e PCC entre as metodologias (57, 58, 61, 62).

Em contrapartida, O CLSI (M27-A3) não define pontos de corte para anfoterina B e sugere que aqueles isolados com valor de CIM >1 µg/mL apresentam possibilidade da apresentação de resistência (51). Baseado em dados farmacocinéticos, microbiológicos e de experiência clínica, o documento Edef 7.2 considera resistente os isolados que apresentarem MIC > 1 mg/L para algumas espécies (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*) embora a correlação *in vitro* das CIM ao desfecho clínico ainda não tenha sido estabelecida (54).

Tabela 3. Comparação dos pontos de corte estabelecidos pelo CLSI (M27-A3) e Eucast (Edef 7.2) para a avaliação de suscetibilidade aos agentes antifúngicos.

Antifúngico	não- <i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i> *	<i>C. parapsilosis</i>
	M27-A3	EDF 7.2	EDF 7.1	EDF 7.1
	R / NS	R >	R>	R >
Amfotericina B	ND	1*	1	1
Caspofungina	> 2	ND	ND	ND
Anidulafungina	> 2	0,06	0,06	4
Fluconazol	≥ 64	4	32	4
Itraconazol	≥1	EA	EA	EA
Micafungina	> 2	NR	0,006	2
Posaconazol	ND	0,006**	ND	0,006
voriconazol	≥ 4	0,12**	ND	0,12
5 FC	≥ 32	ND	ND	ND

*Ponto de corte estabelecido somente para algumas espécies não-*C. albicans*.

**ponto de corte informado somente para *Candida tropicalis*; NS: não suscetível; ND: não definido; EA: em análise; NR: não reportado.

1.3.2. Método de difusão em disco

O método de difusão em disco tem sido de grande utilidade para os laboratórios clínicos de rotina. A flexibilidade, simplicidade e o baixo custo do método faz com que seja atrativo para uso na rotina laboratorial (62). 1311

Em 2004, o CLSI padronizou o método para *Candida* spp com leitura de 48 horas e estabeleceu pontos de corte para fluconazol e voriconazol no documento M44-A2 (63). Contudo, o CLSI tem desenvolvido novos critérios de leitura e interpretação para *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* frente a fluconazol e

voriconazol. Estes critérios incluem a leitura de 24 horas e novos pontos de corte para o diâmetro de halo (61,65).

1.3.3. Métodos Comerciais

Outros métodos comerciais tem sido avaliados comparativamente ao método de microduição em caldo. Aprovados pela *Food Drug Administration* (FDA) dos EUA, o Etest® (AB Biodisk) e Sensititre YeastOne® (Trek Diagnostics) têm apresentado elevada reprodutibilidade e correlação com o método de referencia. Estudos têm demonstrado concordância de 85% a 98,1% entre Etest® e o método de referência (M27-A2) dependendo da associação do antifúngico e espécie avaliada. Além disto, estudos têm indicado que o Etest® proporciona uma melhor discriminação entre isolados de *Candida* sensíveis e resistentes à anfotericina B em comparação ao método de referência e sugerem que as CIMs obtidas por meio deste ensaio são mais preditivas do resultado do tratamento. Para o Sensititre YeastOne, a concordância reportada com o método de referencia foi de 82% a 90% (66,67, 68, 69,70).

Apresentando formato de microdiluição em caldo, o *kit* de microdiluição em placa congeladas pré-preparadas (Eiken Chemical Co.) tem sido considerado confiável e conveniente para utilização em laboratórios de rotina. Já contendo os antifúngicos nas respectivas concentrações seriadas, o método foi padronizado segundo as diretrizes do documento M27-A2. Estudo multicêntrico realizado no Japão reportou excelente concordância e equivalência com o método de referência (71).

Adicionalmente, sistemas totalmente automatizados vêm sendo desenvolvidos e avaliados. Aprovado pelo FDA em 2006 para utilização clínica na detecção de resistência ao fluconazol, o sistema Vitek 2® tem demonstrado elevada reprodutibilidade e excelente concordância categórica com o método de referência do CLSI não só para fluconazol mas também para anfotericina B, 5- flucitosina e voriconazol sendo capaz de determinar os valores da CIM para espécies de *Candida* entre 14 a 18 horas de incubação (69,72, 73).

O método MALDI-TOF MS tem apresentado resultados preliminares promissores para avaliação de susceptibilidade de isolados de algumas espécies de *Candida* spp (74). De Carolis e colaboradores (75) demonstraram concordância de 100% entre MALDI-TOF MS e o método de referência à caspofungina para todos os isolados avaliados dos gêneros *Candida* e *Aspergillus*. O antifúngico fluconazol também tem sido avaliado apresentando excelentes resultados. Entretanto, estudos adicionais são necessários para avaliação da eficácia e reprodutibilidade do método utilizando um maior número de isolados de diversas espécies de leveduras, bem como a avaliação de agentes antifúngicos adicionais (45, 46, 47, 75).

Considerando as alterações epidemiológicas na distribuição das espécies de *Candida* spp descritas na última década, bem como a relevância do conhecimento do perfil de suscetibilidade aos antifúngicos na definição da conduta terapêutica, este estudo propõe-se a agregar informações relativas a estes tópicos num hospital terciário.

2. OBJETIVOS

- Avaliar a sensibilidade de uma nova plataforma de microarranjo de DNA para a identificação visual de espécies não-*C. albicans*, isoladas de pacientes com candidemia, atendidos no Hospital de Clínicas da Unicamp.
- Avaliar o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos dos isolados de espécies não-*C. albicans* de pacientes com candidemia, atendidos no Hospital de Clínicas da Unicamp.

3. Material e Métodos

3.1. PERÍODO DE ESTUDO

De janeiro de 2006 a dezembro de 2010.

3.2. DESENHO DO ESTUDO

Retrospectivo transversal.

3.3. CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTUDO

O estudo foi conduzido no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC-Unicamp), hospital universitário terciário de referência que conta com 419 leitos para Campinas e macro região em uma área de mais de seis milhões de habitantes.

O trabalho experimental foi desenvolvido no Setor de Micologia do Laboratório de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica do HC- Unicamp e no Laboratório de Epidemiologia Molecular e doenças transmissíveis, da Disciplina de Moléstias Infecciosas da FCM- Unicamp.

3.4. POPULAÇÃO DE ESTUDO E SELEÇÃO DOS ISOLADOS

3.4.1. Seleção dos isolados

A seleção dos casos foi realizada a partir do levantamento de registros do banco de dados do Setor de Micologia do Laboratório de Microbiologia do HC-Unicamp e revisão

de prontuários para a obtenção dos dados clínico-epidemiológicos. Durante o período de estudo foram identificados 313 isolados de *Candida* spp procedentes de hemoculturas no HC-Unicamp.

Dentre estes, foram selecionados isolados de espécies não-*C. albicans* e *Candida* spp provenientes de hemoculturas identificadas primariamente pelo VITEK 2® (bioMérieux). As cepas selecionadas, pertencentes à micoteca do Setor de Micologia, foram obtidas a partir dos exames realizados na rotina de assistência ao paciente. Após a identificação, os isolados foram estocados em frascos de vidro, com tampa de borracha e lacre, contendo água destilada estéril e conservados em temperatura ambiente.

Foram incluídas como controle de qualidade quatro cepas de referência: *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. glabrata* (ATCC MYA 2950), *C. krusei* (ATCC 6258), *C. albicans* (ATCC 76615) e *C. dubliniensis* (CBS 7987).

3.4.2. Critérios de inclusão

Foram incluídos isolados:

- provenientes de hemoculturas;
- provenientes de pacientes com idade maior ou igual a 18 anos;
- de leveduras previamente identificadas pelo VITEK 2® como espécies não-*C. albicans* ou *Candida* spp.

3.4.3. Critérios de exclusão

Foram excluídos isolados:

- que não apresentaram crescimento adequado nos meios de cultura;
- que apresentaram contaminação por outros microrganismos após o subcultivo;

3.5. MÉTODOS

3.5.1. Métodos laboratoriais microbiológicos e moleculares

Os métodos de hemocultura e identificação utilizados no período de estudo durante a rotina foram os métodos automatizados Bact/ALERT (bioMérieux), Vitek 2[®] (bioMérieux) e métodos manuais clássicos (Anexo 1). No presente estudo, após a seleção, os isolados da micoteca, estocados em água destilada estéril a temperatura ambiente, foram reativados em meio líquido YMA (glicose, extrato de levedura, peptona, extrato de malte, água destilada).

A seguir foram realizadas as seguintes etapas (Figura 3):

- isolamento em CHROMagar Candida[®] (Becton Dickinson)
- subcultivo em ágar Sabouraud dextrose;
- Identificação por meio do microarranjo de DNA
- Sequenciamento do DNA

- Realização do método de microdiluição em caldo utilizando-se “dry plate” (Eiken Co)

(66)

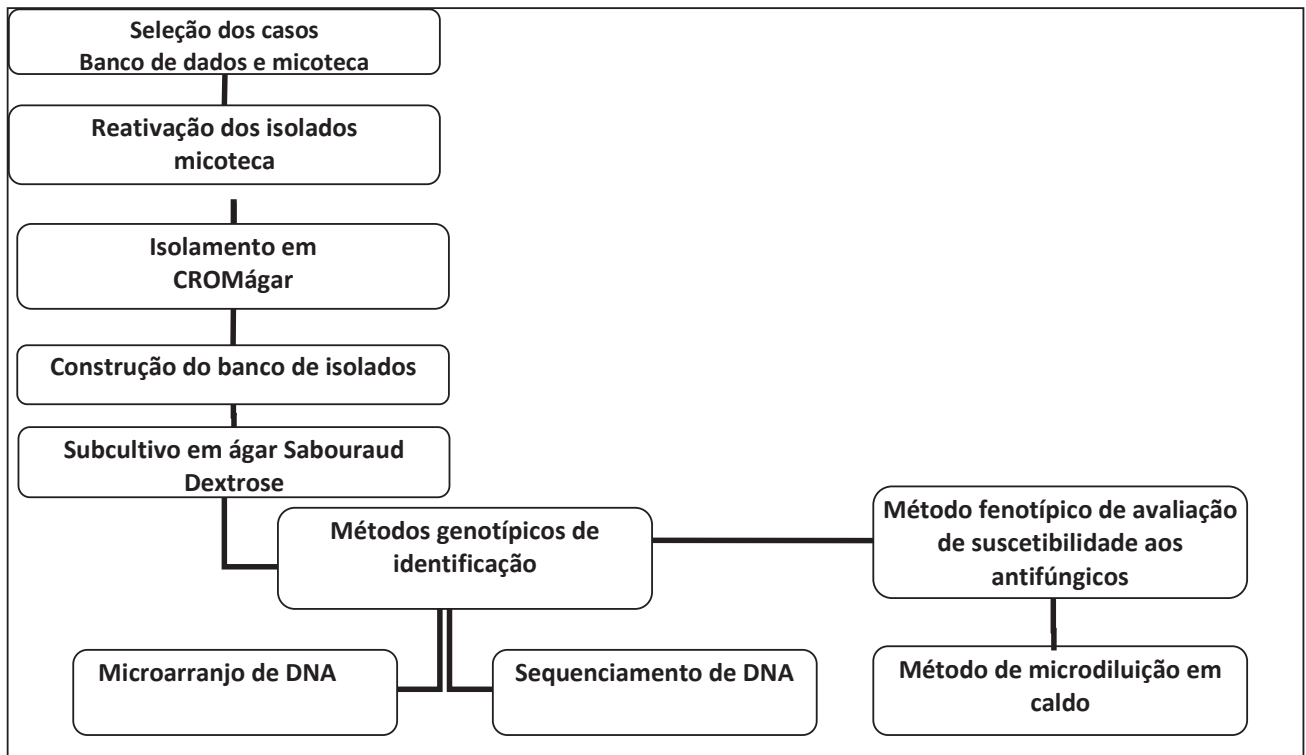


Figura 3. Algoritmo da realização dos métodos laboratoriais

3.5.1.1. Reativação dos isolados

A partir dos isolados estocados na Micoteca do Setor de Micologia do Laboratório de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da Unicamp, foi retirada uma pequena alíquota da suspensão fúngica. Esta foi adicionada à microplaca contendo YMA (glicose, extrato de levedura, peptona, extrato de malte, água destilada) e incubada por 24 h a 35°C (Anexo 2). Havendo crescimento, as amostras foram

semeadas em Ágar Sabouraud dextrose e novamente incubadas em estufa, a 35°C, por um período de 24 a 48 h.

Todos os isolados foram cultivados em meio cromogênico CHROMagar Candida® para re-confirmação da espécie e da ausência de contaminação por outra espécie de *Candida*. Consideraram-se os critérios de interpretação de coloração da colônia de acordo com as especificações do fabricante conforme mostra a tabela 4.

Tabela 4. Caracterização da coloração da colônia através do meio CROMAgar segundo a espécie de *Candida*.

Cor da colônia	Espécie
Verde claro	<i>C. albicans</i>
Azul esverdeado	<i>C. tropicalis</i>
Rósea a vermelho claro	<i>C. krusei</i>
Malva claro a escuro	outras

3.5.1.2. Análise de hibridização do microarranjo de DNA

O método pode ser descrito em quatro partes: *a.* elaboração da plataforma de microarranjo; *b.* amplificação do DNA alvo por PCR; *c.* hibridização; *d.* coloração e *e.* leitura.

a. Formato e elaboração da plataforma de microarranjo

As plataformas de microarranjo de DNA foram previamente elaboradas por pesquisadores da “*Medical Mycology Reserch Center*” (MMRC) – Chiba University e com a colaboração de pesquisadores da FCM- Unicamp. A plataforma contém 12 gêneros e 32 espécies fúngicas, incluindo 10 espécies do gênero *Candida* conforme mostra a figura 4.

As sondas de oligonucleotídeos foram desenhadas baseadas em sequencias ITS de cepas de referência depositadas no GenBank pela *American Type Culture Collection* (ATCC), *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS) e MMRC-Chiba (IFM). As múltiplas sequências foram alinhadas no programa ATSQversão 6.0.1 (genetix corporation, Tokyo). BioEdit (versão 7.1.3. [<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>]). Após o alinhamento, foi possível identificar as sequências únicas e específicas de cada espécie e assim redefinir as sondas de oligonucleotídeos gênero ou espécies específicas. As sondas foram compostas de 14 a 20 sequências de oligonucleotídeos espécie-específicas e biotina ligada á múltiplas bases de tiamina no final de cada sonda.

Para desenvolver sondas espécies específicas, sequências das regiões ITS1 e ITS2 da espécie alvo foram comparadas a regiões que apresentavam variações intraespecíficas. Regiões conservadas foram utilizadas para o desenvolvimento das sondas gênero-específicas e para o controle positivo. As sondas foram então depositadas no GenBank sendo que descrição completa pode ser obtida através do link <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/?term=GFM%5Bsubm%5D>. A descrição dos dados de inserção no GenBank bem como o número de acesso estão detalhadas no anexo 3.As

sondas sintetizadas pela Invitrogen (Showajima, Japão) foram então plotadas em lâminas de plástico (NGK Insulators LTD, Aichi, Japan) utilizando-se o aparelho KCS mini microarray printer (Kubota Comps. Corporation).

biotin	<i>Histoplasma capsulatum</i>	biotin	<i>Candida guilliermondii</i>	biotin	<i>Aspergillus nidulans</i>
biotin	<i>Coccidioides posadasii</i>	biotin	<i>Candida lusitanae</i>	biotin	<i>Aspergillus terreus</i>
		biotin	<i>Candida Krusei</i>	biotin	<i>Aspergillus niger</i>
biotin	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>			biotin	<i>Aspergillus flavus</i>
		biotin	<i>Candida glabrata</i>	biotin	<i>Aspergillus fumigatus</i>
biotin	<i>Blastomyces dermatitidis</i>				
		biotin	<i>Candida parapsilosis</i>	biotin	<i>Trichophyton rubrum</i>
biotin	<i>Cryptococcus neoformans</i>				
		biotin	<i>Candida tropicalis</i>	biotin	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
				biotin	<i>Trichophyton tonsurans</i>
biotin	<i>Trichosporon cutaneum</i>	biotin	<i>Candida dubliniensis</i>	biotin	<i>Penicillium marneffei</i>
biotin	<i>T. asteroides; T. inkin</i>	biotin			
biotin	<i>T. asahii; T. faecale</i>				
	<i>Trichosporon mucoides</i>	biotin	<i>Candida albicans</i>	biotin-35	<i>Fusarium spp</i>
biotin	<i>Malassezia furfur</i>				
		biotin	<i>Candida famata</i>	biotin-36	<i>Fusarium solani</i>
biotin-32	<i>Mucor sp</i>				
biotin-33	<i>Rhizomucor sp</i>		<i>Candida kefyr</i>		
				biotin-29	50-19 50-17
				biotin-30	51-19 51-17
				biotin-31	52-19R 52-17R

Figura 4. Desenho da plataforma de microarranjo de DNA elaborada pelo *Medical Mycology Reserch Center* avaliada no estudo.

b. Amplificação do DNA alvo por PCR

A partir do isolado estocado em uma solução de YEPD (extrato de levedura, dextrose, bactopectona, água destilada) e glicerol (e repicado em meio àgar Sabouraud dextrose) foi feita uma suspensão fúngica em água destilada estéril e aliquoteado para a PCR. Esta reação incluiu 1 µL da suspensão fúngica, 1,25 µL dos primers ITS1 e ITS4 (10 pmol), 12,5 µL de PCR “master mix” (Promega Corp.) (50 unid/mL de *Taq* DNA polymerase fornecida com o tampão apropriado (pH 8.5), 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP, 3 mM MgCl₂), e 9 µL água livre de nuclease. A PCR foi realizada de acordo com os parâmetros descritos na tabela 5.

A seguir, os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando-se marcador molecular de 100 pares de base (Invitrogen, Carlsbad, USA), corados com brometo de etídeo a 0,5% e visualizados em transluminador de UV.

c. Desnaturação e Hibridização

Para a desnaturação, foi utilizado 4 µl do produto de amplificação e procedeu-se o aquecimento a 95°C por 2 minutos, o resfriamento em banho de gelo por 2 minutos e a adição de 16 µl do tampão de hibridização (tetramethylammonium chloride 2 M, SDS 10%, 5 mM EDTA, 6× SSC) (Kurabo). O volume total de 20 µl desta solução foi adicionado à lâmina de plástico (plataforma) colocada em uma caixa úmida com água destilada. A lâmina foi coberta com um filme plástico e a caixa tampada e acondicionada

em estufa a 37°C por 2 h para a hibridização. A seguir, removeu-se o filme e a solução lavando-se a lâmina em tampão de lavagem (0,138 M NaCl; 0,0027 M KCl) (Kurabo).

Uma aliquota de 1,4 mL de solução conjugada (tampão PBS, 0,05% Tween-20, 0,02 mg/mL Biotina HRP, 0,04 mg/mL streptavidin) (Kurabo) foi adicionada a lâmina por 30 minutos e lavada com o tampão de coloração (tampão PBS, 0,05% Tween-20) por 5 min a 37°C .

Tabela 5. Condições de PCR utilizada para a metodologia de microarranjo de DNA para amplificação da região ITS1, 5.8S RNA ribossômico e ITS 2 .

INICIADORES	ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'		
	ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'		
REAÇÃO	Promega PCR Master Mix 2X		
	<i>Primer ITS1 10µM</i>		
	<i>Primer ITS4 10µM</i>		
AMPLIFICAÇÃO	DNA		
	1 ciclo	95 ⁰ C	2 min
	30 ciclos	95 ⁰ C	30 seg
		55 ⁰ C	30 seg
ELETROFORESE	agarose 1,5%	100V	

d. Coloração e leitura

Após a hibridização a lâmina foi colocada sobre papel toalha sendo adicionado 1,4 mL da solução corante por 30 minutos (0,2 M CH₃COONa, 2% TMB, DMF, 0,5 mg/mL ácido algínico, 1,5% H₂O₂, água destilada). Após esta etapa, retirou-se a solução conjugada por meio da lavagem com água destilada.

e. Interpretação

A identificação da espécie foi realizada com base na visualização direta das sequências hibridizadas e localizadas em posições específicas da lamina através da comparação do resultado com o mapa de construção do microarranjo (Figura 4 e 5).

3.5.1.2.1. Controle de qualidade

As cepas padrão *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC MYA 2950, *C. krusei* ATCC 6258, *C. albicans* ATCC 76615 e *C. dubliniensis* CBS 7987 foram utilizadas como controle de qualidade para a comparação dos resultados de hibridização.

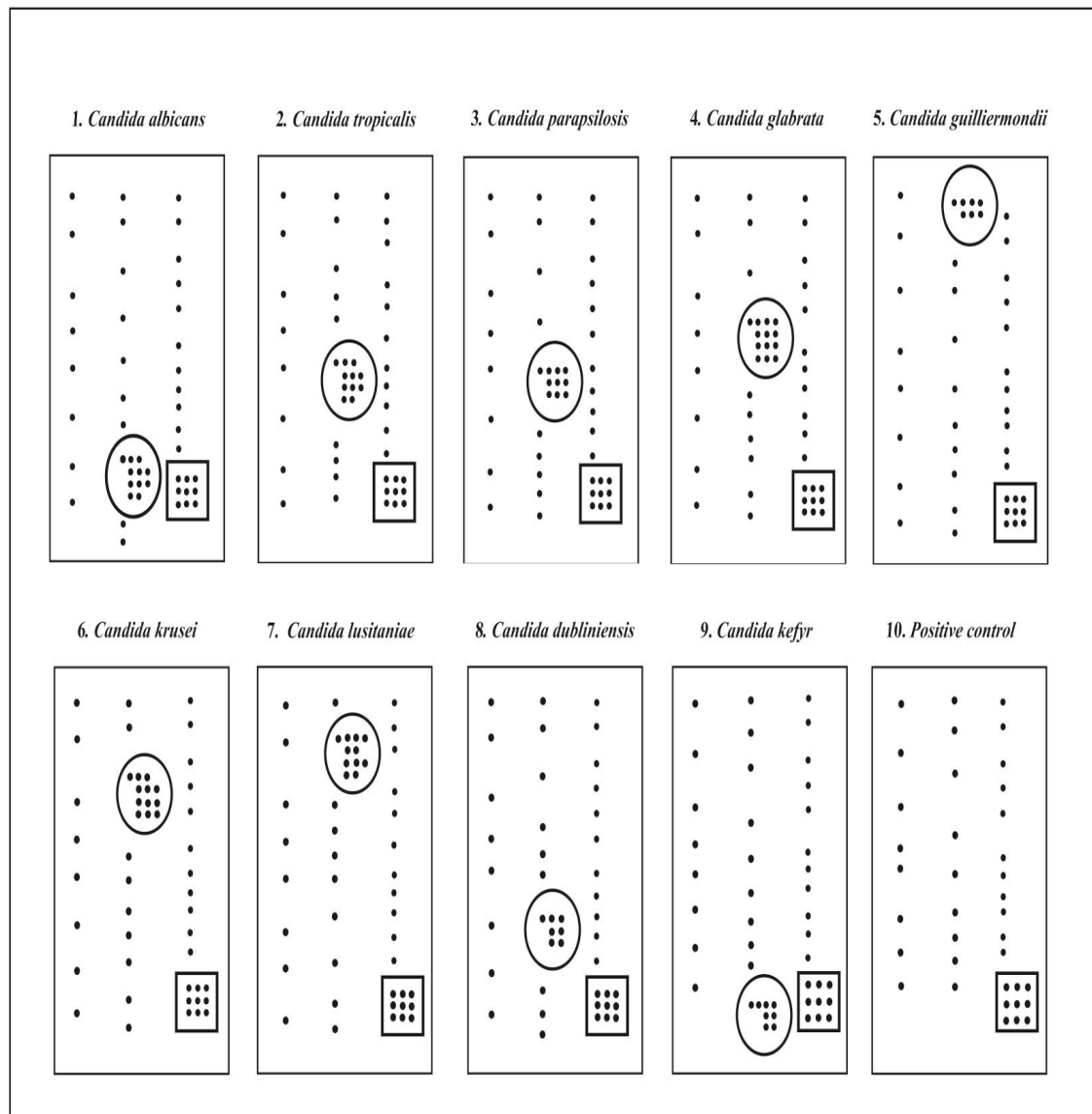


Figura 5. Plataforma de microarranjo de DNA. Resultados representativos de hibridização são observados no círculo de cada plataforma e o controle positivo (sequência comum a todos os fungos) está localizada a extrema direita de cada plataforma de microarranjo.

3.5.1.3. Sequenciamento de DNA

Em paralelo ao microarranjo de DNA foi realizado o sequenciamento para a identificação das espécies. O sequenciamento foi realizado por sequenciador automático a partir dos produtos da PCR purificados, alinhados e analisados através de softwares específicos, descritos a seguir.

De forma sumária, para a PCR foram utilizados os iniciadores universais ITS4 e ITS5 (Sigma-Aldrich) em uma reação de volume final de 25µL. As condições para a amplificação são descritas na tabela 6. Os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com solução de brometo de etídio na concentração de 0,5µg/mL e visualizados em iluminação ultravioleta.

Em seguida, procedeu-se a purificação das amostras pela adição de 2µL da enzima *Exosap-IT* (USB) para cada 5µL de produto de PCR. Após esse processo, foi preparada a reação de sequenciamento, conforme mostrado na tabela 6. A amplificação consistiu na desnaturação a 95°C por 1 min e 25 ciclos de 96°C por 10seg, 55°C por 5seg e 60°C por 4min em termociclador Veriti (Applied Biosystems) (Tabela 7). O produto final da PCR foi utilizado para o sequenciamento em aparelho automático ABI-3100 (Applied Biosystems) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante (Applied Biosystems, USA).

As sequências foram alinhados no programa ATSQ version 6.0.1 (Genetix Corporation) e a homologia com outras sequências foi avaliada com a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Tabela 6. Condições utilizadas na reação de sequenciamento (Applied Biosystems, USA).

Reagentes	Volume (µL)/ reação
<i>Big Dye® Terminator v.3.1</i>	0,5µL
Tampão	0,5µL
Produto da PCR	2.5-10 ng*
<i>Primer</i> (1,6 µM) ITS4/ ITS5	1 µL
Água milli-Q	para 5 µL
Total	5 µL

* massa de PCR foi calculada de acordo com o tamanho do fragmento em pares de bases

Tabela 7. Condições de PCR utilizada no sequenciamento para a amplificação da região ITS1, 5.8S RNA ribossômico e ITS 2 do DNA genômico .

INICIADORES	ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'		
	ITS5 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'		
REAÇÃO	Promega PCR <i>Master Mix 2X</i>	12,5µL	
	<i>Primer</i> ITS1	10µM	
	<i>Primer</i> ITS4	10µM	
	DNA	1µL	
	Promega <i>nuclease free water</i>		
AMPLIFICAÇÃO	1 ciclo	95 ⁰ C	2 min
	30 ciclos	95 ⁰ C	30 seg
		55 ⁰ C	30 seg
		72 ⁰ C	1 min
	1 ciclo	72 ⁰ C	5 min

3.5.1.4. Método de microdiluição em caldo para avaliação de suscetibilidade das espécies de *Candida* spp

Foram utilizadas placas pré-preparadas “dry-plates” (Eiken, Japão) contendo os antifúngicos nas dosagens seriadas (71). Os testes foram realizados seguindo as normas e padronização do documento M27-A3 do CLSI (Clinical and laboratory standards institute) (42,43), procedendo-se inicialmente a validação da microplaca e dos agentes antifúngicos, utilizando as cepas padrão de *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 para cada bateria de testes.

Os agentes antifúngicos avaliados foram respectivamente: micafungina, anfotericina B, 5-fluocitocina, itraconazol, fluconazol, voriconazol, e miconazol e os testes foram realizados em duplicatas.

Foi utilizado o meio RPMI-1640 com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e tamponado com 0,165M de ácido morfilenopropanosulfônico (MOPS). O inóculo foi preparado seguindo as recomendações do CLSI resultando em uma suspensão padrão de levedura contendo 2,5 a $0,5 \times 10^3$ UFC/mL em meio RPMI. Da suspensão 100 µL foram adicionados nos poços 1 ao 11 das fileiras A a G na microplaca. Na coluna 12 de A a G foram colocados 100 µL de RPMI como controle negativo e a coluna 11 de A a G foram utilizadas como controle positivo.

As placas de microdiluição foram seladas com membrana selante e incubadas a 35°C. A leitura foi realizada em 24 e 48 h com o auxílio de um espelho de leitura e da

leitora cinética automática de microplaca (modelo Vmax, Molecular Device) no comprimento de onda de 450nm.

O valor da CIM (concentração inibitória mínima) de anfotericina B foi a menor concentração de antifúngico que inibiu o crescimento visível da levedura. O valor de CIM de 5-FC, micafungina e dos azólicos foi a menor concentração do antifúngico que conseguiu inibir 50% ou mais do crescimento da levedura em relação ao obtido no controle positivo. A categorização dos resultados foi realizada conforme a definição do CLSI M27-A3 e posteriormente foram comparados aos PCC estabelecidos no documento M27-S4 (55) (tabela 8 e 9). Segundo CLSI, no documento M27-A3, não está estabelecido pontos de corte para Anfotericina B, entretanto isolados que apresentam CIM superiores a 1µg/mL são considerados provavelmente resistentes. Neste sentido a norma sugere o uso do meio Antibiotic medium 3 (Difco) para os isolados que apresentarem CIM superiores a 1µg/mL. Seguindo as recomendações do documento M27-A3, os isolados que apresentaram resultados de CIM acima de 1µg/mL frente à anfotericina B foram repetidos utilizando-se o meio *Antibiotic medium 3* (Difco).

Tabela 8. Interpretação da concentração inibitória mínima dos antifúngicos avaliados segundo CLSI, 2008 (51,52).

Antifúngicos	S	SDD	I	R	NS
5- fluocitocina	≤ 4	—	8-16	≥ 32	—
Fluconazol	≤ 8	16-32	—	≥ 64	—
Itraconazol	$\leq 0,125$	0,25- 0,5	—	≥ 1	—
Voriconazol	≤ 1	2	—	≥ 4	—
Micafungina	≤ 2	—	—	—	> 2

S= sensível, SDD= suscetível dose dependente, I= intermediário, R= resistente.

Tabela 9. Interpretação da concentração inibitória mínima dos antifúngicos avaliados segundo CLSI, 2012 (55).

Espécies	Antifúngicos								
	Micafungina			Fluconazol			Voriconazol		
	S	I	R	S	SDD	R	S	I	R
<i>C. albicans</i>	$\leq 0,25$	0,5	≥ 1	≤ 2	4	≥ 8	$\leq 0,12$	0,25–0,5	≥ 1
<i>C. tropicalis</i>	$\leq 0,25$	0,5	≥ 1	≤ 2	4	≥ 8	$\leq 0,125$	0,25–0,5	≥ 1
<i>C. glabrata</i>	$\leq 0,06$	0,12	$\geq 0,25$	—	≤ 32	≥ 64	—	—	—
<i>C. krusei</i>	$\leq 0,25$	0,5	≥ 1	—	—	—	$\leq 0,5$	1	≥ 2
<i>C. parapsilosis</i>	≤ 2	4	≥ 8	≤ 2	4	≥ 8	$\leq 0,125$	0,25–0,5	≥ 1
<i>C. guilliermondii</i>	≤ 2	4	≥ 8	—	—	—	—	—	—

S= sensível, SDD= suscetível dose dependente, I= intermediário, R= resistente.

3.6. ANÁLISE DOS RESULTADOS

3.6.1. Análise de desempenho da plataforma de microarranjo de DNA.

Para a avaliação de sensibilidade, o método de análise em plataforma de sequências de oligonucleotídeos (microarranjo de DNA) foi comparado ao sequenciamento. Foi estruturado um banco de dados no programa Epi info 7® (CDC, Atlanta, GA, USA). Foi determinada a concordância do método de análise em plataforma de sequências de oligonucleotídeos (microarranjo de DNA) com o padrão ouro (sequenciamento).

3.6.2. Avaliação da suscetibilidade aos agentes antifúngicos

A prevalência de resistência aos agentes antifúngicos foi determinada de acordo com os pontos de corte estabelecidos pelo NCLSI, no documento M27-A3 e comparados aos PCC (55) (Tabela 8 e 9).

3.6.3. Análise estatística

A avaliação descritiva das características dos sujeitos estudados foi realizada através do aplicativo Epi-Info 7®. Para variáveis categóricas utilizou-se o teste exato de Fisher.

3.7. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O projeto foi submetido e aprovado sem restrições pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas sob o número 1240/2011 (Anexo 4).

Considerando que os procedimentos laboratoriais pelos quais foram analisados os microrganismos constituem procedimentos de rotina normatizados para o diagnóstico laboratorial das infecções fúngicas na rotina dos pacientes no HC-Unicamp, a técnica de análise em plataforma de sequências de oligonucleotídeos foi realizada a partir dos fungos já isolados e estocados e não implicou em nenhum procedimento diagnóstico ou terapêutico adicional. Não sendo necessária a coleta de espécimes para os exames diagnósticos, e considerando que a pesquisa foi retrospectiva, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas aprovou a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.8. SUPORTE FINANCEIRO

O presente projeto compõe parte do projeto “Novas tecnologias diagnósticas de infecção fúngica em pacientes imunocomprometidos” em cooperação com a Universidade de Chiba (Japão) e *Japan International Cooperation Agency*. O suporte financeiro para os desenvolvimento do projeto foi provido pela *Japan International Cooperation Agency* enquanto que a aluna recebeu bolsa Fapesp (nº processo 10/50958-8).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da população de estudo

Durante o período do estudo, foram registrados 313 episódios de candidemia no HC- Unicamp. Foram identificados 175 (56%) isolados de espécies não-*C. albicans*. Destes foram excluídos oito: quatro devido à contaminação ou não crescimento na cultura e quatro por não estarem de acordo com a faixa etária estabelecida nos critérios de inclusão (figura 6). Os 167 isolados incluídos foram provenientes de 163 episódios de candidemia relacionados a 162 pacientes.

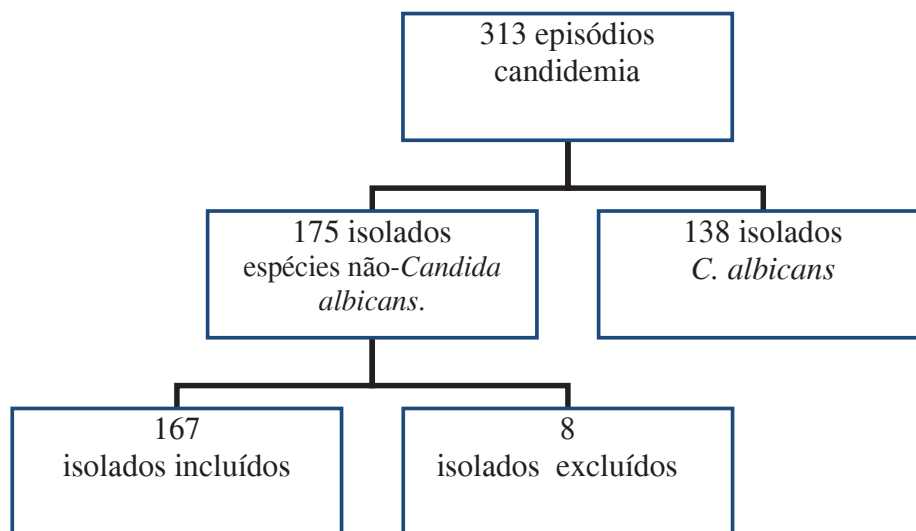


Figura 6. Seleção dos isolados de *Candida* spp incluídos no período de 2006 a 2010.

Dentre os 167 isolados incluídos, a identificação pelo VITEK 2® mostrou maior frequência de *C. tropicalis* (29,5%) seguida de *C. parapsilosis* (23,3%) e *C. glabrata*

(20,3%) (tabela 9). Houve maior frequência de isolados de espécies não-*C. albicans* e *Candida spp* incluídos em 2009 (25,8%) e em 2006 (23,3%) (tabela 10 e 11).

Tabela 10. Distribuição dos 167 isolados de espécies não-*Candida albicans* incluídos segundo a identificação pelo método Vitek 2® (bioMérieux), no período de 2006 a 2010.

<i>Candida spp</i>	N	%
<i>C. tropicalis</i>	66	39,5
<i>C. parapsilosis</i>	39	23,3
<i>C. glabrata</i>	34	20,3
<i>C. krusei</i>	11	6,6
<i>C. guilliermondii</i>	5	3,0
não- <i>C. albicans</i> *	5	5,0
<i>C. kefyr</i>	3	1,8
<i>C. rugosa</i>	1	0,6
<i>C. lipolytica</i>	1	0,6
<i>C. dubliniensis</i>	1	0,6
<i>Candida spp</i> *	1	0,6
Total	167	100

* Não especificada

Tabela 11. Distribuição anual dos 167 isolados de espécies não-*Candida albicans*, no período de 2006 a 2010.

Ano do Episódio	N	%
2006	39	23,3
2007	31	18,6
2008	28	16,7
2009	43	25,8
2010	26	15,6

Dentre os 162 pacientes incluídos, a mediana de idade foi igual a 53 anos (mínimo: 18 – máximo: 88 anos), sendo os pacientes com idade igual ou superior a 60 anos responsáveis por 36,4% dos casos. Pertenciam ao gênero masculino 101 (62,3%) e a relação entre o número de pacientes do gênero masculino e feminino foi igual a 1,6.

Em relação à doença de base, 73 (45,1%) casos foram de origem onco-hematológica, 26 (16,1%) crônico- degenerativa e 24 (14,8%) infecciosa. O primeiro tratamento antifúngico foi realizado com fluconazol em 91 (56,2%) casos, com anfotericina B em 27 (16,7%) e com caspofungina em dois (1,2%) pacientes. Quanto ao desfecho clínico, 95 (58,6%) evoluíram para óbito, 63 (38,9%) para cura e quatro (1,2%) não foram avaliados por dados insuficientes (Tabela 12).

Tabela 12. Caracterização geral dos 162 pacientes incluídos com candidemia por espécies não-*Candida albicans* e *Candida* spp, no período de 2006 a 2010.

Característica	N	%
Mediana de idade	53	
(mínima – máxima)	(18 - 88)	
Doença de base		
Onco- hematológica	73	45,1
Crônico-degenerativa	26	16,1
Infecciosa	24	14,8
Cirúrgica	30	18,5
Outros	7	4,3
Ignorado	2	1,2
Desfecho clínico		
Óbito	95	58,6
Alta	63	38,9
Ignorado	4	2,5

4.2. Identificação de espécies não-*Candida albicans* pelo método de microarranjo de DNA

Dentre os 167 isolados incluídos, a plataforma de microarranjo identificou 163 (97,6%) espécies quando comparada ao sequenciamento (Figura 7). Discriminou em nível de espécie, quatro isolados identificados primariamente pelo Vitek 2[®] como *Candida* spp e outras espécies não- *C. albicans*: uma *C. glabrata*, uma *C. guilliermondii*, uma *C. albicans* e uma *C. kefyr* (tabela 13). A plataforma de microarranjo de DNA não identificou quatro isolados: uma *C. lipolytica*, uma *C. rugosa*, uma *C. haemulonii* e um isolado identificado por sequenciamento como *Dipodascus capitatus*. Além disto, dos 39 isolados do complexo *Candida parapsilosis* o microarranjo de DNA não diferenciou seis (15,4%): cinco *C. orthopsilosis* (12,8%) e uma *C. metapsilosis* (2,5%).

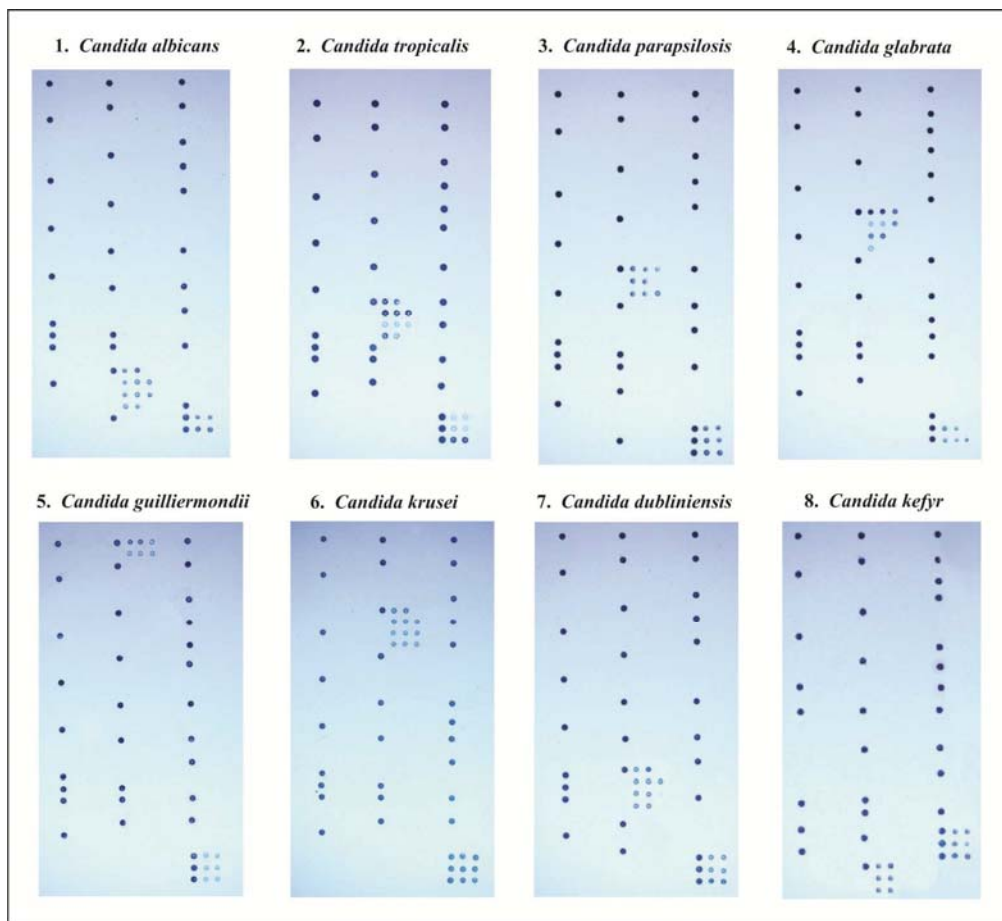


Figura 7. Resultado das lâminas após a realização da técnica de microarranjo de DNA para a identificação das espécies não-*Candida albicans*.

Tabela 13. Distribuição da identificação dos 167 isolados de espécies não-*Candida albicans* pelo microarranjo de DNA comparados ao sequenciamento.

Leveduras	Sequenciamento		Microarranjo de DNA	
	N	%	N	%
<i>C. tropicalis</i>	66	39,5	66	39,5
Complexo <i>C. parapsilosis</i>	39	23,3	39	23,3
<i>C. parapsilosis</i>	33	19,7	39	23,3
<i>C. orthopsilosis</i>	5	3,0	-	-
<i>C. metapsilosis</i>	1	0,6	-	-
<i>C. glabrata</i>	35	20,9	35	20,9
<i>C. krusei</i>	11	6,5	11	6,5
<i>C. guilliermondii</i>	6	3,5	6	3,5
<i>C. kefir</i>	4	2,4	4	2,4
<i>C. dubliniensis</i>	1	0,6	1	0,6
<i>C. lipolytica</i>	1	0,6	-	-
<i>C. rugosa</i>	1	0,6	-	-
<i>C. haemulonii</i>	1	0,6	-	-
<i>C. albicans</i>	1	0,6	1	0,6
<i>Dipodascus capitatus</i>	1	0,6	-	-
Não identificadas	-	-	4	2,4

4.3. Identificação de espécies não-*Candida albicans* pelo método de sequenciamento

O método de sequenciamento identificou os 167 isolados incluídos. Dentre estes, seis isolados não haviam sido identificados pelo sistema automatizado Vitek 2[®] em nível de espécie: uma *Candida* spp e quatro não-*C. albicans*. O sequenciamento identificou estes seis isolados como: *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. haemulonii* e *Dipodascus capitatus*. Os 39 isolados pertencentes ao Complexo *C. parapsilosis*, identificados primariamente pelo Vitek 2[®] como *C. parapsilosis*, foram diferenciados como: cinco *C. orthopsilosis*, um *C. metapsilosis* e 33 *C. parapsilosis* (Tabela 14) (figura 8 e 9).

Tabela 14. Identificação pelo método de sequenciamento do DNA dos 167 isolados de espécies não-*Candida albicans* incluídos.

Leveduras	VITEK 2®		Sequenciamento	
	N	%	N	%
<i>C. tropicalis</i>	66	39,5	66	39,5
Complexo <i>C.parapsilosis</i>	39	23,3	39	23,3
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	33	19,7
<i>C. orthopsilosis</i>	-	-	5	3,0
<i>C. metapsilosis</i>	-	-	1	0,6
<i>C. glabrata</i>	34	20,3	35	20,9
<i>C. krusei</i>	11	6,6	11	6,5
<i>C. guilliermondii</i>	5	2,9	6	3,5
<i>C. kefyr</i>	3	1,8	4	2,4
<i>C. dubliniensis</i>	1	0,6	1	0,6
<i>C. lipolytica</i>	1	0,6	1	0,6
<i>C. rugosa</i>	1	0,6	1	0,6
<i>C. haemulonii</i>	-	-	1	0,6
<i>D. capitatus</i>	-	-	1	0,6
Não identificado	6	3,5	-	-

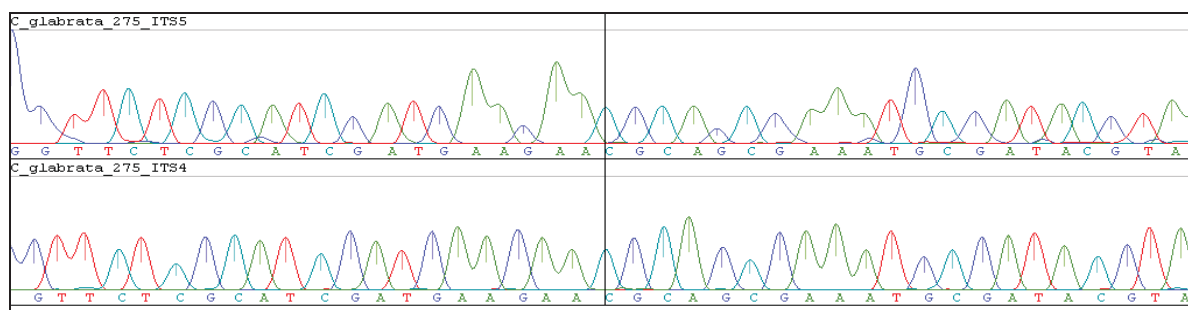


Figura 8. Cromatograma do sequenciamento *C. glabrata* (ITS4 e ITS5)

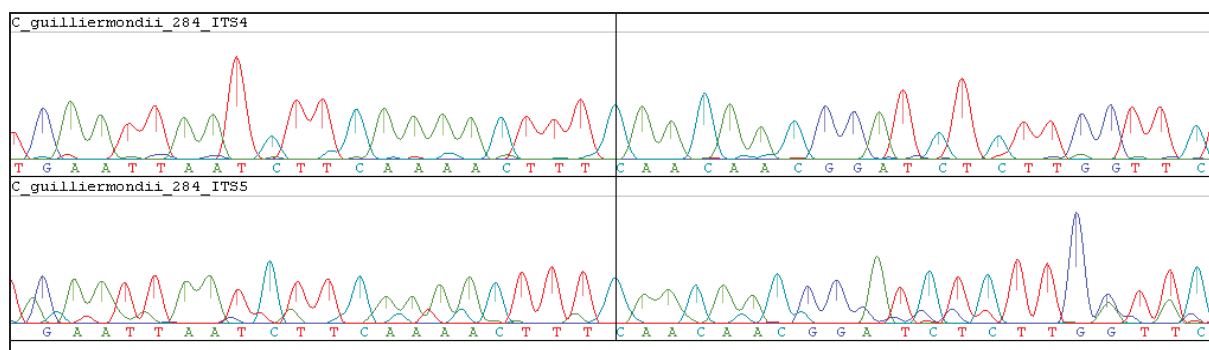


Figura 9. Cromatograma de sequenciamento *C. guilliermondii* (ITS4 e ITS5).

4.4. Comparação entre os diferentes métodos

Dos 167 isolados de espécies não-*Candida albicans*, a plataforma de microarranjo de DNA identificou 163 (97,6%), o Vitek 2[®] 161 (96,4%) e o sequenciamento de DNA identificou todos os isolados. A sensibilidade entre os métodos de microarranjo e sequenciamento de DNA foi de 97,6%. O microarranjo de DNA não diferenciou seis (15,4%) espécies do complexo *C. parapsilosis*: cinco (12,8%) *C. orthopsilosis* e uma (2,6%) *C. metapsilosis*, sendo a sensibilidade individual para o complexo *C. parapsilosis*

de 85% (Tabela 14). Também não identificou quatro isolados identificados por meio do sequenciamento como *C. haemulonii*, *C. rugosa*, *C. lipolytica* e *Dipodascus capitatus*.

Já a sensibilidade entre microarranjo de DNA e Vitek 2[®] foi de 96,4%. O sistema automatizado Vitek 2[®] identificou inadequadamente dois isolados como não *C. albicans* (uma *C. albicans* e um *D. capitatus*). Além disto, não identificou em nível de espécie outros quatro isolados: uma *C. glabrata*, uma *C. kefyr*, uma *C. guilliermondii*, uma *C. haemulonii*. O sequenciamento de DNA concordou em 97% com o sistema automatizado Vitek 2[®] (tabela 15). A descrição dos resultados discordantes entre as diferentes metodologias utilizadas pode ser observada na tabela 16.

Tabela 15. Comparação dos resultados de identificação dos 167 isolados de espécies não-*Candida albicans* através do método de microarranjo de DNA e sequenciamento de DNA.

Leveduras	VITEK 2®		Microarranjo		Sequenciamento		Concordância
	N	%	N	%	N	%	%
<i>C. tropicalis</i>	66	39,5	66	39,5	66	39,5	100
Complexo <i>C. parapsilosis</i>	39	23,3	39	23,3	39	23,3	100
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	39	23,3	33	19,7	85
<i>C. orthopsilosis</i>	-	-	-	-	5	3,0	--
<i>C. metapsilosis</i>	-	-	-	-	1	0,6	--
<i>C. glabrata</i>	34	20,3	35	20,9	35	20,9	100
<i>C. krusei</i>	11	6,6	11	6,5	11	6,5	100
<i>C. guilliermondii</i>	5	2,9	6	3,5	6	3,5	100
<i>C. kefyr</i>	3	1,8	4	2,4	4	2,4	100
<i>C. dubliniensis</i>	1	0,6	1	0,6	1	0,6	100
<i>C. lipolytica</i>	1	0,6	-	-	1	0,6	--
<i>C. rugosa</i>	1	0,6	-	-	1	0,6	--
<i>C. haemulonii</i>	-	-	-	-	1	0,6	--
<i>D. capitatus</i>	-	-	-	-	1	0,6	--
Não identificado	6	3,5	4	2,4	-	-	--

Tabela 16. Descrição dos resultados discordantes nas diferentes metodologias do estudo.

Vitek 2 ®	Microarranjo de DNA	Sequenciamento do DNA
<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>
<i>Candida spp.</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
não- <i>Candida albicans</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. guilliermondii</i>
não- <i>Candida albicans</i>	Não identificado	<i>C. haemulonii</i>
não- <i>Candida albicans</i>	<i>C. kefyr</i>	<i>C. kefyr</i>
não- <i>Candida albicans</i>	Não identificado	<i>D. capitatus</i>
não- <i>Candida albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>

4.5. Distribuição anual dos isolados de acordo com a espécie identificada pelo sequenciamento de DNA.

A distribuição temporal relativa de *C. glabrata* mostrou maior frequência em 2010 se comparado aos anos anteriores (Figura 10). Dos 14 isolados de espécies raras (sete *C. guilliermondii*, um *C. haemulonii*, quatro *C. kefyr*, um *C. lipolytica* e um *C. rugosa*), sete

(50%) (três *C. guilliermondii*, três *C. kefyr* e uma *C. rugosa*) foram isolados em 2009 e três (21,4%) em 2007 e em 2008 respectivamente (Tabela 17).

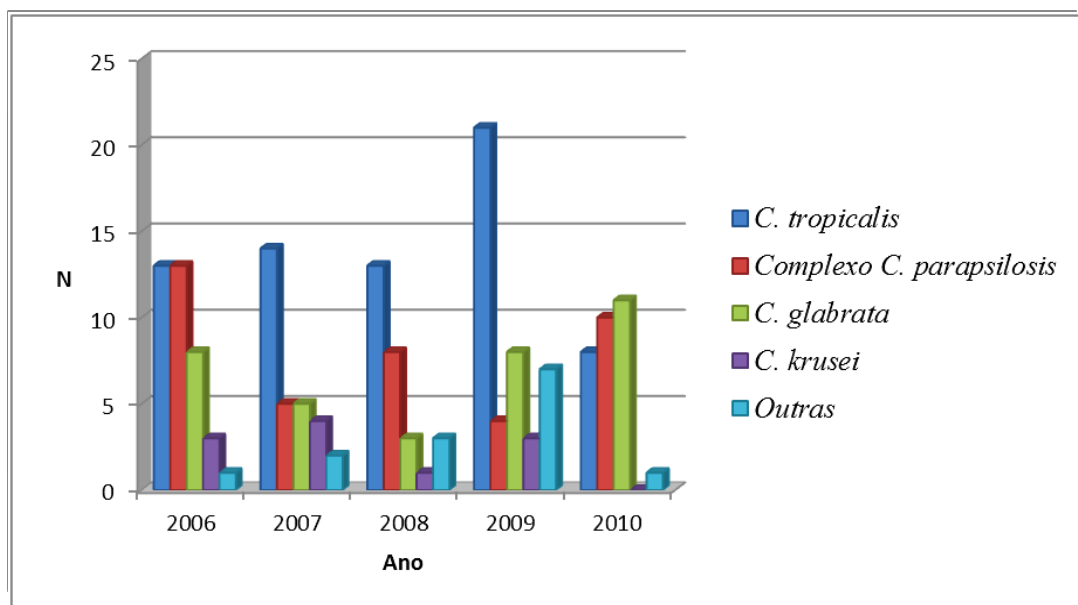


Figura 10. Distribuição temporal por espécie dos 167 isolados de espécies não-*Candida albicans* de acordo com o sequenciamento, no período de 2006 a 2010.

Tabela 17. Distribuição anual por espécie dos 165* isolados de espécies não-*Candida albicans* de acordo com o sequenciamento, no período de 2006 a 2010.

Candida spp	Ano				
	2006	2007	2008	2009	2010
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>C. tropicalis</i>	13 (7,8)	14 (8,4)	13 (7,8)	21 (12,6)	4 (2,5)
Complexo <i>C. parapsilosis</i>	13 (7,8)	5 (3,0)	8 (4,8)	4 (2,4)	9 (5,4)
<i>C. glabrata</i>	8 (4,8)	5 (3,0)	3 (1,8)	8 (4,8)	11 (6,6)
<i>C. krusei</i>	3 (1,8)	4 (2,4)	1 (0,6)	3 (1,8)	0
<i>C. guilliermondii</i>	1 (0,6)	2 (1,2)	0	3 (1,8)	0
<i>C. kefyr</i>	0	0	1 (0,6)	3 (1,8)	0
<i>C. haemulonii</i>	0	1	0	0	0
<i>C. lipolytica</i>	0	0	1 (0,6)	0	0
<i>C. dubliniensis</i>	0	0	1 (0,6)	0	0
<i>C. rugosa</i>	0	0	0	1 (0,6)	0
Total	39 (23,3)	31 (18,6)	28 (16,8)	43 (25,8)	26 (14,9)

* Não foram incluídos dois isolados identificados pelo sequenciamento com *C. albicans* e *D. capitatus*.

4.6. Suscetibilidade dos isolados aos agentes antifúngicos

O isolado identificado pelo Vitek 2[®] como não-*Candida albicans* e identificado pelo sequenciamento como *Dipodascus capitatus* foi excluído da análise de suscetibilidade, portanto o número total desta análise foi de 166 isolados. Dentre os 166 isolados incluídos, o perfil de suscetibilidade, o intervalo de variação das CIM (range) obtidos para cada antifúngico por espécie assim como os valores da CIM, na qual 90% (CIM₉₀) e 50% (CIM

50), de cada espécie teve seu crescimento inibido estão descritos na tabela 18. A avaliação de suscetibilidade de outras espécies (*C. albicans*, *C. rugosa*, *C. lipolytica*, *C. haemulonii*, e *C. dubliniensis*) bem como a CIM dos 166 isolados estão detalhados nos anexos 5 e 6 respectivamente.

Dos 166 isolados avaliados (CLSI, 2008), dois (1,2%) apresentaram resistência a um dos antifúngicos testados: um *C. tropicalis* e um *C. glabrata*. Em relação ao fluconazol foram suscetíveis dose dependente seis isolados: dois (3%) *C. tropicalis* e quatro (11,4%) *C. glabrata*. Um isolado de *C. glabrata* (2,9%) foi resistente ao fluconazol. Os isolados de *C. krusei* não foram incluídos na avaliação devido à resistência intrínseca ao fluconazol. Para o itraconazol, apresentaram susceptibilidade dose dependente e resistência, 29 isolados (17,5%) (29/166) e um (0,6%) (1/166), respectivamente, enquanto que para o voriconazol dois (1,2%) (2/166) foram suscetíveis dose dependente.

Tabela18. Distribuição por espécies dos 166 isolados de espécies não-*Candida albicans* segundo a suscetibilidade aos agentes antifúngicos de acordo com CLSI, 2008 (51,52).

Espécie (n) Antifúngicos	S		SDD		R		CIM ₉₀ µg/ mL	CIM ₅₀ µg/ mL	Intervalo de variação
	n	%	n	%	n	%			
<i>C. tropicalis</i> (66)									
Anfotericina B	66	100	0	0	0	0	0,25	1	0,5-2,0
5-fluocitocina	65	98,5	0	0	1	1,5	0,125	< 0,125	0,125-4,0
Itraconazol	60	90,1	6	9,9	0	0	0,25	0,125	0,06-0,5
Fluconazol	64	97	2	3	0	0	1	0,5	0,25-32
Voriconazol	66	100	0	0	0	0	0,125	0,3	< 0,01-0,03
Micafungina	66	100	0	0	0	0	0,015	0,03	< 0,01- 0,03
<i>Complexo C. parapsilosis</i> (39)									
Anfotericina B	39	100	0	0	0	0	1	1	0,25-2,0
5-fluocitocina	39	100	0	0	0	0	0,25	< 0,125	0,125-0,5
Itraconazol	37	95	2	5	0	0	0,125	0,06	0,03-0,25
Fluconazol	39	100	0	0	0	0	1	0,5	0,25-4,0
Voriconazol	38	97,4	1	2,6	0	0	0,25	0,06	< 0,01-2,0
Micafungina	39	100	0	0	0	0	1	0,25	0,25-1
<i>C. glabrata</i> (35)									
Anfotericina B	35	100	0	0	0	0	1	1	0,25-2,0
5-fluocitocina	35	100	0	0	0	0	< 0,125	< 0,125	0,125-0,5
Itraconazol	27	77,1	7	20	1	2,9	0,5	0,125	0,06-4,0
Fluconazol	30	85,7	4	11,4	1	2,9	16	2	0,5 - > 64
Voriconazol	34	97,1	1	2,9	0	0	0,5	0,06	0,03-2,0
Micafungina	35	100	0	0	0	0	< 0,015	≤ 0,015	< 0,01-0,1
<i>C. krusei</i> (11)									
Anfotericina B	11	100	0	0	0	0	1	1	0,5-1
5-fluocitocina	11	100	0	0	0	0	4	4	1,0-4,0
Itraconazol	1	9,1	10	90,1	0	0	0,5	0,25	0,06-0,5
Voriconazol	11	100	0	0	0	0	0,5	0,06	0,06-0,5
Micafungina	11	100	0	0	0	0	0,06	0,06	0,03-0,06

Continuação

Espécie (n)	S		SDD		R		MIC ₉₀	MIC ₅₀	Intervalo de variação
Antifúngicos	n	%	n	%	n	%	µg/ mL	µg/ mL	
<i>C. guilliermondii</i> (6)									
Anfotericina B	6	100	0	0	0	0	0,5	0,5	0,25-0,5
5-fluocitocina	6	100	0	0	0	0	< 0,125	< 0,125	< 0,125- ≤0,125
Itraconazol	2	33,3	4	66,7	0	0	0,25	0,25	0,06 - 0,5
Fluconazol	6	100	0	0	0	0	2	1	0,5 - 2,0
Voriconazol	6	100	0	0	0	0	0,125	0,06	0,03 - 0,125
Micafungina	6	100	0	0	0	0	0,25	0,125	0,125 - 1,0
<i>C. kefyr</i> (4)									
Anfotericina B	4	100	0	0	0	0	0,5	0,5	0,5-0,5
5-fluocitocina	4	100	0	0	0	0	0,5	< 0,125	< 0,125 - 0,5
Itraconazol	4	100	0	0	0	0	0,125	0,25	0,03 - 0,125
Fluconazol	4	100	0	0	0	0	< 0,125	1	<0,125 -1
Voriconazol	4	100	0	0	0	0	< 0,015	0,06	< 0,01 -0,03
Micafungina	4	100	0	0	0	0	< 0,03	0,125	< 0,03 - 0,03
*Outras (5)									
Anfotericina B	5	100	0	0	0	0	1	0,5	0,25-1
5-fluocitocina	5	100	0	0	0	0	2	1	< 0,125 - 2,0
Itraconazol	4	80	1	20	0	0	0,25	0,125	0,125 - 0,25
Fluconazol	5	100	0	0	0	0	4	1	1,0- 4,0
Voriconazol	5	100	0	0	0	0	0,125	0,03	1,0- 4,0
Micafungina	5	100	0	0	0	0	0,06	0,06	0,03 -0,125

* *C. albicans*, 1 *C. rugosa*, 1 *C. lipolytica*, 1 *C. haemulonii*, 1 *C. dubliniensis*

4.6.1. Comparação dos resultados de suscetibilidade aos antifúngicos entre o CLSI, 2008 e os pontos de corte clínicos (53)

De acordo com os pontos de corte clínicos, foram considerados resistentes ao fluconazol quatro isolados (2,4%) (três *C. tropicalis* e um *C. glabrata*), enquanto que

apenas um (0,6%) isolado de *C. glabrata* foi classificado como resistente de acordo com os parâmetros do CLSI, 2008 (Tabela 19). Houve diferença entre as duas interpretações para os isolados de *C. parapsilosis sensu stricto* frente à voriconazol: um resistente e cinco intermediários segundo os PCC e apenas um suscetível dose dependente segundo os parâmetros da CLSI, 2008. A concordância entre os parâmetros do CLSI, 2008 e os PCC foi de 97,6% para o fluconazol e de 97% para o voriconazol.

Tabela 19. Interpretação dos testes de suscetibilidade realizados pela metodologia de microdiluição em caldo comparando os pontos de corte do documento CLSI, 2008 (51,52) e os pontos de corte clínicos (53).

Espécies	Agente Antifúngico	CLSI						Pontos de corte clínicos					
		S		SDD		R		S		SDD (I)*		R	
N		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>C. tropicalis</i> (66)	Flucitosina	65	98,5	0	0	1	1,5	65	98,5	0	0	1	1,5
	Fluconazol	63	96,9	2	3,1	0	0	63	95,4	0	0	3	4,5
	Voriconazol	66	100	0	0	0	0	66	100	0	0	0	0
	Itraconazol	59	89,4	7	10,6	0	0	59	89,4	7	10,6	0	0
	Micafungina	66	100	0	0	0	0	66	100	0	0	0	0
<i>C. glabrata</i> (35)	Flucitosina	35	100	0	0	0	0	35	100	0	0	0	0
	Fluconazol	30	85,7	4	11,4	1	1,5	32	91,4	0	0	1	2,9
	Voriconazol	34	97,1	1	2,9	0	0	34	97,1	1	2,9	0	0
	Itraconazol	27	77,1	7	20	1	2,8	27	77,1	7	20	1	2,8
	Micafungina	35	100	0	0	0	0	35	100	0	0	0	0
Complexo <i>C. parapsilosis</i> (39)	Flucitosina	39	100	0	0	0	0	39	100	0	0	0	0
	Fluconazol	39	100	0	0	0	0	39	100	0	0	0	0
	Voriconazol	38	97,5	1	2,5	0	0	33	84,6	5	12,8	1	2,6
	Itraconazol	37	90	2	10	0	0	37	90	2	10	0	0
	Micafungina	39	100	0	0	0	0	39	100	0	0	0	0
<i>C. guilliermondii</i> (6)	Flucitosina	6	100	0	0	0	0	6	100	0	0	0	0
	Fluconazol	6	100	0	0	0	0	6	100	0	0	0	0
	Voriconazol	6	100	0	0	0	0	6	100	0	0	0	0
	Itraconazol	2	33,3	4	66,7	0	0	2	33,3	4	66,7	0	0
	Micafungina	6	100	0	0	0	0	6	100	0	0	0	0
Outras * (5)	Flucitosina	5	100	0	0	0	0	5	100	0	0	0	0
	Fluconazol	5	100	0	0	0	0	5	100	0	0	0	0
	Voriconazol	5	100	0	0	0	0	5	100	0	0	0	0
	Itraconazol	4	80	2	20	0	0	4	80	2	20	0	0
	Micafungina	5	100	0	0	0	0	5	100	0	0	0	0

S = sensível; SDD= sensível-dose-dependente; I= intermediário, R= resistente. * Outras: 1 *C. rugosa*, 1 *C. lipolytica*, 1 *C. haemulonii*, 1 *C. dubliniensis*, 1 *C. albicans*

5. DISCUSSÃO

5.1. Distribuição temporal das espécies de *Candida* spp em episódios de candidemia no HC-Unicamp

No presente estudo, as espécies não-*C. albicans* foram responsáveis por 56% dos isolados de hemoculturas, com predomínio de *C. tropicalis* (39,5%), do Complexo *parapsilosis* (23,3%) e de *C. glabrata* (20,9%). Resultados semelhantes têm sido relatados em séries nacionais e internacionais onde as espécies não-*C. albicans* têm sido apontadas como o agente etiológico de mais de 60% dos casos de candidemia (9, 10, 76). Em estudo realizado no HC-Unicamp, Moretti e colaboradores (8) evidenciaram uma tendência temporal de elevação dos episódios de candidemia por *C. glabrata*.

O isolamento de 8,5% de espécies menos comuns corrobora os achados de outros autores (11). Nucci e colaboradores (77), em estudo epidemiológico prospectivo realizado em 2010, em 21 hospitais terciários da América Latina, reportou que o Brasil foi o segundo país que mais isolou espécies menos comuns, incluindo *C. guilliermondii*. Esta espécie, mais comumente isolada do sangue, tem sido considerada emergente na América latina (11). Em contraste, menor frequência de isolamento de espécies raras (2,9%) foi observada em estudo conduzido no ano de 2010 num complexo hospitalar de São Paulo (78).

5.2. Desempenho da nova plataforma de microarranjo de DNA para a identificação visual de espécies não-*Candida albicans*

A nova plataforma de microarranjo mostrou elevada concordância (97,6%) com o sequenciamento de DNA (padrão ouro) para a identificação de espécies não-*C. albicans*. Todos os isolados foram corretamente identificados, exceto as espécies ausentes na composição da plataforma (*C. rugosa*, *C. lypolitica*, *C. haemulonii* e *Dipodascus capitatus*). Em concordância com os resultados obtidos nesta série, o método de microarranjo de DNA tem demonstrado grande utilidade na identificação de fungos de relevância clínica, tanto leveduras como filamentosos (Tabela 20). A aplicabilidade do microarranjo de DNA tem sido evidenciada com excelentes parâmetros de desempenho para espécies obtidas exclusivamente de hemoculturas (Tabela 21), similarmente ao apresentado no presente estudo. Foram identificados até o momento, dez estudos internacionais abordando a presente metodologia na identificação de espécies fúngicas (Tabelas 28 e 29). Nestes estudos a composição do microarranjo variou de 12 a 44 espécies fúngicas e de quatro a 44 espécies não-*C. albicans*. O estudo de Leaw e colaboradores 2007 (79) pode ser considerado o maior, por ter incluindo 44 espécies de *Candida* spp e 452 isolados de diferentes espécimes clínicos. Os autores demonstraram sensibilidade e especificidade de 100% e 97%, respectivamente. Ao contrário dos demais, o estudo de Sato e colaboradores 2010 (80), ao avaliar amostras de pele e anexos, obteve sensibilidade inferior aos demais (92%). Esta sensibilidade pode ser justificada pela utilização neste

estudo, de espécimes provenientes de pele e anexos para os quais a técnica padrão por meio de cultura resultou numa taxa de sucesso quanto à detecção e isolamento de 34%.

Considerando os quatro estudos de isolados obtidos de hemoculturas a composição das diversas plataformas variou de duas a 76 espécies. No que diz respeito à composição geral, o presente microarranjo incluiu 32 espécies fúngicas, sendo nove espécies não-*Candida albicans*. Além disto, incluiu um número de 167 isolados clínicos, superior ao relatado em estudos para avaliação de isolados oriundos de sangue, bem como para estudos que incluíram variados espécimes, exceto no estudo de Lew *et al*.

Em contrapartida, merece destaque a limitação da não avaliação da especificidade, parâmetro que foi determinado nos estudos de Hsiue *et al* e Farina *et al* e (44,81), nos anos de 2010 e 2012 respectivamente. O desenho ideal que possibilitaria a definição da especificidade deveria incluir de forma cega, espécies não contidas na plataforma.

Outra limitação desta plataforma é a ausência de sondas de espécies do Complexo *C. parapsilosis*, não permitindo a diferenciação entre as espécies do Complexo. A elevação da prevalência de infecções causadas por *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* bem como diferenças no perfil de suscetibilidade entre as espécies do Complexo *C. parapsilosis* têm sido evidenciada. Canton e colaboradores (82) em estudo prospectivo multicêntrico incluindo 44 hospitais da Espanha relataram inferior suscetibilidade de *C. parapsilosis sensu stricto* à anfotericina B, equinocandinas e fluconazol se comparada *C. orthopsilosis* e

C. metapsilosis. Outro estudo realizado no Brasil, envolvendo 152 isolados de sangue oriundos de 17 centros de dois diferentes estados, demonstrou inferior suscetibilidade de *C. parapsilosis sensu stricto* à caspofungina, anfotericina B, fluconazol e voriconazol em relação a *C. orthopsilosis* (83). Estes resultados ressaltam a importância da diferenciação entre as espécies do Complexo *C. parapsilosis*.

Tabela 20. Estudos de identificação fúngica a partir de diferentes espécimes clínicos por meio do microarranjo de DNA.

Referência	Composição do Microarranjo de DNA (espécies fúngicas)	Isolados incluídos	Espécimes incluídos	Espécies não- <i>Candida albicans</i>	Desempenho	
					S (%)	E (%)
Leinberger <i>et al.</i> , 2005 (40)	12	21	Cepas de referência, isolados clínicos*.	7	NR	NR
Huang <i>et al.</i> , 2006 (84)	20	122	Sangue, FCE, pele, secreção.	4	100	NR
Leaw <i>et al.</i> , 2007 (79)	77	452	Cepas de referência, isolados clínicos*.	44	100	97
Spiess <i>et al.</i> , 2007 (85)	14	91	Sangue, tecido, BAL.	4	NR	NR
Campa <i>et al.</i> , 2008 (86)	24	20	Sangue, urina, outros.	12	NR	NR
Sato <i>et al.</i> , 2010 (80)	26	40	Pele	10	92	NR

S: sensibilidade; E: especificidade; BAL: lavado bronco alveolar; FCE: fluido cérebro espinhal; NR: não reportado; *Sítio de isolamento não especificado.

21. Estudos de identificação fúngica a partir de hemoculturas por meio do microarranjo de DNA.

Estudo	Composição do Microarranjo de DNA (espécies fúngicas)	Isolados incluídos	Espécies não- <i>Candida albicans</i>	Desempenho	
				S (%)	E (%)
Ferrari <i>et al.</i>, 2013 (87)		35	167	9	97,6 NR
Yoo <i>et al.</i> , 2010 (88)		7	112	4	93 93
Farina <i>et al.</i> , 2012 (43)		17	88	13	100 99,8
Hsiue <i>et al.</i> , 2010 (81)		76	116	40	100 100
Mayr HW <i>et al.</i> , 2007 (89)		2	241	2	96,7 NR

NR: não reportado

Comparando-se o método de microarranjo de DNA aos métodos fenotípicos tradicionais não automatizados, o primeiro permite organizar em uma plataforma um expressivo número de oligonucleotídeos possibilitando a identificação rápida e simultânea de diversos microorganismos, além de infecções mistas. Após a positividade da hemocultura, a identificação fúngica pode ser abreviada para cinco horas, enquanto que pelas técnicas convencionais varia de um a três dias (43). Outra vantagem é que esta técnica não é observador dependente como na maioria dos métodos convencionais de identificação, e o sistema não requer equipamentos de alto custo.

Os estudos prévios baseados em microarranjos de DNA têm utilizado para a detecção, sistemas automatizados de leitura (Tabela 20 e 21), que em geral apresentam elevado custo. Em contraste, a detecção colorimétrica visível a olho nú desta plataforma que é realizada através da adição de enzima que produz um substrato que resulta em um precipitado insolúvel, permite a expressão de pontos de coloração que não necessitam equipamentos ópticos de visualização (43). Estes parâmetros facilitam a sua aplicabilidade em laboratórios de menor complexidade.

Em comparação aos métodos fenotípicos automatizados, considerando os resultados do sistema Vitek 2 (BioMeriux), largamente utilizado em laboratórios de rotina houve elevada concordância (96,4%). Um grande desafio para os diversos sistemas tem sido a falha na identificação de espécies menos comuns bem como a discriminação entre espécies relacionadas. Borman e colaboradores (90), em estudo de vigilância relataram incorreta identificação em 18% dos isolados, tanto para espécies comuns quanto raras. Este estudo incluiu 1781 amostras de leveduras, oriundas de diversos espécimes clínicos, de 154 hospitais e laboratórios de microbiologia do Reino Unido, identificadas pelos sistemas Vitek/Vitek 2[®] (bioMérieux), Auxacolor 2[®] (Sanofi Diagnostics Pasteur) e APIAUX20C[®] (BioMérieux).

Comparando-se a outros métodos genotípicos como a PCR em tempo real, os parâmetros de desempenho têm sido similares ao microarranjo de DNA para a identificação fúngica diretamente da amostra de sangue total (39). Entretanto, a análise da plataforma

pelas manipulações adicionais aumenta o risco de contaminação e o tempo para a obtenção do resultado (91).

Outro método promissor é o MALDI-TOF MS para a identificação de isolados clínicos incluindo leveduras. Um estudo laboratorial envolvendo 261 isolados de leveduras recuperados de diversos espécimes clínicos mostrou correta identificação em 96,3% dos isolados em nível de espécies (45). O elevado desempenho também tem sido observado especificamente para isolados clínicos de diferentes espécimes de *Candida* spp, incluindo a identificação diretamente da hemocultura (sensibilidade de 91,3% a 100%) (46). No entanto, a análise pelo MALDI-TOF MS para leveduras isoladas diretamente da cultura de sangue ainda apresenta desafios adicionais em relação à análise de subcultura em meio sólido (92). Além disto, assim como no microarranjo de DNA a identificação acurada e a discriminação de espécies relacionadas estão limitadas à amplitude da biblioteca de referência (46, 47, 48).

A utilidade do método de microarranjo de DNA para a identificação de espécies não-*C. albicans* em situações de rotina, tanto em laboratórios de referência com um alto volume de espécimes quanto no ponto final da assistência (*point of care*) requer avaliação específica e comparativa de custo-efetividade entre os diferentes métodos.

5.3. Perfil de suscetibilidade aos antifúngicos dos isolados de espécies não-*Candida albicans*

Neste estudo foi observada elevada suscetibilidade aos antifúngicos. A interpretação por meio dos PCC definidos no documento M27-S4 (53) detectou 3,6% de isolados resistentes a qualquer antifúngico, enquanto que pelo CLSI, 2008 a resistência foi de 1,8%. Houve diferença na interpretação para quatro isolados: três (duas *C. tropicalis* e uma *C. glabrata*) resistentes ao fluconazol e um de *C. parapsilosis* resistente ao voriconazol.

De forma sumária, pela interpretação do CLSI, 2008 a resistência foi restrita a dois isolados de *C. glabrata* (um resistente ao fluconazol e um resistente ao itraconazol) e um isolado de *C. tropicalis* a 5FC. A elevada atividade *in vitro* ao fluconazol tem sido evidenciada em estudos nacionais, com uma variação de sensibilidade de 95% a 100% (tabela 22). Frequência superior de resistência a qualquer antifúngico tem sido evidenciada em estudos de candidemia realizados na última década, em hospitais terciários brasileiros, com variabilidade de 2,9 a 14% (Tabela 22). O padrão de interpretação utilizado pela maioria dos Centros têm sido o do CLSI. Os estudos não são de fato comparáveis, visto que diversas diferenças são observadas no desenho, na população e no local desenvolvido. Motta e colaboradores (78), em estudo conduzido em um complexo hospitalar terciário de São Paulo, relataram resistência de 14% a qualquer antifúngico incluindo *C. albicans*.

Neste estudo, a resistência para as espécies de não-*C. albicans* foi de 13% (73). Entretanto, vale destacar que no estudo de Motta e colaboradores ocorreu elevada resistência ao itraconazol, ocasionado pela possibilidade de interpretação inadequada dos resultados devido à presença do fenômeno *trailing* ou arraste. Em dois estudos multicêntricos conduzidos em hospitais terciários brasileiros em 2006 e 2007, a resistência para as espécies não-*C. albicans* foi de 3,5% e 2,9% respectivamente (3, 9).

Em contrapartida, em outros estudos unicêntricos brasileiros de candidemia de base hospitalar (Tabela 31), a resistência ao fluconazol foi superior (1,5% a 3%) (3, 9, 78, 93, 94). Uma tendência de elevação da resistência ao fluconazol tem sido relatada em outros países. Nucci e colaboradores (77), em estudo prospectivo realizado em 21 hospitais terciários de sete países da América latina, mostraram a prevalência de resistência de 5% das espécies de não-*C. albicans* ao fluconazol. Outro estudo conduzido em dois hospitais da Itália evidenciou a resistência *in vitro* ao fluconazol de 18% para as espécies não-*C. albicans* (97). O programa de vigilância global aos antifúngicos SENTRY evidenciou elevada incidência de resistência de espécies não-*C. albicans* aos azólicos em países asiáticos, de 5,4% a 13,5%, seguido da América do Norte e Europa, de 1,1% a 9,8% respectivamente (76) (Tabela 23). Neste mesmo estudo, em concordância com resultados relatados previamente, a América Latina apresentou frequência inferior de resistência ao voriconazol bem como ausência de resistência a equinocandinas.

22. Estudos nacionais de candidemia de base hospitalar de suscetibilidade aos antifúngicos.

Estudo	Local	N	Fluconazol R %	Itraconazol R %	Voriconazol R %	Qualquer antifúngico R %
*Aquino VR <i>et al</i> , 2005 (86) (Unicêntrico)	Porto Alegre	131	3	-	-	-
Colombo <i>et al</i> , 2006 (3) (Multicêntrico)	Sul, sudeste, região central.	712	0,8	5	0,1	3,5
Passos XS <i>et al</i> , 2007 (93) (Unicêntrico)	Goiania	33	3	6	0	12
Colombo <i>et al</i> , 2007 (9) (Multicêntrico)	São Paulo	282	1,5	0,7	-	2,9
Motta L <i>et al</i> , 2010 (78) (Unicêntrico)	São Paulo	100	2	9	1	14

R: resistência * Resistência avaliada somente para fluconazol

Tabela 23. Estudos internacionais de candidemia para avaliação de suscetibilidade

Estudo	Local	N	Fluconazol R %	Voriconazol R %	Equinocandina R%
Bassetti M <i>et al</i> , 2007 (95) (base hospitalar)	Itália	136	9	4	1,5
Xess I <i>et al</i> , 2007 (96) (base hospitalar)	Índia	7297	11,7	NR	NR
Cisterna R <i>et al</i> , 2010 (97) (base hospitalar)	Espanha	208	6,3	1,6	2,5
Cleveland A <i>et al</i> , 2012 (98) (base populacional)	Atlanta	2329	7	----	1
Nucci M <i>et al</i> , 2013 (77) (base hospitalar)	América Latina	653	3,2	0	0
Pfaller <i>et al</i> , 2013(76) (base hospitalar)	Ásia	356	5,4- 13,5	0,6- 13,5	0,6- 3,8
	AN [#]	1131	2,7- 9,8	0,6 -11,1	1,2- 1,6
	Europa	1039	0,2- 6,3	0,2- 9,1	0,4- 1,7

* NR: não realizado; #AN: América do Norte, R: resistência

Na avaliação espécie específica os resultados de R para os isolados de *C. krusei*, são consonantes com o perfil de resistência intrínseca classicamente descrita para esta espécie. Em estudo multicêntrico realizado em 11 hospitais terciários do Brasil (3), a

SDD foi observada em 62% dos isolados e resistência em 38%. As recomendações terapêuticas para *C. krusei* incluem o uso de outros fármacos e não tem sido recomendado a realização de testes de suscetibilidade na rotina dos laboratórios clínicos, sendo o conceito de sensibilidade dose dependente aplicado, sobretudo para espécies onde a resistência é adquirida, como *C. glabrata* (99).

A *C. glabrata* tem apresentado elevada frequência de resistência ao fluconazol. No presente estudo a taxa de resistência foi inferior ao relatado por outros autores (Tabela 24). Recente estudo conduzido em hospitais terciários públicos e privados do Brasil mostrou resistência de 5% entre os isolados de *C. glabrata* de pacientes internados nos hospitais públicos (100). Similares porcentagens de resistência têm sido reportadas nos países da América Latina (76).

Assim como a resistência global ao fluconazol, o cenário internacional evidencia a inferior suscetibilidade de *Candida glabrata* ao fluconazol se comparada ao cenário nacional. Na Índia, estudo de base hospitalar mostrou resistência de 12% enquanto que estudos de base populacional têm indicado uma variação de 3,6% a 9,8% nos países da Austrália, Europa e América do Norte (76, 96, 77) (Tabela 24).

No que se refere à anfotericina B, não foram observados isolados resistentes utilizando-se o *antibiotic medium 3* em concordância a prévios estudos (9,77,78). Park e colaboradores (58), em estudo incluindo 107 isolados de *Candida* spp provenientes de sangue, avaliaram a sensibilidade do método de microdiluição utilizando RPMI e *antibiotic*

medium 3 e Etest frente a anfotericina B e correlacionaram os resultados obtidos por meio destas metodologias ao desfecho clínico. O intervalo das CIM obtidas por meio do método de microdiluição utilizando-se *antibiotic medium 3* e Etest[®] foram mais abrangentes, reforçando a superior sensibilidade do *antibiotic medium 3* e Etest[®] para a detecção de resistência a este antifúngico (58). Adicionalmente, a resistência *in vitro* determinada pelas três metodologias não apresentou correlação estatisticamente significativa à falência do tratamento.

Embora a relação das CIM ao desfecho clínico ainda não tenha sido estabelecida (54), outros estudos tem indicado o uso do Etest[®] como método mais sensível para discriminação entre isolados de *Candida* sensíveis e resistentes á anfotericina B e sugerem que as CIMs obtidas por meio deste ensaio são mais preditivas do resultado do tratamento (70).

Tabela 24. Resistência de isolados de *Candida glabrata* em estudos nacionais e internacionais.

Estudo	Local	N	Fluconazol R %
Colombo <i>et al</i> , 2006 (3) (base hospitalar)	Brasil	712	2
Xess I <i>et al</i> , 2007 (89) (base hospitalar)	Índia	7297	12
Colombo <i>et al</i> , 2007 (9) (base hospitalar)	Brasil	300	5
Slavin MA <i>et al</i> , 2010 (94) (base populacional)	Austrália	1095	3,6
Nunes EB <i>et al</i> , 2011(95) (base hospitalar)	Brasil (região norte)	81	3,7
Colombo <i>et al</i> , 2012 (93) (base hospitalar)	Brasil	300	5
Pfaller <i>et al</i> , 2013(88) (base laboratorial)	América Latina	38	5,3
	América do Norte	306	9,8
	Europa	175	6,3

No presente estudo algumas espécies raras, relacionadas à resistência na literatura, apresentaram 100% de suscetibilidade a todos os antifúngicos avaliados, exceto

C. guilliermondii ao itraconazol (66,7% de SDD). Godoy e colaboradores (101), em estudo prospectivo multicêntrico envolvendo cinco hospitais terciários da América Latina, relataram 100% de suscetibilidade dose dependência ao itraconazol entre os isolados de *C. guilliermondii*, entretanto dados relativos à resistência a este antifúngico ainda são escassos (102).

Quanto à anfotericina, em contraste aos resultados apresentados no presente estudo, inferior suscetibilidade intrínseca de *C. guilliermondii* a este poliênico e também a equinocandinas tem sido relatada (102). Além disto, a ausência de resistência de *C. haemulonii* a Anfotecina B e equinocandinas não têm sido observadas. Relato de caso realizado em um hospital terciário de São Paulo evidenciou a inferior suscetibilidade de *C. haemulonii* a anfotericina B e a itraconazol (103).

Embora os isolados de espécies raras não tenham apresentado resistência, infecções ocasionadas por estas espécies devem ser especialmente monitoradas através da realização dos testes de suscetibilidade na rotina, garantindo a abordagem terapêutica adequada. A multirresistência e inferior suscetibilidade em espécies raras como *C. guilliermondii*, *C. haemulonii* e *C. rugosa* tem sido motivo de preocupação, sobretudo nos pacientes imunocomprometidos.

5.4. Considerações finais

O presente estudo contribuiu na validação de uma nova plataforma de microarranjo de DNA para a identificação espécie específica rápida e visual de isolados de espécies não-*C. albicans* com demonstração da sua utilidade como uma ferramenta útil para o diagnóstico de pacientes de alto risco. Outras contribuições do estudo são relativas ao conhecimento da epidemiologia da resistência aos azólicos em um hospital terciário com demonstração da aplicabilidade dos PCC do documento M27-S4 (53) para a detecção de resistência entre os isolados de espécies não-*C. albicans*.

As perspectivas para a continuidade de pesquisas relacionadas consistem na identificação direta a partir do espécime clínico por meio da otimização da extração do DNA diretamente da amostra. Além disto, há a necessidade de avaliação de custo-efetividade de forma comparativa aos outros métodos, no sentido de avaliar a aplicabilidade na linha final da assistência. Outra perspectiva trata-se da adição de novas sondas, incluindo espécies raras, bem com a construção de plataformas multipatógenos para a investigação sindrômica além da possibilidade de inclusão de sondas associadas à resistência antifúngica.

6. CONCLUSÃO

- A nova plataforma de microarranjo de DNA apresentou ótimo desempenho para a identificação visual de espécies não *C. albicans* isoladas de pacientes com candidemia, com sensibilidade de 97,6% em relação ao sequenciamento da região ITS1, 5.8S RNA ribossômico e ITS2, do DNA genômico.
- A nova plataforma de microarranjo de DNA foi capaz de identificar corretamente e em tempo reduzido, espécies raras e menos suscetíveis que não foram identificadas em nível de espécie pelo Vitek 2[®]. A agilidade diagnóstica associada à correta identificação em nível de espécies apresenta grande impacto tanto na abordagem terapêutica quanto para o desfecho clínico, sobretudo para pacientes de alto risco.
- Os isolados de espécies não-*C. albicans* de episódios de candidemia demonstraram elevada sensibilidade aos agentes antifúngicos avaliados.
- Para o fluconazol, dentre os 155 isolados, excluídos 11 de *C. krusei*, seis (3,8%) foram SDD: quatro (11,4%) *C. glabrata* e dois (0,6%) *C. tropicalis*. Um isolado (2,8%) de *C. glabrata* foi R segundo os parâmetros do CLSI, 2008. Pelos pontos de corte clínicos, quatro foram considerados resistentes: um (2,8%) *C. glabrata* e três (1,5%) *C. tropicalis*.
- Para o voriconazol, considerando todos os 166 isolados avaliados, foram SDD pelo CLSI, 2008: um (2,9%) *C. glabrata* e um (2,5%) *C. parapsilosis sensu stricto* e segundo os pontos de corte clínicos um (2,9%) *C. glabrata* e cinco (12,8%) *C. parapsilosis sensu stricto*. Um isolado (2,5%) de *C. parapsilosis sensu stricto* foi R de acordo com os PCC.

- Para itraconazol não houve diferença na categorização entre as duas interpretações. Foram SDD: sete (10,6%) *C. tropicalis*, sete (20%) *C. glabrata*, dois (10%) do Complexo *C. parapsilosis* e quatro (66,7%) *C. guilliermondii*. Resistência foi observada em um (2,8%) isolado de *C. glabrata*.
- Os 166 isolados foram 100% suscetíveis a anfotericina B e a micafungina.
- Embora os isolados de espécies raras não tenham apresentado resistência na população do presente estudo, infecções ocasionadas por estas espécies devem ser especialmente monitoradas através da realização dos testes de suscetibilidade. A multirresistência e suscetibilidade reduzida em espécies raras como *C. guilliermondii*, *C. haemulonii* e *C. rugosa* tem sido motivo de preocupação, sobretudo nos pacientes imunocomprometidos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Perlroth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology* [on line]. 2007 Jun [acesso em 3de ag de 2012];45(4). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17510856>
2. Preuner S, Lion T. Towards molecular diagnostics of invasive fungal infections. *Expert review of molecular diagnostics* [on line]. 2009. [Acesso em 10/08/2013] ;9 (5):397–401Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19580423>.
3. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, *et al.* Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical center. *J Clin. Microbiol.* [on line] 2006 [Acesso em 10 de ag de 2012]; 44(8):2816.Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1594610&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
4. Marchetti O, Bile J, Fluckiger U, Eggimann P, Ruef C, Garbino J, *et al.* Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. *The Fungal InfectionNetwork of Switzerland (FUNGINOS). Clin Infect Dis.* 2004; 38:311-320.
5. Diekema DJ, Messer SA, Brueggemann AB, Coffman SL, Doern GV, Herwaldt LA, *et al.* Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:1298-1302.

6. Richet H, Roux P, Des Champs C, Esnault Y, Andremont A. Candidemia in French hospitals: incidence rates and characteristics. The French Candidemia Study Group. Clin Microbiol Infect. 2002; 8: 405-12.
7. Viudes A, Perman J, Canton E, Ubeda P, Lopez-Ribot JL, Gobernado M. Candidemia at a tertiary-care hospital: epidemiology, treatment, clinical outcome and risk factors for death. Eur J Clin Microbiol Infect Dis; 2002; 21:767-774.
8. Moretti ML, Trabasso P, Lyra L, Fagnani R, Resende MR, Cardoso LGO, Schreiber AZ. Is the incidence of candidemia caused by *Candida glabrata* increasing in Brazil? Five-year surveillance of *Candida* bloodstream infection in a university reference hospital in southeast Brazil. Med. Mycol. 2012.early online, doi: 10.3109/13693786.2012.708107.
9. Colombo AL, Guimarães T, Silva LRBF, de Almeida Monfardini LP, Cunha AKB, Rady P, *et al.* Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America. [on line] 2007 [acesso em 27 de ag de 2013]; 28(5):570–6. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17464917>
10. Montagna MT, Caggiano G, Lovero G, De Giglio O, Coretti C, Cuna T, *et al.* Epidemiology of invasive fungal infections in the intensive care unit: results of a multicenter Italian survey (AURORA Project). Infection. [on line] 2013 [acesso em 21 de março de 2013]; Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23463186>

11. Pfaller M a, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical microbiology reviews* . 2007. [acesso em 13 de julho de 2012]; 20(1):133–63. Disponível em:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1797637&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
12. Alangaden GJ. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. *Infectious disease clinics of North America* Elsevier Ltd.[on line] 2011 Mar [acesso em 1 Nov de 2013];25(1):201–25. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21316001>
13. Balajee SA, Sigler L, Brandt ME. DNA and the classical way: identification of medically important molds in the 21st century. *Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology* . 2007 [acesso em 25 de setembro de 2013];45(6):475–90. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17710617>
14. Meletiadis J, Arabatzis M, Bompola M, Tsiveriotis K, Hini S, Petinaki E, *et al*. Comparative evaluation of three commercial identification systems using common and rare bloodstream yeast isolates. *J Clin Microbiol*. 2011 [acesso em 19 de setembro de 2012];49(7):2722–7. Disponível em:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3147866&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

15. Borst A, Maurine A, Leverstein V, Jan V, Fluit C. Detection of *Candida* spp. in blood culture using nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001; 39:155–60.
16. Wahyuningsih R, Freisleben HJ, Sonntag HG, Schnitzler P. Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 3016–21.
17. Flahaut M, Sanglard D, Monod M, Bille J, Rossier M. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical samples by DNA amplification of common regions from *C. albicans* secreted aspartic proteinase genes. *J Clin Microbiol*. 1998; 36:395–401
18. Larone DH. *Medically important fungi: a guide for identification*. 4. ed. Washington: ASM Press, 2002.
19. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vacari EM, MELO NT. *Tratado de Micologia Médica* Lacaz. 9 ed., São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p.
20. Campbell CK, Johson EM, Philpot CM, Warnock DW. *Identification of pathogenic Fungi*. London: Public Health laboratories services, 1996.
21. Balajee SA, Gribskov JL, Hanley E, Nickle D, Marr KA (2005a). *Aspergillus lentulus* sp nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryotic Cell* 4: 625-632.
22. Fricker-Hidalgo H, Vandapel O, Duchesne MA, Mazoyer MA, Monget D, Lardy B, *et al* . Comparison of the new API Candida System to the ID 32 C system for identification of clinically important yeast species. *J ClinMicrobiol*. 1996; 34: 1846-48.

23. Buchaille L, Freydiere AM, Guinet R, Gille Y. Evaluation of six commercial systems for identification of medically important yeasts. *Eur J Microbiol Infect Dis*. 1998; 17: 479-88.
24. Paugam A, Benchetrit M, Fiacre A, Tourte-Schaefer C, Dupouy-Camet J. Comparison of four commercialized biochemical systems for clinical yeast identification by colour-producing reactions. *Med Mycol*. 1999; 37: 11-17.
25. Gundes SG, Gulenc S, Bingol R. Comparative performance of Fungichrom I, Candifast and API 20C Aux systems in the identification of clinically significant yeasts. *J Med Microbiol*. 2001; 50: 1105-10.
26. Land GA, Salkin IF, El-Zaatari M, Mc Ginnis MR, Hashem G. Evaluation of the Baxter-MicroScan 4-Hour enzyme-based yeast identification system. *J Clin Microbiol*. 1991; 29: 718-22.
27. Aubertine CL, Rivera M, Rohan SM, Larone DH. Comparative study of the new colorimetric VITEK 2 yeast identification card versus the older fluorometric card and of CHROMagar *Candida* as a source medium with the new card. *J Clin Microbiol*. 2006; 44:227-28.
28. Borman AM, Linton CJ, Miles S-J, Johnson EM. Molecular identification of pathogenic fungi. *J Antimicrob Chemother*. [Internet]. 2008 Jan [acesso em 31 de outubro de 2013];61 Suppl 1:17–2. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18063605>

29. Rakeman JL, Bui U, LaFe K, Chen YC, Honeycutt R J, Cookson BT. Multilocus DNA Sequence Comparisons Rapidly Identify Pathogenic Molds. J Clin Microbiol. 2005 ; 43:7 3324-3333; doi:10.1128.
30. Guarro J, Gene´ J, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. Clin Microbiol Rev. 1999; 12: 454-500.
31. Balajee SA, Marr KA. Phenotypic and genotypic identification of human pathogenic aspergilli. Future Microbiol. 2006; 1:435-45.
32. Atkins SD, Clark IM. Fungal molecular diagnostic: a mini review. J Appl Genet. 2004; 45:13-5.
33. Chen SCA, Halliday CL, Neyer W. A review of nucleic acid based diagnostic tests of systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction based assays. Med Mycol. 2002; 40: 333-57.
34. Zhao J, Kong F, Li R, Wang X, Wan Z, Wang D. Identification of *Aspergillus fumigatus* and related species by nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. J Clin Microbiol. 2001;39: 2261-66
35. Sandhu GS, Kline BC, Stockman L, Roberts GD. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. J Clin Microbiol. 1995; 33: 2913-2919.
36. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. Clin Microbiol Rev. 2006; 19: 165-256.

37. Pryce TM, Kay ID, Palladino S, Heath CH. Real-time automated polymerase chain reaction (PCR) to detect *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* DNA in whole blood from high-risk patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003; 47: 487-96.
38. Call DR. Challenges and opportunities for pathogen detection using DNA microarrays. *Crit Rev Microbiology*. 2005; 31: 91-99.
39. Miller MB, Tang Y-W. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. *CMR [Internet]*. 2009 [acesso em 14/07/2012]; 22(4):611–33. Disponível em:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2772365&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
40. Leinberger DM, Schumacher U, Autenrieth IB, Bachmann TT. Development of a DNA Microarray for Detection and Identification of Fungal Pathogens Involved in Invasive Mycoses. 2005; 43(10):4943–53.
41. Lin B, Blaney KM, Malanoski AP, Ligler AG, Schnur JM, Metzgar D, *et al*. Using a resequencing microarray as a multiple respiratory pathogen detection assay. *J Clin Microbiol [Internet]*. 2007 Fev [acesso em 23 de agosto de 2012];45(2):443–52. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1829030/pdf/1870-06.pdf>
42. Khodakov, D. A., N. V. Zakharova, D. A. Gryadunov, F. P. Filatov, A. S. Zasedatelev, and V. M. Mikhailovich. An oligonucleotide microarray for multiplex real-time PCR identification of HIV-1, HBV, and HCV. *BioTechniques* . 2008; 44:241–46.

43. Dill k and Ghindilis A. Electrochemical detection on microarrays. In: Dill K, Liu R, Grodzinski P(ed). Microarrays: preparation, microfluidics, detection methods and biological applications. New York: Spring science.2009; 25-33. Série: Integrated analytical Systems.
44. Farina C, Russello G, Andreoni S, Bonetti C, Conte M, Fazi P, *et al.* Microarray technology for yeast identification directly from positive blood cultures. A multicenter Italian experience. Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology [Internet]. 2012 [acesso em 25/08/2012];50(5):549–55. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22217211>
45. Buchan BW, Ledeboer NA. Advances in identification of clinical yeast isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry.J Clin Microbiol. 2013; 51(5):1359-66. doi: 10.1128/JCM.03105-12
46. Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horré R, Maier T, *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. J Clin microbiol [Internet]. 2009 [acesso em 20 de agosto de 2013]; 47(9):2912–7.Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2738125&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
47. Dhiman N, Hall L, Wohlfel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL.Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. J.Clin. Microbiol. 2011; 49:1614 –16.

48. Bader O, Weig M, Taverne GL, Lugert R, Gross U, Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17:1359–65.
49. Lass-Flörl C, Perkhofer S, Mayr A. In vitro susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. *Mycoses* [on-line]. 2010 [acesso em 29/10/2013];53
50. Pfaller MA, Diekema DJ. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *Journal of clinical microbiology* [Internet]. 2012 Set [acesso em 17 de out 2013];50(9):2846–56. Disponível em:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3421803&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
51. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27–A3. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
52. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 3rd informational supplement. M27–S3. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.

53. Rodriguez-Tudela JL, Arendrup MC, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M, *et al.* EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(4):398-405.
54. Arendrup MC., Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W and the Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST Definitive Document EDef 7.2. Method for the determination of broth dilution minimum Inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). [on-line]. 2012 Jul; 18(7):E246-E247. Disponível em:
www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/EUCAST_EDef_7_2_revision.pdf
55. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informational supplement. M27–S4. CLSI, Wayne, PA, USA, 2012.
56. Cuenca EM, Tudela JLR. The current role of the reference procedures by CLSI and EUCAST in the detection of resistance to antifungal agents in vitro. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2010; 8:3, 267-276

57. Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff a, Sheehan D. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy [Internet]. Elsevier Ltd; 2010 [acesso em 20 ago 2012];13(6):180–95. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21050800>
58. Park JB, Skaggs-Arthington A, Hajjeh RA, Iqbal N, Ciblak MA, Lee-Yang W, *et al.* Evaluation of amphotericin B interpretative breakpoints for *Candida* bloodstream isolates by correlation with therapeutic outcome. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(4): 1287.
59. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG. Multicenter comparison of the VITEK 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine, and voriconazole against *Candida* spp. J. Clin. Microbiol. 2007;45:3522–28.
60. Pfaller MA, Andes D, Arendrup MC, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Alexander BD, *et al.* Clinical breakpoints for voriconazole and *Candida* spp. revisited: review of microbiologic, molecular, pharmacodynamic, and clinical data as they pertain to the development of species-specific interpretive criteria. Diagnostic microbiology and infectious disease [Internet]. Elsevier Inc.; 2011 Jul [acesso em 5 Ago 2012]; 70(3):330–43. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21546199>

61. Pfaller MA, Diekema DJ, Andes D, Arendrup MC, Brown SD, Lockhart SR, *et al.* Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* [Internet]. 2011 Jun [acesso em 8 ago 2012];14(3):164–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21353623>
62. Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, Barnes R, Hu B, Veselov AV, *et al.* Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study : a 6 .5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* and Other Yeast Species to Fluconazole and Voriconazole by Standardized Disk Diffusion Testing. *J Clin Microbiol.* 2005; 43 (12): 5848-59.
63. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline M44-A.* Wayne, PA: NCLSI; 2004.
64. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. In vitro susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: four years of global surveillance. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 760–763.
65. Arikan S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Med Mycol.* 2007;569–87.

66. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ. Activities of Fluconazole and Voriconazole against 1,586 Recent Clinical Isolates of *Candida* Species Determined by Broth Microdilution, Disk Diffusion, and Etest Methods: Report from The ARTEMIS Global Antifungal Susceptibility Program, 2001. J Clin Microbiol. 2003 41: (4) 1440-46; doi:10.1128/JCM.41.4.1440-1446.2003.
67. Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, Boyken LB, Tendolkan S, Kroeger S, *et al.* 2007. Evaluation of Etest and disk diffusion methods compared with broth microdilution antifungal susceptibility testing of clinical isolates on *Candida* spp. against posaconazole. J Clin Microbiol. 45:1974-1977.
68. Alexander BD, Byrne TC, Smith KL, Hanson K, Anstrom KJ, Perfect JR, Reller J LB. Comparative Evaluation of Etest and Sensititre YeastOne Panels against the Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 Reference Broth Microdilution Method for Testing *Candida* Susceptibility to Seven Antifungal Agents Clin. Microbiol. 2007.45(3): 698-706.
69. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martinez L, Cuesta I, Buitrago MJ, *et al.* Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the clinical and laboratory standards institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest techniques for in vitro detection of antifungal resistance in yeast isolates. J Clin Microbiol [on line]. 2010 [acesso em 17 de out 2013]; 48(5): 1782-6. Disponível em:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2863906&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

70. Clancy CJ, Nguyen MH. Correlation between in vitro susceptibility determined by E test and response to therapy with amphotericin B: results from a multicenter prospective study of candidemia. *Antimicrob. Agents Chemother* 1999;43:1289-1290.
71. Makimura K, Oguri T, Mikami Y, Kume H, Hanazawa R, Abe M, Ikeda R, Shinoda T. Multicenter evaluation of commercial frozen plates for microdilution broth antifungal susceptibility testing of yeasts and comparison of MIC limits recommended in NCCLS M27-A2. *Microbiol Immunol*.2005; 49(2):97-106.
72. Pfaller MA, DJ Diekema, GW Procop, MG Rinaldi. Multicenter comparison of the VITEK 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine, and voriconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol*.2007; 45:3522–28.
73. Posteraro B, Martucci R, La Sorda M, Fiori B, Sanglard D, De Carolis E, Florio A R, Fadda G, Sanguinetti M. Reliability of the Vitek 2 yeast susceptibility test for detection of in vitro resistance to fluconazole and voriconazole in clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol*. 2009; 47:1927–30.
74. Posteraro B. Use of matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry for caspofungin susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol*. 2012; 50: 2479 –83.
75. De Carolis E, Vella A, Florio AR, Posteraro P, Perlin DS, Sanguinetti M Posteraro B.. Use of matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry for caspofungin susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 2012;50: 2479 –83.

76. Pfaller MA, Messer S a, Woosley LN, Jones RN, Castanheira M. Echinocandin and Triazole Antifungal Susceptibility Profiles for Clinical Opportunistic Yeast and Mold Isolates Collected from 2010 to 2011: Application of New CLSI Clinical Breakpoints and Epidemiological Cutoff Values for Characterization of Geographic . J Clin Microbiol [Internet]. 2013[acesso em 7/08/2013]; 51(8): 2571–81. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23720791>.
77. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, *et al.* Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. PLoS ONE.2013; 8(3): e59373. doi:10.1371/journal.pone.0059373. 1. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3601956&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
78. Motta AL, Almeida GMD, Nóbrega de AJ, Nascimento BM, Rossi F. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. Braz J Infect Dis. 2010 [acesso em 26 de setembro de 2013];14(5): 441-448. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702010000500004&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-86702010000500004>.
79. Leaw SN, Chang HC, Barton R, Bouchara J-P, Chang TC. Identification of medically important Candida and non-Candida yeast species by an oligonucleotide array. J Clin Microbiol . 2007 [acesso em 25/08/2012];45(7):2220–9. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1933000&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

80. Sato T, Takayanagi A, Nagao K, Tomatsu N, Fukui T, Kawaguchi M, *et al.* Simple PCR-based DNA microarray system to identify human pathogenic fungi in skin. J Clin microbiol . 2010 [acesso em 25/08/2012];48(7):2357–64. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2897498&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
81. Hsiue H-C, Huang Y-T, Kuo Y-L, Liao C-H, Chang T-C, Hsueh P-R. Rapid identification of fungal pathogens in positive blood cultures using oligonucleotide array hybridization. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases [Internet]. 2010;16(5):493–500. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19624510>
82. Cantón E, Pemán J, Quindós G, Eraso E, Miranda-Zapico I, Álvarez M, *et al.* Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. Antimicrob Agents Chemother. [on line]. 2011 Dez [acesso em 7 de jan de 2014];55(12):5590–6. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3232769&tool=pmcentrez&renderty=1>.
83. Bonfietti LX, Martins MDA, Szeszs MW, Pukiskas SBS, Purisco SU, Pimentel FC, *et al.* Prevalence, distribution and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* bloodstream isolates. J Med Microbiol. [on line]. 2012 Jul [acesso em 8 de jan de 2014];61:1003–8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22493277>

84. Huang A, Li J-W, Shen Z-Q, Wang X-W, Jin M. High-throughput identification of clinical pathogenic fungi by hybridization to an oligonucleotide microarray. *J Clin microbiol.* [on line]. 2006 Set [acesso em 15 de agosto de 2013]; 44(9):3299–305. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1594736/pdf/0417-06.pdf>
85. Spiess B, Seifarth W, Hummel M, Frank O, Fabarius A, Zheng C, et al. DNA microarray-based detection and identification of fungal pathogens in clinical samples from neutropenic patients. *J Clin Microbiol* [on line]. 2007 Nov [acesso em 25 ago 2012]; 45(11):3743–53. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2168469&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
86. Campa D, Tavanti A, Gemignani F, Mogavero CS, Bellini I, Bottari F, *et al.* DNA microarray based on arrayed-primer extension technique for identification of pathogenic fungi responsible for invasive and superficial mycoses. *J Clin Microbiol* [on line]. 2008 [acesso em 29/08/2012]; 46(3): 909–15. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2268329&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
87. Ferrari MDL, Resende MR, Kanae S, Yasunori M, Lyra L, Mikami Y *et al.* Accurate visual DNA-microarray for the molecular identification of non-*albicans* *Candida* species isolated from candidemia episodes. *J Clin Microbiol.* 2013. [acesso em 4 de novembro de 2013]. Disponível em: <http://jcm.asm.org/content/early/2013/06/13/JCM.01050-13.abstract>

88. Yoo SM, Choi JY, Yun JK, Choi JK, Shin SY, Lee K, et al. DNA microarray-based identification of bacterial and fungal pathogens in bloodstream infections. *Molecular and cellular probes* ; 2010 [acesso em 25/08/2012];24(1):44–52. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19818395>
89. Wiesinger-Mayr H, Vierlinger K, Pichler R, Kriegner A, Hirschl AM, Presterl E, *et al.* Identification of human pathogens isolated from blood using microarray hybridisation and signal pattern recognition. *BMC microbiology* [on line]. 2007 [acesso em 20 Out 2013]; 7:78. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1994958&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
90. Borman AM, Szekely A, Palmer MD, Johnson EM. Assessment of accuracy of identification of pathogenic yeasts in microbiology laboratories in the United kingdom. *J clinical microbiol* [on line]. 2012 [acesso em 25/08/ 2012];50(8):2639–44. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22649009>.
91. Everett KR, Pushparajah IPS, Janssen BJ, Luo Z. Advantages and disadvantages of microarrays to study microbial population dynamics – a minireview. *New Zealand Plant Protection*. 2010; 6:1–6.
92. Spanu T, Posteraro B, Fiori B, D’Inzeo T, Campoli S, Ruggeri A, Tumbarello M, Canu G, Trecarichi EM, Parisi G, Tronci M, Sanguinetti M, Fadda G. 2012. Direct MALDI-TOF mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida* species causing bloodstream infections: an observational study in two large microbiology laboratories. *J. Clin Microbiol.* 50:176 –9.

93. Passos XS, Costa CR, Araujo CR, Nascimento ES, Souza LK, *et al.* Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp. bloodstream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. *Mycopathologia* .2007;163: 145–151. doi:10.1007/s11046-007-0094-5.
94. Aquino VR, Lunardi WL, Goldmani LZ, Barth AL. Prevalence, Susceptibility Profile for Fluconazol and Risk Factors for Candidemia in a Tertiary Hospital in Southern Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2005; 9: 411-18.
95. Bassetti M, Trecarichi EM, Righi E, Sanguinetti M, Bisio F, Posteraro B. Incidence, risk factors, and predictors of outcome of candidemia. Survey in 2 Italian university hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007 58(3):325-31.
96. Xess A, Jain A, Hasan A, Mandal A, Banerjee J. Epidemiology of Candidemia in a Tertiary Care Centre of North India: 5-Year Study. *Infection*. 2007; 35(4): 256-259
<http://dx.doi.org/10.1007/s15010-007-6144-6>.
97. Cisterna R, Ezpeleta G, Telleria O, J. Guinea, B. Regueiro, J. Garcia-Rodríguez. Nationwide Sentinel Surveillance of Bloodstream *Candida* Infections in 40 Tertiary Care Hospitals in Spain. *J Clin Microbiol*. 2010; 48:11 4200-06.
98. Cleveland AA, Farley MM, Harrinson LH, Stein B, Hollick R, Lockhart SR *et al.* Changes in Incidence and Antifungal Drug Resistance in Candidemia: Results From Population-Based Laboratory Surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008–2011. *Clin Infect Dis*. 2012; 55 (10): 1352-61.

99. Pfaller MA, Diekema DJ. Interpretive Breakpoints for Fluconazole and Candida Revisited: a Blueprint for the Future of Antifungal Susceptibility Testing. *J Clin Microbiol.* 2006 19:435-447; doi:10.1128/CMR.19.2.435-447.2006.
100. Colombo AL, Garnica M, Aranha Camargo LF, Da Cunha CA, Bandeira AC, Borghi D, *et al.* *Candida glabrata*: an emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. *Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology* [on line]. 2012 Jul [acesso em 17 jul de 2012]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22762208>.
101. Godoy P, Tiraboschi IN, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, Almeida LP De, *et al.* Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [on line]. 2003 Abr;98(3):401–5. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12886424>
102. Savini V, Catavittello C, Onofrillo D, Masciarelli G, Astolfi D, Balbinot A, *et al.* What do we know about *Candida guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. *Mycoses* [on line]. 2011 Set [acesso em 13 Jan de 2014];54(5):434–41. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21039941>
103. Almeida Jr J, Motta A, Rossi F, Abdala E, Pierrotti L, Kono A, *et al.* First report of a clinical isolate of *Candida haemulonii* in Brazil. *Clinics* [on line]. Out 2012 [acesso em 13 de jan de 2014];67(10):1229–31. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3460029/>

104. Slavin MA, Sorrell TC, Marriott D, *et al.* Candidaemia in adult cancer patients: risks for fluconazole-resistant isolates and death .J Antimicrob Chemother. 2010; 65 : 1042 – 51.
105. Nunes EB, Nunes NB, Monteiro JC, Paes ALV. Perfil de sensibilidade do gênero *Candida* a antifúngicos em um hospital de referência da Região Norte do Brasil. Rev Pan-Amaz Saude [on line]. 2011 [acesso em 26 de ago de 2013]; 2(4): 23-30. Disponível em: http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232011000400004&lng=es.
106. Baddley JW, Patel M, Bhavnani SM, Moser SA, Andes DR. Association of Fluconazole Pharmacodynamics with Mortality in Patients with Candidemia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 52(9): 3022-28.
107. Odds FC. Long term laboratory preservation of pathogenic yeasts in water. J Med Vet Mycol. 1991; 29: 413-5.
108. Spencer JF, Spencer DM. Maintenance and culture of yeasts. Methods Mol Biol. 1996;53:5-15.

8. ANEXOS

Anexo 1. Métodos utilizados na rotina para a identificação dos isolados de não-*Candida albicans* provenientes do sangue (18,19).

A primeira etapa na identificação da levedura passa passou pela certificação de que a cultura encontrava-se isenta de contaminação de qualquer espécie para a obtenção de uma cultura pura.

As colônias da levedura foram isoladas em placa de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose e incubadas em estufa a 35° por 24 a 48 h.

1.1. Observação da macromorfologia

Foi observado o crescimento em Ágar Sabouraud Dextrose, avaliando-se cuidadosamente a textura e superfície da colônia como também o reverso e para então iniciar os procedimentos de identificação.

1.2. Observação microscópica

1.2.1. Exame direto

O exame microscópico direto das amostras foi feito colocando-se um fragmento da colônia sobre a lâmina e adicionado 1 gota de salina, cobrindo-se posteriormente com lamínula.

1.2.2. Teste do tubo germinativo

Foi adicionado um pequeno inóculo da levedura em 0,5 mL soro bovino estéril. A seguir, foram realizadas as seguintes etapas:

1. Incubou-se a 37°C por um período de 1,5-2 horas;
2. Ao final deste período foi colocado uma gota da mistura do soro com levedura em uma lâmina e cobriu-se com a lamínula;
3. Examinou-se microscopicamente a produção do tubo germinativo

1.2.3. Teste de filamentação

Para este teste é utilizado como meio de base o Ágar fubá (Corn Meal Agar) com Tween 80. A metodologia foi realizada nas seguintes etapas:

1. Colocou-se em uma placa de Petri e 2 lâminas intercaladas;
2. Distribui-se o meio ágar fubá sobre a lâmina superior;
3. Após este ficar consistente, a levedura foi semeada utilizando alça de platina fazendo-se de 2 a 3 estrias retas;
4. Com uma lamínula cobriu-se as estrias;
5. Incubou-se a placa a temperatura ambiente por 24 - 48 h;
6. Observou-se ao microscópio após a remoção da tampa da placa de Petri.

1.3. Sistema automatizado VITEK® 2 (YST)

A metodologia foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (bioMérieux). Inicialmente foi preparado o inóculo a partir da cultura pura conforme descrito a seguir:

1. Foram selecionadas colónias isoladas em uma placa primária conforme os requisitos propostos pelo fabricante. Foi preparado uma subcultura do microrganismo a ser testado em meio Ágar Sabouraud dextrose e incubado a 35°C por 24h.
2. Transferiu-se assepticamente 3,0 mL de solução salina estéril (NaCl aquoso de 0,45% a 0,50%, pH 4,5 a 7,0) para um tubo de ensaio de plástico (poliestireno) transparente.
3. Foram transferidas um número suficiente de colónias morfológicamente idênticas para o tubo com solução salina preparado na Etapa 2. Foi preparada uma suspensão de microrganismo homogênea com uma densidade equivalente a um padrão McFarland de 1,80 a 2,20 utilizando o calibrador do DensiCHEK™ VITEK® 2. O tempo de espera da suspensão não excedeu os 30 minutos antes da inoculação da carta.

A seguir, o tubo da suspensão e a carta YST foram inseridos no cassete do aparelho. O resultado obtido é o percentual de probabilidade de a cepa ser classificada como determinada espécie.

Anexo 2: Construção do banco de isolados do estudo

Para a construção do banco de cepas, foram utilizados dois métodos de armazenamento, descritos a seguir:

a. Método de armazenamento em água

Após o cultivo no meio CHROMagar e no Sabourad dextrose, cada amostra foi estocada em duplicata em água destilada estéril em frasco de vidro com tampa plástica a temperatura ambiente (107).

b. Método de congelamento a – 70°C

Adicionalmente, as colônias oriundas do crescimento de 24 h em Agar Sabouraud foram inoculadas em meio YEPD (extrato de levedura, dextrose, bactopectona, água destilada) e incubadas sob agitação por 24hs a 35°C com agitação contínua. Em seguida, adicionou-se 800µL desta suspensão em 200 µL de glicerol a 80% (agente crioprotetor) em ependorfes que após homogeneização foram congelados a -70°C (108).

Anexo 3: Dados de inserção das sondas da plataforma de microarranjo de DNA no GenBank

UID,Accession,Caption,Name,Type,Application,Source organism,Source sequence,Source gene,Other source,Target organism,Target sequence,Target gene,Other target

31796896, Pr031796896, "Candida tropicalis microarray element probe 4B 17 for AB437085.1", "4B 17", "microarray element", "gene expression", "Candida tropicalis", "AB437085.1 (Candida tropicalis)", , , "Candida tropicalis", "AB437085.1 (Candida tropicalis)", , ,
31796895, Pr031796895, "Candida tropicalis microarray element probe 4B 19 for AB437085.1", "4B 19", "microarray element", "gene expression", "Candida tropicalis", "AB437085.1 (Candida tropicalis)", , , "Candida tropicalis", "AB437085.1 (Candida tropicalis)", , ,
31796894, Pr031796894, "Candida tropicalis microarray element probe 4A 15 for AB437085.1", "4A 15", "microarray element", "gene expression", "Candida tropicalis", "AB437085.1 (Candida tropicalis)", , , "Candida tropicalis", "AB437085.1 (Candida tropicalis)", , ,
31796893, Pr031796893, "Candida tropicalis microarray element probe 4A 17 for AB437085.1", "4A 17", "microarray element", "gene expression", "Candida tropicalis", "AB437085.1 (Candida tropicalis)", , , "Candida tropicalis", "AB437085.1 (Candida tropicalis)", , ,
31796892, Pr031796892, "Candida tropicalis microarray element probe 4A 19 for AB437085.1", "4A 19", "microarray element", "gene expression", "Candida tropicalis", "AB437085.1 (Candida tropicalis)", , , "Candida tropicalis", "AB437085.1 (Candida tropicalis)", , ,
31796891, Pr031796891, "Candida tropicalis microarray element probe 3B 15R for AB437085.1", "3B 15R", "microarray element", "gene expression", "Candida tropicalis", "AB437085.1 (Candida tropicalis)", , , "Candida tropicalis", "AB437085.1 (Candida tropicalis)", , ,
31796890, Pr031796890, "Candida tropicalis microarray element probe 3B 17R for AB437085.1", "3B 17R", "microarray element", "gene expression", "Candida tropicalis", "AB437085.1 (Candida tropicalis)", , , "Candida tropicalis", "AB437085.1 (Candida tropicalis)", , ,
31796889, Pr031796889, "Candida tropicalis microarray element probe 3B 19R for AB437085.1", "3B 19R", "microarray element", "gene expression", "Candida tropicalis", "AB437085.1 (Candida tropicalis)", , , "Candida tropicalis", "AB437085.1 (Candida tropicalis)", , ,
31796888, Pr031796888, "Candida tropicalis microarray element probe 3A 16R for AB437085.1", "3A 16R", "microarray element", "gene expression", "Candida tropicalis", "AB437085.1 (Candida tropicalis)", , , "Candida tropicalis", "AB437085.1 (Candida tropicalis)", , ,
31796887, Pr031796887, "Candida tropicalis microarray element probe 3A 17R for AB437085.1", "3A 17R", "microarray element", "gene expression", "Candida tropicalis", "AB437085.1 (Candida tropicalis)", , , "Candida tropicalis", "AB437085.1 (Candida tropicalis)", , ,
31796886, Pr031796886, "Candida parapsilosis microarray element probe 6B 18R for AB109287.1", "6B 18R", "microarray element", "gene expression", "Candida parapsilosis", "AB109287.1 (Candida parapsilosis)", , , "Candida parapsilosis", "AB109287.1 (Candida parapsilosis)", , ,
31796885, Pr031796885, "Candida parapsilosis microarray element probe 6B 17 for AB109287.1", "6B 17", "microarray element", "gene expression", "Candida parapsilosis", "AB109287.1 (Candida parapsilosis)", , , "Candida parapsilosis", "AB109287.1 (Candida parapsilosis)", , ,
31796884, Pr031796884, "Candida parapsilosis microarray element probe 6B 18 for AB109287.1", "6B 18", "microarray element", "gene expression", "Candida parapsilosis", "AB109287.1 (Candida parapsilosis)", , , "Candida parapsilosis", "AB109287.1 (Candida parapsilosis)", , ,

[illegible]

31796866, Pr031796866, "Kluyveromyces marxianus microarray element probe Ck4-t17R for DQ249191.1", "Ck4-t17R", "microarray element", "gene expression", "Kluyveromyces marxianus", "DQ249191.1 (Kluyveromyces marxianus)", , , "Kluyveromyces marxianus", "DQ249191.1

31796865, Pr031796865, "Kluyveromyces marxianus microarray element probe Ck4-17Rt for DQ249191.1", "Ck4-17Rt", "microarray element", "gene expression", "Kluyveromyces marxianus", "DQ249191.1 (Kluyveromyces marxianus)", , , "Kluyveromyces marxianus", "DQ249191.1

31796864, Pr031796864, "Kluyveromyces marxianus microarray element probe Ck4-t17 for DQ249191.1", "Ck4-t17", "microarray element", "gene expression", "Kluyveromyces marxianus", "DQ249191.1 (Kluyveromyces marxianus)", , , "Kluyveromyces marxianus", "DQ249191.1

31796863, Pr031796863, "Kluyveromyces marxianus microarray element probe Ck2-t20R for DQ249191.1", "Ck2-t20R", "microarray element", "gene expression", "Kluyveromyces marxianus", "DQ249191.1 (Kluyveromyces marxianus)", , , "Kluyveromyces marxianus", "DQ249191.1

31796862, Pr031796862, "Kluyveromyces marxianus microarray element probe Ck2-20Rt for DQ249191.1", "Ck2-20Rt", "microarray element", "gene expression", "Kluyveromyces marxianus", "DQ249191.1 (Kluyveromyces marxianus)", , , "Kluyveromyces marxianus", "DQ249191.1

31796861, Pr031796861, "Kluyveromyces marxianus microarray element probe Ck1-t16R for DQ249191.1", "Ck1-t16R", "microarray element", "gene expression", "Kluyveromyces marxianus", "DQ249191.1 (Kluyveromyces marxianus)", , , "Kluyveromyces marxianus", "DQ249191.1

31796860, Pr031796860, "Pichia kudriavzevii microarray element probe 10B 15 for AB369918.1", "10B 15", "microarray element", "gene expression", "Pichia kudriavzevii", "AB369918.1 (Pichia kudriavzevii)", , , "Pichia kudriavzevii", "AB369918.1 (Pichia kudriavzevii)", ,

31796859, Pr031796859, "Pichia kudriavzevii microarray element probe 10B 17 for AB369918.1", "10B 17", "microarray element", "gene expression", "Pichia kudriavzevii", "AB369918.1 (Pichia kudriavzevii)", , , "Pichia kudriavzevii", "AB369918.1 (Pichia kudriavzevii)", ,

31796858, Pr031796858, "Pichia kudriavzevii microarray element probe 10B 19 for AB369918.1", "10B 19", "microarray element", "gene expression", "Pichia kudriavzevii", "AB369918.1 (Pichia kudriavzevii)", , , "Pichia kudriavzevii", "AB369918.1 (Pichia kudriavzevii)", ,

31796857, Pr031796857, "Pichia kudriavzevii microarray element probe 10A 15 for AB369918.1", "10A 15", "microarray element", "gene expression", "Pichia kudriavzevii", "AB369918.1 (Pichia kudriavzevii)", , , "Pichia kudriavzevii", "AB369918.1 (Pichia kudriavzevii)", ,

31796856, Pr031796856, "Pichia kudriavzevii microarray element probe 10A 17 for AB369918.1", "10A 17", "microarray element", "gene expression", "Pichia kudriavzevii", "AB369918.1 (Pichia kudriavzevii)", , , "Pichia kudriavzevii", "AB369918.1 (Pichia kudriavzevii)", ,

31796855, Pr031796855, "Pichia kudriavzevii microarray element probe 10A 19 for AB369918.1", "10A 19", "microarray element", "gene expression", "Pichia kudriavzevii", "AB369918.1 (Pichia kudriavzevii)", , , "Pichia kudriavzevii", "AB369918.1 (Pichia kudriavzevii)", ,

31796854, Pr031796854, "Pichia kudriavzevii microarray element probe 9C-3R for AB369918.1", "9C-3R", "microarray element", "gene expression", "Pichia kudriavzevii", "AB369918.1 (Pichia kudriavzevii)", , , "Pichia kudriavzevii", "AB369918.1 (Pichia kudriavzevii)", ,

31796853, Pr031796853, "Pichia kudriavzevii microarray element probe 9C-2R for AB369918.1", "9C-2R", "microarray element", "gene expression", "Pichia kudriavzevii", "AB369918.1 (Pichia kudriavzevii)", , , "Pichia kudriavzevii", "AB369918.1 (Pichia kudriavzevii)", ,

31796852, Pr031796852, "Pichia kudriavzevii microarray element probe 9C-1R for AB369918.1", "9C-1R", "microarray element", "gene expression", "Pichia kudriavzevii", "AB369918.1 (Pichia kudriavzevii)", , , "Pichia kudriavzevii", "AB369918.1 (Pichia kudriavzevii)", ,

31796850, Pr031796850, "Pichia kudriavzevii microarray element probe 9B 19R for AB369918.1", "9B 19R", "microarray element", "gene expression", "Pichia kudriavzevii", "AB369918.1 (Pichia kudriavzevii)", , , "Pichia kudriavzevii", "AB369918.1 (Pichia kudriavzevii)", ,

31796849, Pr031796849, "Candida glabrata microarray element probe 8B 15 for AY939793.1", "8B 15", "microarray element", "gene expression", "Candida glabrata", "AY939793.1 (Candida glabrata)", , , "Candida glabrata", "AY939793.1 (Candida glabrata)", ,

31796848, Pr031796848, "Candida glabrata microarray element probe 8B 17 for AY939793.1", "8B 17", "microarray element", "gene expression", "Candida glabrata", "AY939793.1 (Candida glabrata)", , , "Candida glabrata", "AY939793.1 (Candida glabrata)", ,

31796847, Pr031796847, "Candida glabrata microarray element probe 8B 19 for AY939793.1", "8B 19", "microarray element", "gene expression", "Candida glabrata", "AY939793.1 (Candida glabrata)", , , "Candida glabrata", "AY939793.1 (Candida glabrata)", ,

31796846, Pr031796846, "Candida glabrata microarray element probe 8A 17 for AY939793.1", "8A 17", "microarray element", "gene expression", "Candida glabrata", "AY939793.1 (Candida glabrata)", , , "Candida glabrata", "AY939793.1 (Candida glabrata)", ,

31796845, Pr031796845, "Candida glabrata microarray element probe 8A 19 for AY939793.1", "8A 19", "microarray element", "gene expression", "Candida glabrata", "AY939793.1 (Candida glabrata)", , , "Candida glabrata", "AY939793.1 (Candida glabrata)", ,

31796844, Pr031796844, "Candida glabrata microarray element probe 7B 19R for AY939793.1", "7B 19R", "microarray element", "gene expression", "Candida glabrata", "AY939793.1 (Candida glabrata)", , , "Candida glabrata", "AY939793.1 (Candida glabrata)", ,

31796843, Pr031796843, "Candida glabrata microarray element probe 7B 17 for AY939793.1", "7B 17", "microarray element", "gene expression", "Candida glabrata", "AY939793.1 (Candida glabrata)", , , "Candida glabrata", "AY939793.1 (Candida glabrata)", ,

31796842, Pr031796842, "Candida glabrata microarray element probe 7B 19 for AY939793.1", "7B 19", "microarray element", "gene expression", "Candida glabrata", "AY939793.1 (Candida glabrata)", , , "Candida glabrata", "AY939793.1 (Candida glabrata)", ,

31796841, Pr031796841, "Candida glabrata microarray element probe 7A 15R for AY939793.1", "7A 15R", "microarray element", "gene expression", "Candida glabrata", "AY939793.1 (Candida glabrata)", , , "Candida glabrata", "AY939793.1 (Candida glabrata)", ,

31796840, Pr031796840, "Candida glabrata microarray element probe 7A 17R for AY939793.1", "7A 17R", "microarray element", "gene expression", "Candida glabrata", "AY939793.1 (Candida glabrata)", , , "Candida glabrata", "AY939793.1 (Candida glabrata)", ,

31796839, Pr031796839, "Candida glabrata microarray element probe 7A 19R for AY939793.1", "7A 19R", "microarray element", "gene expression", "Candida glabrata", "AY939793.1 (Candida glabrata)", , , "Candida glabrata", "AY939793.1 (Candida glabrata)", ,

31796838, Pr031796838, "Meyerozyma guilliermondii microarray element probe 55B 15 for AB369917.1", "55B 15", "microarray element", "gene expression", "Meyerozyma guilliermondii", "AB369917.1 (Meyerozyma guilliermondii)", , , "Meyerozyma guilliermondii", "AB369917.1 (Meyerozyma guilliermondii)", ,

31796837, Pr031796837, "Meyerozyma guilliermondii microarray element probe 55B 17 for AB369917.1", "55B 17", "microarray element", "gene expression", "Meyerozyma guilliermondii", "AB369917.1 (Meyerozyma guilliermondii)", , , "Meyerozyma guilliermondii", "AB369917.1 (Meyerozyma guilliermondii)", ,

31796836, Pr031796836, "Meyerozyma guilliermondii microarray element probe 55B 19 for AB369917.1", "55B 19", "microarray element", "gene expression", "Meyerozyma guilliermondii", "AB369917.1 (Meyerozyma guilliermondii)", , , "Meyerozyma guilliermondii", "AB369917.1 (Meyerozyma guilliermondii)", ,



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 20/12/11
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 1240/2011 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 1127.0.146.000-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE CANDIDA NÃO-ALBICANS (ISOLADOS DE HEMOCULTURA) ATRAVÉS DA TÉCNICA DE MICROARRAY E SEQUENCIAMENTO COMPARATIVAMENTE AO MÉTODO AUTOMATIZADO E TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Michela De Luca Ferrari

INSTITUIÇÃO: Hospital de Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 01/12/2011

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 20/12/12 (O formulário encontra-se no site acima).

II – OBJETIVOS.

Avaliar o método “DNA *microarray*” para a identificação de fungos leveduriformes do gênero *Candida*

III – SUMÁRIO.

Trata-se de um projeto de doutorado. A pesquisa é retrospectiva e usa amostras microorganismos (fungos) que foram isolados de hemoculturas solicitadas a critérios clínicos durante a assistência do sujeito no Hospital de Clínicas no período de 2006 a 2010. Os microorganismos encontram-se armazenados na micoteca do Setor de Micologia do Departamento de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas/UNICAMP. Toda a pesquisa será realizada no laboratório de investigação em fungos e laboratório de epidemiologia molecular e fungos da FCM/UNICAMP. Não serão consultados prontuários para levantamento de dados clínicos, será utilizados apenas os dados de identificação do paciente a fim de evitar a inclusão de cepas em duplicadas. Os fungos previamente identificados, e estocados em água estéril, serão re-isolados e re-identificados pelos métodos macro e micro morfológicos. Posteriormente serão submetidos à análises em plataforma de sequências de Oligonucleotídeos (DNA – *microarray*) e sequenciamento.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES.

Após análise crítica do protocolo não encontramos riscos ou prejuízos para os sujeitos da pesquisa (possibilidade e gravidade). Os autores do projeto se mostram com o compromisso de cumprir as exigências da Resolução 196/96 e suas complementares. O trabalho está elaborado dentro das normas éticas e científicas. A dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é adequada.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

- 1 -



V - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, a dispensa do Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES.

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e).

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 20 de dezembro de 2011.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo 5. Perfil de suscetibilidade de espécies de *Candida* spp

Espécie (n)	S		SDD		R	
	n	%	n	%	n	%
Antifúngicos						
<i>C. albicans</i> (1)						
Anfotericina B	1	100	0	0	0	0
5-fluocitocina	1	100	0	0	0	0
Itraconazol	1	100	0	0	0	0
Fluconazol	1	100	0	0	0	0
Voriconazol	1	100	0	0	0	0
Micafungina	1	100	0	0	0	0
<i>C. dubliniensis</i> (1)						
Anfotericina B	1	100	0	0	0	0
5-fluocitocina	1	100	0	0	0	0
Itraconazol	1	100	2	5	0	0
Fluconazol	1	100	0	0	0	0
Voriconazol	1	100	0	0	0	0
Micafungina	1	100	0	0	0	0
<i>C. haemulonii</i> (1)						
Anfotericina B	1	100	0	0	0	0
5-fluocitocina	1	100	0	0	0	0
Itraconazol	1	100	0	0	0	0
Fluconazol	1	100	0	0	0	0
Voriconazol	1	100	0	0	0	0
Micafungina	1	100	0	0	0	0
<i>C. lipolytica</i> (1)						
Anfotericina B	1	100	0	0	0	0
5-fluocitocina	1	100	0	0	0	0
Itraconazol	0	0	1	100	0	0
Voriconazol	1	100	0	0	0	0
Micafungina	1	100	0	0	0	0
<i>C. rugosa</i> (1)						
Anfotericina B	1	100	0	0	0	0
5-fluocitocina	1	100	0	0	0	0
Itraconazol	1	100	0	0	0	0
Fluconazol	1	100	0	0	0	0
Voriconazol	1	100	0	0	0	0
Micafungina	1	100	0	0	0	0

Anexo 6. CIM do 166 isolados de *Candida* spp aos antifúngicos avaliados

Levedura	Nº Isolado	Micafungina	Anfotericina	5 FC	Fluconazol	Itraconazol	Voriconazol
<i>C. tropicalis</i>	2	0,03	1,0	<0,125	1	0,25	0,25
	5	≤0,015	0,25	<0,125	0,25	0,125	0,03
	18	0,03	1,0	≤0,125	1,0	0,125	0,03
	32	≤0,015	1,0	4,0	1,0	0,125	0,03
	33	0,03	1,0	≤0,125	0,5	0,125	0,03
	36	≤0,015	1,0	0,125	0,5	0,125	0,06
	37	0,03	1,0	<0,125	1,0	0,125	1,0
	39	0,03	1,0	0,25	1,0	0,125	0,06
	41	0,015	0,5	<0,125	1,0	0,25	0,125
	43	0,03	1,0	≤0,125	0,5	0,125	0,125
	50	0,03	1,0	<0,125	0,25	0,06	0,06
	60	0,015	0,5	0,125	0,25	0,06	0,06
	64	≤0,015	0,5	<0,125	1,0	0,06	0,03
	72	0,03	1,0	≤0,125	0,5	0,125	0,06
	75	0,03	1,0	≤0,125	0,5	0,125	0,125
	83	0,015	0,5	≤0,125	1,0	0,125	0,06
	84	0,03	1,0	<0,125	0,5	0,125	0,03
	85	0,03	1,0	0,125	0,5	0,125	0,06
	88	0,03	1,0	<0,125	0,5	0,125	0,03
	94	0,03	0,5	≤0,125	0,5	0,125	0,06
	98	0,015	0,5	0,125	0,5	0,06	0,125
	104	0,015	1,0	<0,125	0,5	0,125	0,06
	109	0,015	0,5	≤0,125	0,5	0,125	0,125
	110	0,015	0,5	<0,125	0,25	0,06	0,03
	112	0,015	0,5	≤0,125	0,25	0,06	0,03
	113	0,015	1,0	≤0,125	0,5	0,125	0,03
	120	0,015	0,5	<0,125	0,5	0,125	≤0,015
	127	0,015	1,0	<0,125	0,5	0,125	≤0,015
	132	0,03	0,5	≤0,125	0,25	0,125	0,03
	137	0,015	1,0	<0,125	0,5	0,125	≤0,015
	139	0,015	0,5	<0,125	1,0	0,125	0,03
	140	0,03	1,0	<0,125	0,5	0,125	0,03
	145	0,015	0,5	1,0	0,5	0,06	≤0,015
	149	0,03	0,5	<0,125	2,0	0,125	0,03
	152	0,015	0,5	≤0,125	0,5	0,125	0,03
	171	0,015	0,5	<0,125	0,5	0,125	0,5
	175	0,015	1,0	<0,125	0,5	0,125	0,5
	178	0,03	1,0	0,25	0,25	0,125	0,03
	180	0,015	1,0	0,25	1,0	0,125	≤0,015
	184	0,03	1,0	<0,125	1,0	0,125	0,03
	187	<0,015	1	<0,125	0,25	0,03	0,06
	192	0,015	0,5	<0,125	0,5	0,06	0,06
	196	0,015	1,0	≤0,125	1,0	0,125	0,03
	197	0,015	0,5	≤0,125	0,25	0,03	0,06
	200	0,03	1,0	≤0,125	32	0,25	0,03
	202	0,03	0,25	≤0,125	0,5	0,06	0,125
	205	≤0,015	1,0	≤0,125	0,5	0,125	0,06
	208	≤0,015	1,0	≤0,125	0,5	0,5	0,03

Levedura	Nº Isolado	Micafungina	Anfotericina	5 FC	Fluconazol	Itraconazol	Voriconazol
<i>C. tropicalis</i>	211	≤0,015	1,0	<0,125	0,5	0,125	0,03
	213	≤0,015	0,5	<0,125	1,0	0,125	0,03
	214	≤0,015	1,0	<0,125	1,0	0,25	0,03
	231	0,015	1,0	<0,125	1,0	0,06	≤0,015
	233	0,03	0,25	<0,125	1,0	0,125	0,03
	239	0,015	1,0	<0,125	1,0	0,125	0,03
	241	0,015	0,25	<0,125	0,5	0,125	≤0,015
	243	0,015	2,0	<0,125	0,5	0,06	0,06
	254	≤0,015	0,25	≤0,125	0,25	0,06	0,03
	257	≤0,015	1,0	≤0,125	0,5	0,125	0,03
	274	0,03	1,0	0,25	32	0,25	1,0
	285	0,015	0,25	<0,125	1,0	0,25	0,06
	286	0,03	0,25	≤0,125	8	0,125	0,03
	287	≤0,03	1,0	32	0,5	0,125	0,06
	288	0,015	1,0	≤0,125	1,0	0,125	0,03
	289	≤0,015	0,25	≤0,125	1,0	0,25	0,03
	292	0,03	0,25	<0,125	0,5	0,125	0,03
<i>C. parapsilosis</i>	4	0,25	1,0	≤0,125	0,25	0,06	0,5
<i>C. parapsilosis</i>	11	0,5	0,5	0,25	2,0	0,125	0,25
<i>C. orthopsilosis</i>	12	0,25	1,0	0,125	1,0	0,25	0,06
<i>C. parapsilosis</i>	14	0,5	1,0	≤0,125	0,5	0,03	0,06
<i>C. parapsilosis</i>	15	0,5	0,5	0,125	0,25	0,03	0,06
<i>C. parapsilosis</i>	17	0,5	1,0	≤0,125	0,5	0,06	0,03
<i>C. parapsilosis</i>	22	0,5	0,5	0,125	0,5	0,06	0,03
<i>C. orthopsilosis</i>	29	0,25	1,0	0,25	4,0	0,125	0,03
<i>C. parapsilosis</i>	31	0,125	0,5	≤0,125	0,5	0,06	0,5
<i>C. parapsilosis</i>	34	0,5	0,25	0,125	0,25	0,03	0,125
<i>C. parapsilosis</i>	44	0,25	1,0	≤0,125	0,5	0,06	0,03
<i>C. metapsilosis</i>	48	0,25	1,0	0,125	1,0	0,125	0,03
<i>C. parapsilosis</i>	52	0,25	1,0	≤0,125	4,0	0,125	2
<i>C. parapsilosis</i>	54	0,125	1,0	0,25	0,5	0,06	0,03
<i>C. parapsilosis</i>	70	0,25	1,0	0,125	1,0	0,03	0,06
<i>C. parapsilosis</i>	73	0,5	0,5	≤0,125	1,0	0,03	0,125
<i>C. orthopsilosis</i>	77	0,25	1,0	≤0,125	1,0	0,06	0,06
<i>C. parapsilosis</i>	99	0,500	1,0	0,25	1,0	0,06	0,06
<i>C. parapsilosis</i>	111	0,25	1,0	≤0,125	0,25	0,03	0,03
<i>C. parapsilosis</i>	119	0,125	0,5	0,5	0,25	0,03	0,125
<i>C. parapsilosis</i>	136	0,25	0,5	≤0,125	0,5	0,03	0,06
<i>C. parapsilosis</i>	147	0,25	1,0	<0,125	0,5	0,06	0,125
<i>C. parapsilosis</i>	153	0,5	1,0	<0,125	0,5	0,06	0,06
<i>C. parapsilosis</i>	156	0,25	1,0	≤0,125	0,25	0,015	0,06
<i>C. parapsilosis</i>	160	0,5	1,0	<0,125	0,5	0,06	0,25
<i>C. parapsilosis</i>	173	0,125	0,25	<0,125	1,0	0,03	0,5
<i>C. parapsilosis</i>	179	1,0	1,0	0,125	0,25	0,03	0,06
<i>C. parapsilosis</i>	185	1,0	1,0	0,125	0,25	0,03	0,03
<i>C. parapsilosis</i>	198	0,5	1,0	<0,125	0,5	0,06	0,125
<i>C. orthopsilosis</i>	246	0,25	1,0	≤0,125	1,0	0,25	0,06
<i>C. parapsilosis</i>	263	0,25	0,5	<0,125	0,25	0,03	≤0,015
<i>C. orthopsilosis</i>	265	0,25	0,25	<0,125	0,5	0,06	0,03
<i>C. parapsilosis</i>	266	0,25	0,25	<0,125	0,5	0,03	0,06
<i>C. parapsilosis</i>	267	0,25	0,5	<0,125	0,25	0,03	≤0,015
<i>C. parapsilosis</i>	268	0,5	0,5	<0,125	0,5	0,03	0,03

Levedura	Nº Isolado	Micafungina	Anfotericina	5 FC	Fluconazol	Itraconazol	Voriconazol
<i>C. parapsilosis</i>	269	0,5	0,5	<0,125	2,0	0,125	0,06
<i>C. parapsilosis</i>	270	0,25	0,25	<0,125	0,5	0,03	≤0,015
<i>C. parapsilosis</i>	271	0,5	0,5	<0,125	0,5	0,03	≤0,015
<i>C. parapsilosis</i>	272	0,25	0,25	0,25	0,5	0,06	≤0,015
<i>C. glabrata</i>	8	<0,015	1,0	0,125	2,0	0,5	0,5
	24	<0,015	1,0	<0,125	16	0,25	0,25
	25	<0,015	1,0	<0,125	1,0	0,125	0,06
	30	<0,015	1,0	<0,125	2,0	0,125	0,06
	46	≤0,015	1,0	≤0,125	2,0	0,125	0,06
	53	≤0,015	0,5	≤0,125	2,0	0,125	0,03
	57	≤0,015	0,5	≤0,125	0,5	0,125	0,03
	67	<0,015	1,0	<0,125	8	0,06	0,125
	74	<0,015	1,0	0,25	1,0	0,25	0,03
	76	<0,015	1,0	<0,125	1,0	0,125	0,03
	82	<0,015	0,25	<0,125	16	0,125	0,03
	142	≤0,015	1,0	≤0,125	2	0,125	0,06
	155	<0,015	1,0	<0,125	4,0	0,125	0,125
	170	<0,015	0,5	<0,125	2,0	0,125	0,06
	209	<0,015	2,0	<0,125	8	0,06	0,06
	215	<0,015	0,25	<0,125	32	0,5	0,5
	220	<0,015	1,0	<0,125	>64	4,0	2,0
	223	≤0,015	1,0	≤0,125	0,5	0,125	0,03
	224	<0,015	1,0	<0,125	4,0	0,5	0,125
	227	<0,015	1,0	<0,125	16	0,125	0,06
	228	<0,015	1,0	<0,125	2,0	0,125	0,125
	240	<0,015	0,25	<0,125	1,0	0,125	0,06
	255	<0,015	1,0	<0,125	1,0	0,125	0,06
	260	≤0,015	1,0	<0,125	4,0	0,125	0,06
	273	<0,015	1,0	<0,125	2,0	0,125	0,25
	275	<0,015	1,0	<0,125	1,0	0,125	0,06
	276	<0,015	0,5	<0,125	1,0	0,125	0,03
	277	<0,015	1,0	<0,125	1,0	0,125	0,03
	278	<0,015	1,0	<0,125	1,0	0,125	0,125
	279	<0,015	1,0	<0,125	1,0	0,125	0,06
	280	<0,015	0,5	0,5	0,5	0,06	≤0,015
	281	<0,015	1,0	<0,125	1,0	0,125	0,125
	282	≤0,015	1,0	≤0,125	1,0	0,125	0,03
	283	<0,015	1,0	<0,125	1,0	0,25	0,06
<i>C. krusei</i>	45	0,06	1,0	4,0	16	0,25	0,25
	61	0,06	1,0	4,0	16	0,25	0,25
	78	0,06	1,0	4,0	16	0,25	0,25
	80	0,06	1,0	2,0	32	0,25	0,125
	86	0,06	1,0	4,0	32	0,06	0,25
	89	0,06	1,0	2,0	32	0,5	0,5
	96	0,06	1,0	2,0	32	0,25	0,25
	114	0,06	1,0	4,0	32	0,5	0,5
	148	0,06	1,0	2,0	32	0,25	0,25
	190	0,06	1,0	4,0	32	0,5	0,25
	193	0,06	1,0	4,0	32	0,25	0,5
<i>C. guilliermondii</i>	16	0,125	0,25	<0,125	0,5	0,06	0,03
	79	0,25	0,5	<0,125	0,5	0,25	0,03
	100	0,5	0,5	<0,125	1,0	0,25	0,125

Levedura	Nº Isolado	Micafungina	Anfotericina	5 FC	Fluconazol	Itraconazol	Voriconazol
<i>C. guilliermondii</i>	100	0,5	0,5	<0,125	1,0	0,25	0,125
	219	1,0	0,25	<0,125	1,0	0,125	0,03
	236	0,125	0,25	<0,125	1,0	0,25	0,06
	249	0,5	0,5	<0,125	2,0	0,25	0,125
<i>C. kefyr</i>	154	0,03	0,5	<0,125	1,0	0,125	0,03
	201	≤0,03	0,5	0,5	≤0,125	0,06	≤0,015
	221	≤0,03	0,5	0,5	≤0,125	0,03	≤0,015
	245	0,03	1,0	0,5	0,25	0,03	≤0,015
<i>C. albicans</i>	55	≤0,015	0,5	<0,125	1,0	0,125	0,03
<i>C. haemulonii</i>	71	0,03	1,0	<0,125	4,0	0,125	0,1
<i>C. dubliniensis</i>	176	0,06	0,5	<0,125	1,0	0,125	0,03
<i>C. lipolytica</i>	177	0,25	0,25	2,0	1,0	0,25	0,03
<i>C. rugosa</i>	230	0,015	1,0	1,0	4,0	0,125	0,125

Accurate visual DNA-microarray for the molecular identification of non-*albicans* *Candida* species isolated from candidemia episodes.

Running title: DNA-microarray for identification of *Candida* spp

Michela De Luca Ferrari^{1,5}, Mariangela Ribeiro Resende^{1#}, Katsuhiko Kamei³, Yasunori Muraosa³, Luzia Lyra², Tohru Gono³, Kanae Sakai³, Yuzuru Mikami³, Kenichiro Tominaga⁴, Angelica Zaninelli Schreiber², Plinio Trabasso¹, Maria Luiza Moretti¹

1. Infectious Diseases Division, Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, São Paulo, Brazil; 2. Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, São Paulo, Brazil. 3. Medical Mycology Research Center, Chiba University, Japan. 4. Japan International Cooperation Agency, Japan. 5. PhD Scholarship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation – FAPESP 2010/50958-8)

#Corresponding author: Mariângela Ribeiro Resende. Mailing address:

Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas-UNICAMP. Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, São Paulo, Brazil.

Phone: (55) 19 3521-7451. E mail: mresende@hc.unicamp.br.

Partial results were presented in 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology- Berlin, Germany, 2012.

Abstract

Our study evaluated the performance of slide-based visual DNA-microarray for the identification of non-*albicans Candida* spp. of 167 isolates with primary identification by VITEK 2®. We observed 97.6% agreement between the DNA-microarray and the sequencing results. Our assay demonstrated a good performance for the identification of non-*albicans Candida* spp.

Candida species are the most predominant cause of systemic fungal infections in hospitalized patients and represent the fourth most common microorganism found in blood cultures (1, 2). In a large laboratory-based study conducted in Brazilian hospitals, the incidence of candidemia was found to be 2.49 cases per 1,000 admissions of patients (3), which is higher than that in the United States (0.28/1,000), Europe (0.2/1,000), or France (0.17/1,000) (4-7). In our setting, candidemia incidence was reported as 0.54 cases per 1,000 patient-days with 56% of non-*albicans Candida* spp. (8). An increase in the proportion of non-*albicans albicans Candida* spp. has been observed worldwide with distinctive patterns of antifungal susceptibility (9, 10).

The development of automated microbiology systems has represented a significant improvement in the identification of *Candida* spp. However, their diagnostic accuracies have been reported to range from 43% to 95% (11-20). Considering the magnitude, the high mortality and the susceptibility patterns of non-*albicans* *Candida* spp., novel molecular technologies at the point of care are urgently needed in clinical practice. Our study evaluated the ability of a novel plastic slide-based DNA-microarray to identify non-*albicans* *Candida* spp. isolated from blood cultures.

A retrospective cohort surveillance study was performed, including 167 non-*albicans* *Candida* from bloodstream infections isolated by Mycology Section of Hospital and Clinics of the State University of Campinas, from 2006 to 2010. Bact/ALERT (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), and VITEK 2 system (YST REF 21343 154 card; Lab Equipment bioMérieux, Inc., North Carolina, USA) were utilized for primary detection and identification, respectively. Four ATCC Type strains (*C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC MYA 2950, *C. krusei* ATCC 6258, *C. albicans* ATCC 76615) and *C. dubliniensis*-CBS 7987 were included as control strains.

The novel DNA-microarray platform was developed by MMRC-Chiba, to identify 12 genera and 32 fungus species, including 9 non *albicans* *Candida* spp.: *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. kefyr*, *C. albicans*, *Histoplasma capsulatum*,

Coccidioides posadasii, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus* spp., *Trichosporum cutaneum*, *T. asteroides*, *T. inkin*, *T. asahii*, *T. faecale*, *T. mucoides*, *Malassezia furfur* *Aspergillus nidulans*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Penicillium marneffei*.

For DNA-microarray platform fabrication, the oligonucleotide probes, consisting of 14 to 20 species-specific nucleotide sequences with biotin-labeled poly T anchors at the end of each nucleotide (Invitrogen, Showajima, Japan), were designed based on the ITS sequences (ITS1 and ITS2) of the Type strains [GenBank database, American Type Culture Collection (ATCC), Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) and MMRC-Chiba (IFM)]. Multiple-sequence alignments were performed using the BioEdit software (version 7.1.3. [<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>]). Conserved regions were also used as targets for genus-specific probes or as controls. Each *Candida* spp. contained four to eleven oligonucleotide probe sequences; six probes were designed for common sequences, and two were designed for biotin labeling. The probe sequences were spotted onto a plastic slide (NGK Insulators LTD, Aichi, Japan) using a KCS mini microarray printer (Kubota Comps. Corporation, Amagasaki, Japan).

For fungal identification, PCR using universal fungal primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

(Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) were used to amplify the ITS regions (ITS1 and ITS2) and the 5.8S rRNA gene (21) followed by hybridization, conjugation, coloration and direct visualization of specifically positioned spots on the slide (**Figure 1**). For DNA sequencing, the PCR reactions were performed using the universal fungus-specific primer pair ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') and ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) followed by purification using ExoSAP-IT (Affymetrix |USB, Cleveland, USA) and were then sequenced using the Big Dye® terminator reagent kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) according to the manufacturer's protocols on an ABI PRISM® 3100 Genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA). The sequence data were assembled using ATSQ version 6.0.1 software (Genetix Corporation, Tokyo, Japan). The sequences obtained were then submitted to GenBank.

Of 167 non-*albicans Candida* isolates, the new MMRC-Chiba DNA-microarray identified 163 (97.6%) strains, VITEK 2® identified 161 (96.4%) strains, and DNA sequencing identified all of the strains (**Table 1**). The agreement between the DNA-microarray and the sequencing was 97.6%. The DNA-microarray did not identify the following yeast strains: five *C. orthopsilosis*, one *C. metapsilosis*, one *C. lipolytica*, one *C. rugosa*, one *C. haemulonii*, and one *Dipodascus capitatus*. Of note, the MMRC-Chiba DNA-microarray identified one *C. glabrata*, one *C. guilliermondii*, one *C. albicans*, and one *C. kefyr* that were previously identified as *Candida* spp. or non-*albicans Candida* spp. by VITEK 2®. All 39 of the strains of

Candida from the “*psilosis*” complex were identified as *C. parapsilosis*. The probe sequences for *C. haemulonii*, *C. rugosa*, *C. lipolytica*, and *D. capitatus* were absent from the platform’s composition.

Previous studies have demonstrated that conventional and commercial systems frequently fail to identify the less common species and to discriminate between closely related species (22, 23). Borman et al. (23), showed 18% of misidentification in a large surveillance study. Conversely, Leaw et al. (24) showed high sensitivity and specificity for DNA-microarray platform at 100% and 97%, respectively, in a study including 452 isolates. More recently, studies with blood cultures isolates (18, 25, 26) identified optimal assay parameters (**Table 2**). Fungus identification, using the DNA-microarray approach can reduce the time for diagnostic (25), allows the identification of mixed infections and rare species with direct visualization interpretation (24). Another perspective is fungal species identification, as well as susceptibility pattern directly from blood clinical samples (20). Therefore a multi-pathogen (fungus, virus, and bacteria) DNA-microarray platform has been proposed for syndromic investigation in clinical settings (18, 27).

DNA-microarray for fungal identification should be validated in terms of cost-effectiveness at the point of care comparing to others methodologies, like VITEK2® and the novel Maldi-TOF mass spectrometry (Maldi-TOF MS). The VITEK2® is accurate, useful and friendly in routine laboratories (28). Although Maldi-TOF MS requires expensive equipment it presents low operational costs (29). Studies

addressing these issues should be performed in the near future (30). The MMRC-Chiba DNA-microarray platform demonstrated optimal accuracy for the identification of non-*albicans* *Candida* spp.. The good agreement observed allows the pursuit of the next step, which consists of fungal identification directly from clinical samples. This approach can reduce the turnaround time for cultures and should be evaluated in terms of costs and benefits in the management of patients with a high risk of candidemia.

Acknowledgments: Project Ref. No. 02P-29548-05 was supported by JST (Japan Science and Technology Agency)/JICA (Japan International Cooperation Agency), SATREPS (Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development), the Faculty of Medical Sciences - State University of Campinas-UNICAMP, and the São Paulo Research Foundation (FAPESP).

References

1. **Perlroth, J, Choi B, Spellberg B.** 2007. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis and treatment. *Med. Mycol.* **45**:321–346.
2. **Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB.** 2004. Nosocomial bloodstream infection in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* **39**:309–317.

3. **Colombo, AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, Warnock D, Morgan J.** 2006. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J. Clin. Microbiol.* **44**:2816–2823.
4. **Pittet D, Wenzel, RP.** 1995. Nosocomial bloodstream infections. Secular trends in rates, mortality, and contribution to total hospital deaths. *Arch. Intern. Med.* **155**:1177–1184.
5. **Jarvis WR.** 1995. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida species*. *Clin. Infect. Dis.* **20**:1526–1530.
6. **Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O, Biraghi E, Canton E, Zimmermann K, Seaton S, Grillot R; ECMM Working Group on Candidaemia.** 2004. Epidemiology of candidemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **23**:317–322.
7. **Richet H, Roux P, Des Champs C, Esnault Y, Andreumont A; French Candidemia Study Group.** 2002. Candidemia in French hospitals: incidence rates and characteristics. *Clin. Microbiol. Infect.* **8**:405–412.
8. **Moretti ML, Trabasso P, Lyra L, Fagnani R, Resende MR, Cardoso LGO, Schreiber AZ.** 2012. Is the incidence of candidemia caused by *Candida glabrata* increasing in Brazil? Five-year surveillance of *Candida* bloodstream infection in a university reference hospital in southeast Brazil. *Med. Mycol.* early online, doi: 10.3109/13693786.2012.708107.

9. **Pfaller MA, Diekema DJ.** 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* **20**:133–63.
10. **Montagna MT, Caggiano G, Lovero G, De Giglio O, Coretti C, Cuna T, Iatta R, Giglio M, Dalfino L, Bruno F, Puntillo F.** 2013. Epidemiology of invasive fungal infections in the intensive care unit: results of a multicenter Italian survey (AURORA Project). *Infection.* DOI 10.1007/s15010-013-0432-0.
11. **Meletiadiis J, Arabatzis M, Bompola M, Tsiveriotis K, Hini S, Petinaki E, Velegraki A, Zerva L.** 2011. Comparative evaluation of three commercial identification systems using common and rare bloodstream yeast isolates. *J. Clin. Microbiol.* **49**:2722–2727.
12. **Borst A, Maurine A, Leverstein V, Jan V, Fluit C.** 2001. Detection of *Candida* spp. in blood culture using nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **39**:155–160.
13. **Klan ZU, Mustafa AS.** 2001. Detection of *Candida* species by polymerase chain reaction (PCR) in blood samples of experimentally infected mice and patients with suspected candidemia. *Microbiol. Res.* **156**:95–102.
14. **Ahmad S, Khan Z, Mustafa AB, Khan ZU.** 2002. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection and biochemical methods for species identification. *J. Clin. Microbiol.* **40**:2483–2489.

15. **Moreira-Oliveira MS, Mikami Y, Miyaji M, Imai T, Schreiber AZ, Moretti ML.** 2005. Diagnosis of candidemia by polymerase chain reaction and blood culture: prospective study in a high-risk population and identification of variables associated with development of candidemia. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* **24**:721–726.
16. **Wahyuningsih R, Freisleben HJ, Sonntag HG, Schnitzler P.** 2000. Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3016–3021.
17. **Flahaut M, Sanglard D, Monod M, Bille J, Rossier M.** 1998. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical samples by DNA amplification of common regions from *C. albicans* secreted aspartic proteinase genes. *J. Clin. Microbiol.* **36**:395–401.
18. **Yoo SM, Choi JY, Yun JK, Choi JK, Shin SY, Lee K, Kim JM, Lee SY.** 2010. DNA microarray-based identification of bacterial and fungal pathogens in bloodstream infections. *Mol. Cell. Probes* **24**:44–52.
19. **Huang A, Li JW, Shen ZQ, Wang XW, Jin M.** 2006. High-throughput identification of clinical pathogenic fungi by hybridization to an oligonucleotide microarray. *J. Clin. Microbiol.* **44**:3299–305.
20. **Leinberger DM, Schumacher U, Autenrieth IB, Bachmann TT.** 2005. Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4943–4953.

21. **White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p 315–322. *In* Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (ed), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, CA.
22. **Linton CJ, Borman AM, Cheung G, Holmes AD, Szekely A, Palmer MD, Bridge PD, Campbell CK, Johnson EM.** 2007. Molecular identification of unusual pathogenic yeast isolates by large ribosomal subunit gene sequencing: 2 years experience at the United Kingdom Mycology Reference Laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **45**:1152–1158.
23. **Borman AM, Szekely A, Palmer MD, Johnson EM.** 2012. Assessment of accuracy of identification of pathogenic yeasts in microbiology laboratories in the United kingdom. *J. Clin. Microbiol.* **50**:2639–2644.
24. **Leaw SN, Chang HC, Barton R, Bouchara J- P, Chang TC.** 2007. Identification of medically important *Candida* and non-*Candida* yeast species by an oligonucleotide array. *J. Clin. Microbiol.* **45**:2220–2229.
25. **Farina C, Russello G, Andreoni S, Bonetti C, Conte M, Fazi P, Lombardi G, Luzzaro F, Manso E, Marone P, Passera M, Rocchetti A, Sanna S, Viganò EF.** 2012. Microarray technology for yeast identification directly from positive blood cultures. A multicenter Italian experience. *Med. Mycol.* **50**:549–555.
26. **Hsiue HC, Huang YT, Kuo YL, Liao CH, Chang TC, Hsueh PR.** 2010. Rapid identification of fungal pathogens in positive blood cultures using oligonucleotide array hybridization. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**:493–500.

27. **Lin B, Blaney KM, Malanoski AP, Ligler AG, Schnur JM, Metzgar D, Russell KL, Stenger DA.** 2007. Using a resequencing microarray as a multiple respiratory pathogen detection assay. *J. Clin. Microbiol.* **45**:443–452.
28. **D. Jane Hata, Leslie Hall, Annette W. Fothergill, Davise H. Larone, Nancy L. Wengenack.** 2007. Multicenter Evaluation of the New VITEK 2 Advanced Colorimetric Yeast Identification Card. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 1087–1092.
29. **Posteraro B, De Carolis E, Vella A, Sanguinetti M.** 2013. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. *Expert Rev Proteomics.* **10**:151-164. doi: 10.1586/epr.13.8.
30. **Miller MB, Tang YW.** 2009. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. *J. Clin. Microbiol.* **22**:611–633.
31. **Spiess B, Seifarth W, Hummel M, Frank O, Fabarius A, Zheng C, Mörz H, Hehlmann R, Buchheidt D.** 2007. DNA microarray-based detection and identification of fungal pathogens in clinical samples from neutropenic patients. *J. Clin. Microbiol.* **45**:3743–3753.
32. **Campa D, Tavanti A, Gemignani F, Mogavero CS, Bellini I, Bottari F, Barale R, Landi S, Senesi S.** 2008. DNA microarray based on arrayed-primer extension technique for identification of pathogenic fungi responsible for invasive and superficial mycoses. *J. Clin. Microbiol.* **46**:909–915.
33. **Sato T, Takayanagi A, Nagao K, Tomatsu N, Fukui T, Kawaguchi M, Kudoh J, Amagai M, Yamamoto N, Shimizu N.** 2010. Simple PCR-based DNA-microarray system to identify human pathogenic fungi in skin. *J. Clin. Microbiol.* **48**:2357–2364.

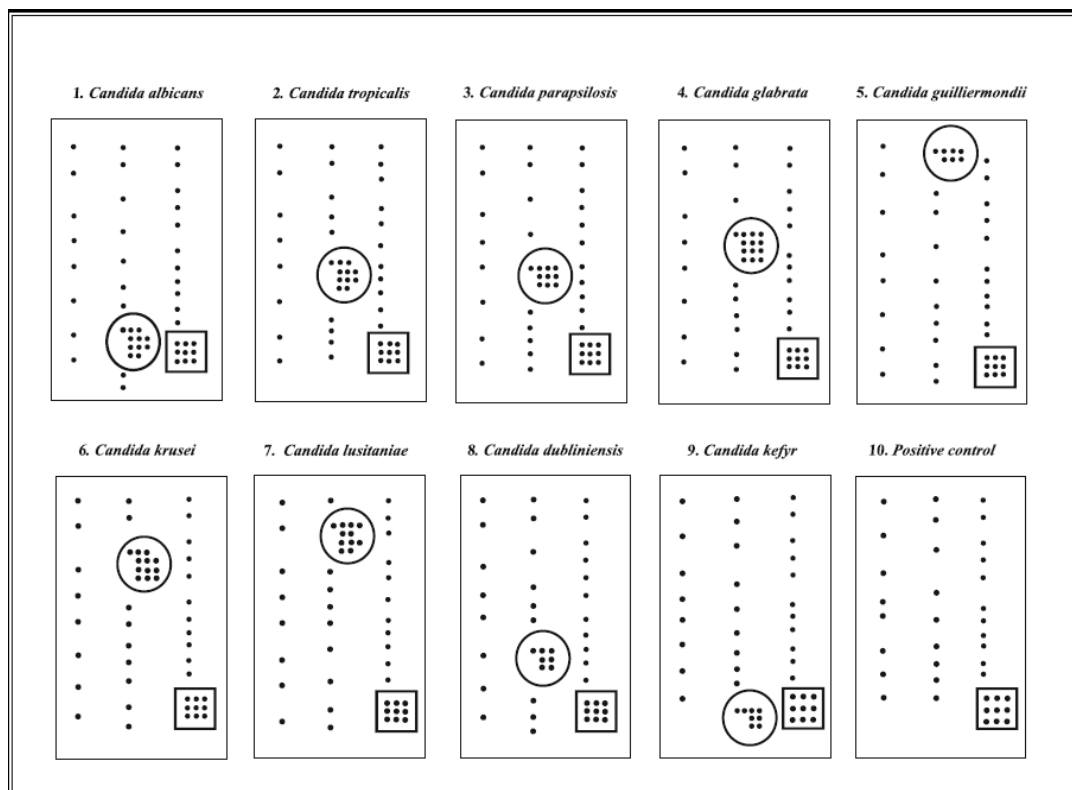


Figure 1. Representative hybridization pattern of *Candida albicans*, non-*albicans Candida* and positive control. Each number represents a slide for a specie-specific, a group of specific hybridization spots are visualized inside the circle and the remaining of spots are representative of biotin hybridization (negative for others species) and the positive control can be visualized inside of the square. The positive control represents a common sequence for fungal species.

Table 1. Molecular identification using the DNA-microarray compared to the DNA sequencing of non-*albicans Candida* yeasts previously identified by Vitek 2®.

Yeasts	VITEK 2®		DNA-microarray		DNA Sequencing		Agreement %
	N	%	N	%	N	%	
<i>C. tropicalis</i>	66	39.5	66	39.5	66	39.5	100
<i>psilosis Complex</i>	39	23.3	39	23.3	39	23.3	100
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	39	23.3	33	19.7	85
<i>C. orthopsilosis</i>	-	-	-	-	5	3.0	--
<i>C. metapsilosis</i>	-	-	-	-	1	0.6	--
<i>C. glabrata</i>	34	20.3	35	20.9	35	20.9	100
<i>C. krusei</i>	11	6.6	11	6.5	11	6.5	100
<i>C. guilliermondii</i>	5	2.9	6	3.5	6	3.5	100
<i>C. kefyr</i>	3	1.8	4	2.4	4	2.4	100
<i>C. dubliniensis</i>	1	0.6	1	0.6	1	0.6	100
<i>C. lipolytica</i>	1	0.6	-	-	1	0.6	--
<i>C. rugosa</i>	1	0.6	-	-	1	0.6	--
<i>C. haemulonii</i>	-	-	-	-	1	0.6	--
<i>D. capitatus</i>	-	-	-	-	1	0.6	--
Not identified	6	3.5	4	2.4	-	-	--

Table 2. A summary of studies of fungal identification using DNA-microarrays.

Reference	DNA-microarray composition (fungal species)	Isolates included	Specimens included	Species of non- <i>albicans Candida</i>	Performance	
					S(%)	SP(%)
Yoo et al., 2010 (18)	7	112	blood	4	93	NR
Huang et al., 2006 (19)	20	122	blood, CSF, skin, secretions	4	100	NR
Leinberger et al., 2005 (20)	12	21	reference strains, clinical isolates*	7	NR	NR
Leaw et al., 2007 (24)	77	452	reference strains, clinical isolates*	44	100	97
Farina et al., 2012 (25)	17	88	blood	13	100	99.8
Hsiue et al., 2010 (26)	76	116	blood	40	100	100
Spiess et al., 2007 (31)	14	91	blood, tissue, BAL	4	NR	NR
Campa et al., 2008 (32)	24	20	blood, urine, others	12	NR	NR
Sato et al., 2010 (33)	26	40	skin	10	92	NR

261 S: sensibility; SP: specificity; BAL: bronchial alveolar lavage; CSF: cerebral spinal fluid; NR: not reported; *Isolation site unspecified.