

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Vanessa da Silva Fay

**Agentes Fúngicos Emergentes e o
Perfil de Resistência de *Candida*
spp. ao Fluconazol Documentados
pelo Laboratório Central do Estado
do Rio Grande do Sul.**

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2016**

Vanessa da Silva Fay

**Agentes Fúngicos Emergentes e o
Perfil de Resistência de *Candida*
spp. ao Fluconazol Documentados
pelo Laboratório Central do Estado
do Rio Grande do Sul.**

Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Patologia da
Fundação Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre
como requisito para a obtenção do
grau de Mestre

Orientador: Dr. Renan Rangel
Bonamigo

Porto Alegre
2016

Agradecimentos

À Deus por me conceder fé na ciência e na pesquisa.

Aos meus pais, Mauro e Marisa, por tudo aquilo que fizeram ao longo de todos esses anos através da compreensão, carinho e na ajuda me oferecendo um futuro digno e promissor.

À meu incansável orientador, Dr. Renan R. Bonamigo pela confiança depositada em meu projeto, a quem tenho imensa admiração e respeito pelo excelente trabalho que executa.

À Stela Maris B. Gonçalves, Chefe da Seção de Micologia do IPB/Lacen por toda a credibilidade e incentivo, desde sempre, quando me “abriu o caminho” na estrada da Micologia.

À Diana M. Rodrigues, minha amiga mãezona pelo seu carinho, suporte e esperança depositados em mim e no meu trabalho. Por todas as horas que passou comigo na bancada diariamente dividindo o seu conhecimento.

À Juliana Ferraz de Correa, minha mais que colega, amiga Iluminada por toda a batalha, carinho e horas de trabalho juntas para que esse trabalho se completasse.

À Zenaida Marion Alves Nunes, Chefe da Seção de Virologia do IPB/Lacen por toda sua compreensão durante a realização do meu trabalho.

À toda a Seção de Preparo de Reagentes do IPB/Lacen e a Seção de Bacteriologia pelo suporte maravilhoso oferecido ao trabalho.

Ao Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do IPB/Lacen pelo suporte financeiro.

À Marlisa Siegas Freitas, Bioquímica do Ambulatório de Dermatologia Sanitária pelo auxílio nas coletas.

À Sílvia Dias de Oliveira, Professora do curso de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul pela ajuda e por me receber tão gentilmente em seu laboratório.

Às colegas queridas que conheci durante a realização do mestrado, em especial à Francine Rahmeier que sempre me estendeu a mão, literalmente, desde o nosso primeiro encontro.

Ao PPG Patologia da UFCSPA, incluindo os Professores pelo apoio e aprendizagem.

Enfim, a todos os colegas de trabalho, estagiários, amigos e laços de afeto que de alguma maneira contribuíram para a concretização deste trabalho, deixo os meus mais afetuosos agradecimentos.

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Conceitos e aspectos gerais sobre infecções fúngicas	1
1.2. <i>Candida</i> spp.	3
1.3. Outros fungos emergentes	5
1.4. Mecanismos de ação e resistência aos antifúngicos	10
1.5. Testes de sensibilidade aos antifúngicos	18
1.6. Vigilância e controle das infecções	24
1.7. Referências bibliográficas	29
2. Objetivos	43
2.1. Geral	43
2.2. Específico	43
3. Artigo científico redigido em inglês	44
4. Considerações finais	63
5. Anexos	64

Lista de abreviaturas utilizadas

°C: graus Celsius

µg: micrograma

A. fumigatus: *Aspergillus fumigatus*

A. ustus: *Aspergillus ustus*

AB: anfotericina B

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Acquired Immunodeficiency Disease Syndrome)

C. albicans: *Candida albicans*

C. colliculosa: *Candida colliculosa*

C. dubliniensis: *Candida dubliniensis*

C. gattii: *Criptococcus gattii*

C. glabrata: *Candida glabrata*

C. guilliermondii: *Candida guilliermondii*

C. krusei: *Candida krusei*

C. neoformans: *Criptococcus neoformans*

C. parapsilosis: *Candida parapsilosis*

C. tropicalis: *Candida tropicalis*

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CIM: concentração inibitória mínima

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

cm: centímetro

DD: disco-difusão

EUA: Estados Unidos da América

FLU: fluconazol

g: grama

HIV- : Vírus da Imunodeficiência Humana negativo

HIV+: Vírus da Imunodeficiência Humana positivo

I*: intermediário

IPB/Lacen: Instituto de Pesquisas Biológicas/ Laboratório Central

LBA: lavado broncoalveolar

LCR: líquido cefalorraquidiano

mg: miligrama

mL: mililitro

mm: milímetro

pH: potencial hidrogeniônico

R*: resistente

S*: sensível

SDD: sensível dose-dependente

SIDA: Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

SNC: sistema nervoso central

spp.: espécies

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

T. asahii: *Trichosporon asahii*

T. spp.: espécies de *Trichosporon*

UTI: unidade de tratamento intensivo

var. gattii: variedade *gattii*

Resumo da Dissertação

Introdução:

O número de casos de infecções fúngicas invasivas aumentou consideravelmente nos últimos anos, devido ao grande número de indivíduos imunocomprometidos.

Objetivos:

Avaliar os fatores associados às infecções fúngicas emergentes diagnosticadas no Laboratório Central do Rio Grande do Sul e da susceptibilidade de *Candida* spp. ao fluconazol.

Material e Métodos:

A confirmação das espécies foi realizada de acordo com sua morfologia microscópica, em meio ágar cromogênico e por testes bioquímicos. Os testes de suscetibilidade *in vitro* seguiram o protocolo CLSI/M44-A2. Posteriormente as variáveis categóricas foram comparadas pelo teste Chi-quadrado. As variáveis contínuas foram comparadas pelo teste ANOVA. Os valores de ($P < 0,05$) foram considerados como sendo estatisticamente significativo. As análises foram realizadas utilizando o software SPSS.

Resultados:

840 casos foram reportados e 51 isolados clínicos de leveduras foram testados. A principal levedura isolada foi *Candida albicans* 486 (57,7%) seguido por *Cryptococcus neoformans* 332 (39,4%). As mulheres foram mais afetadas pelo gênero *Candida* spp. (n= 564), e os homens tiveram mais acometimentos por *Cryptococcus neoformans* (n=237). Os indivíduos que possuíam cultura positiva para o gênero *Cryptococcus neoformans*, 124 eram HIV+. As micoses superficiais somam 390 (46,3%) dos apontamentos e as sistêmicas 450 (53,4%), a região Metropolitana do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, foi

responsável por 610 (72,4%) das notificações, com maior índice de casos HIV+.

Conclusão:

O conhecimento a cerca desses patógenos, bem como o seu perfil de susceptibilidade, se faz necessário como medida de saúde pública para esse importante agravo.

Palavras-chave: Fungos emergentes; teste de susceptibilidade; fatores associados às etiologias fúngicas emergentes.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Conceitos e aspectos gerais sobre infecções fúngicas

Os fungos são amplamente encontrados na natureza e possuem graus variados de patogenicidade, podendo acarretar doenças em humanos. As infecções fúngicas variam de superficiais a invasivas (estas são consideradas potencialmente fatais, particularmente em pacientes imunocomprometidos) e constituem em um problema crescente na prática clínica e na saúde humana mundial (Antas *et al.*, 2012; Brown *et al.*, 2012).

Conforme as estimativas do Fundo Global de Ações para Infecções Fúngicas (GAFFI) anualmente mais de 300 milhões de indivíduos de todas as faixas etárias são acometidos por infecções fúngicas graves, totalizando em mais de 1.350.000 óbitos em todo o mundo (Denning, 2015).

Entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento das infecções fúngicas estão os que alteram o *status* imunológico do paciente, em particular: neutropenias, *diabetes mellitus*, infecção pelo HIV, doenças auto-imunes, neoplasias, receptores de transplantes, presença de próteses, presença de cateteres intravasculares de longa permanência e o uso prolongado de antibióticos (Colombo *et al.*, 2006; De Pauw e Picazo, 2008; Gooley *et al.*, 2010; Pfaller e Diekema, 2010; Eggimann *et al.*, 2011).

As infecções fúngicas invasivas têm aumentado em prevalência nas últimas décadas e sua incidência varia de acordo com as condições socio-econômicas, regiões geográficas, hábitos culturais, mudanças e adaptações dos microrganismos (Kett *et al.*, 2011).

Mesmo nas sociedades economicamente fortes, as infecções são frequentemente citadas como importantes na epidemiologia nosológica. Por exemplo, nos Estados Unidos da América (EUA) as infecções representam 25% dos motivos para a procura por assistência médica e representam a terceira causa de morte. (Luna, 2002; Pedroso e Rocha, 2009; Giacomazzi *et al.*, 2015).

O Center for Disease Control and Prevention (CDC, EUA) promoveu um inquérito populacional nos EUA, entre 2008 e 2011, encontrando uma incidência anual média de candidemia de 13,3/100.000 habitantes em Atlanta e de 26,2/100.000 em Baltimore. O percentual mais elevado foi em adultos com idades entre 65 anos ou mais. Achados similares foram observados na Dinamarca (8,6/100.000 habitantes com as maiores taxas nos extremos de idade). Similarmente, um grande contingente de internações por candidemia (6,5/1.000) foi recentemente relatado, em um estudo multicêntrico conduzido na Índia (Arendrup *et al.*, 2011; Cleveland *et al.*, 2012; Chakrabarti *et al.*, 2015).

De acordo com Barreto e Carmo (2007), o Brasil passou por marcantes transformações na sua estrutura populacional e no padrão de morbimortalidade no século XX; porém persistem desigualdades regionais quanto à economia e às situações de pobreza extrema. E a emergência de doenças infecciosas é facilitada nesta conjuntura.

A etiologia das infecções fúngicas sistêmicas podem ser classificadas em dois grupos: as micoses endêmicas ocasionadas por verdadeiros fungos patogênicos e as infecções por fungos oportunistas devido a uma vasta gama de fungos saprófitas. Historicamente, algumas espécies são descritas como agentes etiológicos de infecções fúngicas humanas como *Candida albicans*,

Cryptococcus neoformans, *Aspergillus fumigatus*, e *Histoplasma capsulatum* (Chakrabarti e Shivaprakash, 2005; Pagano *et al.*, 2011; Herbrecht *et al.*, 2012; Köhler *et al.*, 2014;).

Contudo, nos últimos anos, verifica-se que outras espécies de fungos apontadas até o momento como habituais saprófitas, também são capazes de acometer humanos com graves infecções. Estes fungos são denominados de “patógenos emergentes” (Miceli *et al.*, 2011; Chitasombata *et. al*, 2012). Já o termo “infecções emergentes” foi postulado por Morse (1995), referindo-se como as infecções de recente reconhecimento, com alta incidência e ampla distribuição geográfica na população.

1.2. *Candida* spp.

Candida spp. são leveduras que possuem a forma de micélio e pseudohifa, mantendo na maioria das vezes a morfologia de pseudohifas exibindo a característica de pseudomicélio em certos ambientes nutricionais. É natural da flora microbiológica dos humanos, comensais do trato gastrointestinal e geniturinário de indivíduos saudáveis. Todavia, as espécies do gênero *Candida* são vistas como oportunistas, pois possuem sua patogenicidade fortemente ligada a insuficientes mecanismos de defesa do hospedeiro (Eggimann *et al.*, 2003; Pfaller e Diekema, 2007).

A *Candida albicans* é encontrada também no ambiente, particularmente em superfícies. Com a propriedade de formar biofilmes, uma característica notável que lhe confere facilidade em se adaptar a diferentes habitats, atributos

estes que influenciam grandemente sua disseminação e lhe conferem fatores de virulência (Kumar *et al.*, 2016).

As candidíases são consideradas mundialmente como as mais importantes e as principais fontes de infecções fúngicas em indivíduos hospitalizados (Drgona *et al.*, 2014). São classificadas como cutâneo-mucosas e/ou invasivas (hematogênicas) (Boff *et al.*, 2008; Papas *et al.*, 2009; Kullberg e Arendrup, 2016).

Estudos sobre a epidemiologia das candidíases estão descritos no Hemisfério Norte (principalmente nos EUA), Europa Ocidental, Ásia e na América Latina (em menor incidência) (Poinkonen *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; Chalmers *et al.*, 2011; Wisplinghoff *et al.*, 2014; Godoy *et al.*, 2003; Cuenca-Estrela *et al.*, 2009; Nucci *et al.*, 2013; Bustamante *et al.*, 2014; Cortés *et al.*, 2014).

Segundo Pfaller e cols. (2010), a *Candida albicans* é mais frequente na América Latina, acompanhada por *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis sensu lato* e *Candida glabrata*. Ainda que *C. albicans* seja considerada como o principal agente responsável por agravos fúngicos em humanos (Pfaller *et al.*, 2007), houve um aumento de notificações de quadros infecciosos por espécies ditas *não-albicans*, em anos recentes. Entre as *C. não-albicans* se destacam: *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae* e *Candida guilliermondii* (Pfaller *et al.*, 2014).

Examinando a prevalência e o risco de infecções nosocomiais por *Candida* spp. em hospital terciário no Rio Grande do Sul, Aquino e cols. (2005), verificaram que *C. albicans* foi a espécie mais prevalente, embora as espécies *não-albicans* tenham predominado.

Ainda dentre as não-*albicans*, a *Candida auris* vem emergindo como um patógeno responsável por infecções invasivas com alta letalidade, apresentando resistência a vários antifúngicos. A descoberta de *C. auris* suscita preocupações para a saúde pública. O seu primeiro relato foi descrito no Japão em 2009; desde então, foram notificados relatos de infecções em vários países como: Colômbia, Índia, Israel, Quênia, Kuwait, Paquistão, África do Sul, Coreia do Sul, Venezuela e Reino Unido (Sato *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011; Chowdhary *et al.*, 2013; Emara *et al.*, 2014; Magobo *et al.*, 2014; Borman *et al.*, 2016; Calvo *et al.*, 2016).

Recentemente (agosto de 2016), sete novos casos foram notificados ao CDC (EUA), quatro evoluíram ao óbito. Esses dados apontam a necessidade de atenção à infecção e medidas de controle à propagação (Vallabhaneni *et al.*, 2016).

1.3. Outros fungos emergentes

Kodamaea ohmeri é uma levedura de baixa incidência que no passado foi considerada um contaminante, hoje é reconhecida como um patógeno oportunista emergente que pode causar infecções em pacientes com condições subjacentes especiais, incluindo a prematuridade, imunossupressão e hospitalizações prolongadas (Sweih *et al.*, 2011; Chakrabarti *et al.*, 2014).

Há outras leveduras não fermentadoras que também são ponderadas pela literatura como emergentes, como pertencentes dos gêneros *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Geotrichum* (Girmenea *et al.*, 2005; Pak *et al.*, 2009; Arendrup *et al.*, 2014; Cornely *et al.*, 2014).

As leveduras do gênero *Rhodotorula* por acometerem pacientes imunodeprimidos com infecções disseminadas e pela sua capacidade de formar biofilmes são intimamente relacionadas à *Candida* spp., nesse contexto, são declaradas agentes oportunistas associadas a infecções emergentes. (Pasqualotto *et al.*, 2005; Miceli e Lee, 2011; Ramos *et al.*, 2012, Arendrup *et al.*, 2014).

Cryptococcus neoformans é um basidiomiceto cosmopolita, que se apresenta na forma tecidual como levedura encapsulada correspondendo a duas variedades fúngicas, com quatro sorotipos: *Cryptococcus var. neoformans* (sorotipos A e D) e *var. gattii* (sorotipos B e C). A criptococose é uma infecção que afeta frequentemente os pulmões e o sistema nervoso central, em imunodeprimidos (Romeo *et al.*, 2012; Hagen *et al.* 2015). Em relação a estes, embora a ampla disponibilidade de terapia antirretroviral tenha auxiliado na restauração do sistema imunológico de indivíduos com HIV, a meningite criptocócica é ainda um grande problema, principalmente em países com recursos limitados, onde o índice de prevalência do HIV é alto e o acesso aos cuidados de saúde é limitado. (Park *et al.*, 2009).

Trichosporon spp. são basidiomicetos anamórficos amplamente distribuídas na natureza, podendo colonizar diferentes partes do corpo humano, incluindo o trato gastrointestinal, o trato respiratório, a cavidade oral e a pele e ocasionando infecções profundas (sem acometimento de mucosa) ou superficiais. (Girmenia *et al.*, 2005; Colombo *et al.*, 2011).

Em 2009, Chagas-Neto e cols. realizaram um estudo brasileiro sobre fungemia por tricosporonoses em pacientes portadores de doenças degenerativas, em falência de órgãos, submetidos a tratamento com

antibióticos de amplo espectro e/ou a vários procedimentos médicos invasivos. As taxas de mortalidade foram de 30% para crianças e 87,5% para os adultos. Os autores afirmaram que, embora rotineiramente essas cepas sejam isoladas, elas estão relacionadas principalmente a episódios de colonização ou infecções superficiais; reconhecendo-se, portanto, este fungo como um agente emergente oportunista.

As espécies de *Geotrichum* são leveduras muito semelhantes ao *Trichosporon*, por serem encontradas amplamente no meio ambiente (solo, água, plantas) e como um colonizador humano. Mesmo sendo raras, as infecções fúngicas invasivas causadas por *Geotrichum* também acometem os imunodeprimidos (Girmenia *et al.*, 2003).

O grupo de fungos filamentosos hialinos septados, os hialo-hifomicetos são saprófitas do solo e de organismos em decomposição e são definidos como oportunistas frente ao *status* imunitário debilitado dos indivíduos.

Dentre os responsáveis por hialo-hifomicoses mais comumente isolados estão o *Fusarium* spp. e o *Paecilomyces* spp.. O gênero *Fusarium* possui ampla distribuição na natureza e sua principal forma de acesso ao organismo ocorre pelas vias aéreas, além da possibilidade de transmissão através do tegumento cutâneo-mucoso não íntegro. Devido ao seu potencial de ameaça à saúde humana e animal esse gênero incide majoritariamente em pacientes imunodeprimidos, apresentando alta letalidade em indivíduos neutrôpenicos com a doença disseminada (Nucci *et al.*, 2003; Nucci *et al.*, 2004; Campo *et al.*, 2010).

Embora sendo incomum, *Paecilomyces lilacinus* ocasionalmente pode atuar especialmente em imunocomprometidos como um agente patogênico. A

infecção humana mais comum causada por *P. lilacinus* são infecções cutâneas. Tipicamente as infecções causadas por este organismo são muito difíceis de tratar, uma vez que demonstra resistência a muitos antifúngicos (Pastor e Guarro, 2006; Luangra-Ard *et al.*, 2011).

Também pertencente ao grupo dos hialo-hifomicetos, o gênero *Aspergillus* possui ampla distribuição na natureza e é reconhecido como oportunista. A aspergilose pulmonar invasiva é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes imunodeprimidos, incluindo aqueles que receberam quimioterapia agressiva ou drogas imunossupressoras (Chandrasekar, 2010; Dimopoulos *et al.*, 2012; Barton, 2013).

Com base na interação entre *Aspergillus fumigatus* e a resposta imune do hospedeiro com infecção pulmonar, estudos como os de Sales-Campos e cols.(2013), elucidaram que os fatores de virulência multifatoriais de *A. fumigatus* estão relacionados com as características biológicas do fungo, pela imunidade inata do hospedeiro, seguido pela ativação de imunidade adquirida; destacando-se a importância das questões imunológicas para compreensão e o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para a aspergilose pulmonar invasiva.

Análogo à categoria dos fungos filamentosos, o gênero *Scedosporium* é frequentemente encontrado em climas tropicais dispersos na natureza. Suas duas espécies de importância médica, o *Scedosporium apiospermum* (forma assexuada de *Pseudallescheria boydi*) e o *Scedosporium prolificans*, são consideradas como patógenos oportunistas emergentes. Sua via de acesso ao organismo é mediante a colonização transitória do trato respiratório, acometendo hospedeiros imunocomprometidos com infecções no tecido

cutâneo/subcutâneo e infecções disseminadas. (Guarro *et al.*, 2006; Cortez *et al.*, 2008).

Em um estudo de caso relatado por Bonamigo e cols. (2007), o *Scedosporium apiospermum* foi isolado em úlcera de perna em paciente agricultor, idoso, diabético, portador de artrite reumatóide e que fazia uso de imunossupressores. Tal relato confirma a alegada associação desse fungo com fatores que modificam o sistema imune do hospedeiro, sendo um verdadeiro agente oportunista (Chaveiro *et al.*, 2003).

Diante do exposto, o estudo da ecoepidemiologia desses organismos se faz necessário para a identificação dos fatores de risco para as doenças, contribuindo com a formulação de medidas de prevenção na tentativa de conter novos agravos.

Prevenção, diagnóstico precoce e profilaxia adequada são medidas necessárias para melhorar o prognóstico dos pacientes afetados (Nucci e cols., 2010).

1.4. Mecanismos de ação e resistência aos antifúngicos

Os agentes antifúngicos podem ser classificados em quatro categorias principais, conforme seu espectro de ação. As pirimidinas podem interferir com a síntese de lanosterol; os poliênicos atuam na parede celular; as equinocandinas inibem a síntese de glucana da parede celular e os azólicos; interferem na síntese do ergosterol de diversos fungos patogênicos (LOO, 2006; Eggimann, 2007).

A anfotericina B e suas preparações lipídicas, bem como os derivados triazólicos (o itraconazol, o fluconazol, o voriconazol, posaconazol e ravuconazol) e as equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina) são os fármacos mais empregados na era da quimioterapia antifúngica sistêmica (Anaissie, 2008; Mensa *et al.*, 2008; Cornely *et al.*, 2009).

A flucitosina (5-fluorocitosina) descoberta em 1957 é uma pirimidina fluorada sintética que apresenta efeitos fungistáticos e fungicidas sobre diversos fungos, como *Cryptococcus neoformans*, *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. Logo após a sua administração oral transforma-se, no interior da célula fúngica, em 5-fluoruracil e após em 5-fluordesoxiuridina. Esse último comporta-se como um antimetabólito que interfere na biossíntese dos ácidos nucléicos e nucleotídeos vitais para o crescimento do fungo (Saag, *et al.*, 2000).

Os poliênicos pertencem a uma classe de antifúngicos naturais isolados a partir de cepas de *Streptomyces nodosus*, um actinomiceto oriundo do solo. O principal representante desse grupo é a anfotericina B, que passou a ser industrializada em 1958. (Dismukes, 2000; Sanglard, 2002).

A anfotericina B possui sua atividade fungicida em decorrência da ligação irreversível ao ergosterol da membrana celular dos organismos susceptíveis, formando complexos que se intercalam junto à membrana celular. Essa interação resulta na formação de poros ou canais pelos quais ocorrem perdas de íons e substâncias carbonadas que levam à morte celular (Saliba e Dupont, 2008). Seu espectro de ação inclui todas as espécies de *Candida*, algumas espécies de *Aspergillus*, *Blastomyces dermatitidis*, entre outros fungos (Ernst *et al.*, 2000).

Embora a anfotericina B em sua apresentação tradicional (desoxicolato), tenha se tornado o tratamento padrão para infecções fúngicas graves, há efeitos adversos relacionados à nefrotoxicidade sistêmica e local. A disfunção renal é o mais importante efeito tóxico e ocorre na grande maioria dos pacientes, o que ocasionou por parte dos pesquisadores a busca contínua por alternativas menos tóxicas, como as com formulações lipídicas (anfotericina B lipossomal, anfotericina B em complexo lipídico, anfotericina B em dispersão coloidal, anfotericina B intralipídica e o conjugado de anfotericina B) (Lewis, 2011; Anderson *et al.*, 2014).

Os azólicos constituem um grupo de antifúngicos sintéticos, sua primeira classe foi desenvolvida na década de 70 (Brown *et al.*, 2012). Com o maior número de derivados e grande diversidade de espectros de ação, potência e toxicidade, os derivados azólicos exercem atividade fungistática através biossíntese do ergosterol na membrana fúngica, devido à inibição da enzima lanosterol 14 α -demetilase dependente do citocromo P 450, o que impede a conversão do lanosterol em ergosterol aumentando a permeabilidade e progressiva instabilidade celular (Sanglard, 2002).

As equinocandinas são lipopeptídeos semi-sintéticos, introduzidas na clínica a partir do ano 2000, tem sua ação antifúngica através da inibição da síntese de beta-1,3-D-glicano (enzima codificada por três genes relacionados *FKS1*, *FKS2* e *FKS3*), ocasionando danos à parede da célula fúngica (Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2010). No entanto, equinocandinas ainda não têm atividade contra algumas leveduras oportunistas comuns, espécies de *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Scedosporium*, e a ordem Mucorales (Maertens, 2004).

Durante a última década devido à vulnerabilidade perante fungos patogênicos, novas drogas antifúngicas ativas foram desenvolvidas como os triazóis mais novos (isavuconazol, ravuconazol e albuconazol) e as novas equinocandinas (Aminocandina) (Pasqualotto e Denning, 2008; Shapiro *et al.*, 2011).

Considerando as especificidades do uso correto de antifúngicos, alguns elementos devem ser evidenciados na decisão terapêutica: o objetivo do tratamento, profilaxia de preferência empírica e definitiva, a epidemiologia local e as propriedades específicas do fármaco (espectro antifúngico, a eficácia, toxicidade, propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas e o custo) (Dimopoulos e cols., 2013).

A resistência antifúngica está se tornando um problema emergente e tem sido ilustrada por diversos autores como consequência da crescente incidência das infecções fúngicas invasivas e o surgimento de novas espécies de fungos patogênicos ao longo das últimas duas décadas. Os primeiros relatos de resistência ocorreram em pacientes com candidíase mucocutânea crônica tratados com cetoconazol por longos períodos de tempo (Godoy *et al.*, 2003; Novoix *et al.*, 2012; Gross *et al.*, 2015).

A resistência aos antimicrobianos pode ser estabelecida pela condição microbiológica e clínica. A microbiológica refere-se à limitada susceptibilidade de um organismo ao um fármaco por testes *in vitro*, onde a concentração inibitória mínima (CIM) da droga excede o ponto estabelecido de corte estabelecido para aquele organismo (Turnidge e Paterson 2007; Cuenca-Estrela *et al.*, 2008).

Essa por sua vez, pode abranger a resistência primária (ou intrínseca) que está presente em um organismo sem exposição prévia ao fármaco e a secundária (ou adquirida), que é aquela adquirida após a exposição a essas substâncias e que geralmente depende de uma alteração na expressão de genes (Kanafani e Perfect, 2008; Cornely *et al.*, 2012).

A *C. krusei*, por exemplo, é intrinsecamente resistente ao fluconazol enquanto que a *C. parapsilosis* e o *C. neoformans* são intrinsecamente resistentes a equinocandinas. A resistência secundária à anfotericina B é descrita em *C. tropicalis* e *C. lusitane* (Ellis, 2002; Ullmann *et al.*, 2012).

A resistência clínica é elucidada como a recidiva de uma infecção, mesmo após a administração de um fármaco que tenha apresentado um baixo valor de CIM para o microrganismo testado *in vitro* (Tobudic *et al.*, 2012). Biodisponibilidade dos fármacos, fatores relacionados aos patógenos, bem como a condição imunitária do paciente são alguns elementos relacionados a esse tipo de resistência (Havlickova *et al.*, 2008).

A resistência aos azólicos é ressaltada por diversos autores, os quais detectaram um aumento global em sua incidência de forma alarmante. Nesse contexto, o uso contínuo dos azólicos modificou a distribuição e promoveu uma transformação fúngica direcionando cepas menos sensíveis, como as espécies de *Aspergillus*, *Candida* spp., Mucorales, e *Fusarium* (Pfaller *et al.*, 2004; Hope *et al.*, 2005; Diekema *et al.*, 2012).

Aspergillus spp. é menos susceptível ao fluconazol, porém é mais sensível aos triazóis altamente ativos como o voriconazol. No entanto, tem sido observada resistência adquirida a triazóis altamente ativos por *Aspergillus ustus* e *Aspergillus fumigatus* (Balajee *et al.*, 2004; Pavie *et al.*, 2005).

Mecanismos de resistência a triazóis em *Aspergillus* spp. foram descritos através da identificação e do sequenciamento de dois genes esteróis desmetilase diferentes (*CYP51A* e *CYP51B*), especialistas em *A. fumigatus* descreveram as mutações no *CYP51A* como responsáveis pela resistência *in vitro* aos azólicos (Diaz *et al.*, 2003; Mellado *et al.*, 2004).

C. albicans apresenta baixa frequência de resistência frente à equinocandinas (< 2-3 %), conforme a maioria das outras espécies de *Candida*, porém *C. glabrata* vem demonstrando uma tendência ao aumento da resistência para essa droga, o que representa um sério desafio clínico (Castanheira *et al.*, 2009; Pfaller *et al.*, 2011).

Dados da vigilância do CDC apontam que a proporção de cepas de *Candida* resistentes ao fluconazol permanece relativamente constante ao longo dos últimos vinte anos. Contudo, a resistência em equinocandinas parece estar em ascensão, especialmente em *C. glabrata*. O CDC informa que até 8% das cepas isoladas em 2014 podem não ser suscetíveis a equinocandinas, o que seria muito importante para a saúde pública. É imperioso recordar que o uso racional dos antifúngicos é uma ação fundamental para esse contexto (CDC, 2013; Vallabhaneni *et al.*, 2015).

De maneira geral, podemos dizer que os mecanismos de resistência aos antifúngicos envolvem uma absorção reduzida aos fármacos, à modificação do alvo da droga, e/ou uma redução no nível celular das drogas devido à sobre-regulação das bombas de efluxo e a formação de biofilmes que restringem a entrada das drogas. Os fungos aprimoraram uma série de características de regulação gênica que também induzem ou promovem mecanismos de resistência específicos (Perlin *et al.*, 2015).

Foi observado em cepas resistentes de *Candida* um sistema de transporte em suas membranas responsável pela remoção de drogas do interior de suas células formado por bombas de efluxo. Outra característica que contribui para a sua resistência frente a compostos azólicos, os quais têm como principal alvo a enzima lanosterol 14 α -demethylase codificado por *ERG11* para leveduras e *CYP51* em fungos filamentosos, são as mutações pontuais nesses genes bem como a sua supressão (Ge *et al.*, 2005, Vandeputte *et al.*, 2005).

Mutações que conduzam a substituição de aminoácidos podem causar alterações na afinidade das enzimas para os derivados azólicos. Assim, grande esforço tem sido feito para desenvolver métodos rápidos e confiáveis para detectar estirpes que carregam mutações, a maioria destes métodos envolvem processos de bases genéticas e moleculares (Zhao *et al.*, 2013).

A resistência aos poliênicos está primariamente relacionada a alterações qualitativas e quantitativas dos lipídios (ergosterol) da membrana celular fúngica. Os mecanismos bioquímicos de resistência incluem a diminuição do conteúdo de ergosterol, relativo a transformações na composição fenotípica como modificações na biossíntese de proteínas e enzimas (Barker e Rogers, 2006).

Esses eventos têm sido associados com mutações nos genes *erg2*, *erg3* e *erg11* (Balkins *et al.*, 2002; Blum *et al.*, 2008; Hull *et al.*, 2012). A resistência em anfotericina B é um fenômeno incomum em *Candida* spp. (<1,3%) e *Aspergillus* spp., embora haja uma proporção de *A. terreus* e *A. flavus* com valores de CIM mais elevadas (Lass-Flörl, 2009).

As anomalias cromossômicas foram reconhecidas como fontes de resistência a azóis em *C. albicans* e outras espécies de *Candida*. Essas anomalias estão associadas com uma variedade de alterações genômicas em grande escala, incluindo a perda de heterozigotia envolvendo regiões genômicas específicas, o aumento do número de cópias cromossômicas e aneuploidias (Coste *et al.*, 2007; Selmecki *et al.*, 2010).

Um estudo realizado por Yang e colaboradores (2013), em 57 estirpes de *C. albicans* revelou que a monossomia de agrupamentos C5 eleva a quantidade de quitina da parede celular e diminui os níveis de 1,3- β -glucanos, contribuindo para a diminuição da susceptibilidade à caspofungina e ao aumento da susceptibilidade ao fluconazol e a anfotericina B. A monossomia do agrupamento C5 representa para a *C. albicans* uma estratégia regulatória nas vias de resposta ao stress.

Ainda dentro dos fatores que conferem resistência, podemos citar o estresse adaptativo às drogas antifúngicas. Os fungos são extremamente adaptáveis e têm numerosos mecanismos genéticos que os ajudam a se proteger contra tensões celulares, tais como aquelas encontradas após a exposição a um agente antifúngico. Estas respostas de adaptação ao estresse frequentemente resultam em elevadas CIMs *in vitro* (Cowen, 2009).

Estudos recentes para determinar as assinaturas genéticas evolutivas da resistência foram realizados sobre o sequenciamento do genoma total de *C. glabrata*, antes e depois do tratamento com caspofungina. Tal trabalho apresentou como resultado mutações nos genes *MOH1*, *GPH1*, *CDC6* e *TCB1/2*. Essas mutações se apresentaram de forma independente

demonstrando ter um papel na susceptibilidade às equinocandinas (Singh-Babak *et al.*, 2012).

É possível concluir que os fungos desenvolveram por meio de processos evolutivos dispositivos para responder ao estresse de uma forma altamente dinâmica, direcionando-se a partir de mutações pontuais específicas para as principais modificações cromossômicas que influenciam direta e indiretamente a indução de instrumentos de resistência específicos. O que somente não leva à falha clínica, mas em última instância pode levar ao desenvolvimento de resistência a nível superior concomitante a resposta clínica reduzida (Perlin *et al.*, 2015).

Finalmente, à medida que novas tecnologias de caracterização moleculares forem desenvolvidas, haverá uma oportunidade de se detectar a resistência mais precocemente e desenvolver estratégias terapêuticas para evitar ou mitigar a resistência (Alcazar-Fuoli e Mellado, 2014).

1.5. Testes de sensibilidade aos antifúngicos

O alto índice de acometimentos por infecções fúngicas, a pandemia do HIV, a oferta de novos fármacos, a emergência de cepas resistentes exigiu o desenvolvimento de técnicas que avaliassem a susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos. Usualmente, os testes de sensibilidade incluem as técnicas de diluição em caldo e difusão em ágar (Gadea *et al.*, 2007; Richardson e Lass-Flörl, 2008; Bitar *et al.*, 2014).

Em regra, um inóculo definido do microrganismo é exposto a conhecidas concentrações do antifúngico a ser testado, sob condições que nada ou pouco interfiram com a ação da droga, e sua leitura final permite identificar a menor

concentração do fármaco capaz de inibir o crescimento do microrganismo testado (Ernst, 2005; Kuper *et al.*, 2012).

As metodologias podem ser classificadas em qualitativas e quantitativas. Os testes qualitativos geralmente se referem ao método de Kirby-Bauer em que pequenos discos impregnados com um agente antimicrobiano são dispostos sobre uma placa de ágar contendo o inóculo já semeado, a droga se difunde a partir do disco em um gradiente decrescente de concentração do antibiótico, resultando em um círculo concêntrico de crescimento inibido, mais conhecido como halo (CLSI, 2009; Pfaller *et al.*, 2014). Conforme Campana e cols., (2014), trata-se de um método simples, acessível, de fácil execução e reprodutibilidade.

Os testes quantitativos são apontados pela literatura como “padrão-ouro” de referência (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2015). Permitem a leitura dos resultados expressos como a concentração inibitória mínima (CIM) da dose de um fármaco capaz de inibir o crescimento de um determinado agente (expressa em ug/ml). Esses métodos são realizados utilizando a técnica de macrodiluição ou microdiluição em caldo, nas quais há o crescimento visível de um microrganismo, envolvendo ensaios com tubos de diferentes volumes e concentrações de antifúngicos (Kuper *et al.*, 2012).

O E-teste[®] (AB Biodisk, Solna, Suécia) é também um método quantitativo, porém comercial, que oferece uma alternativa simples ao método de macrodiluição. A técnica consiste em utilizar uma tira plástica impregnada com um gradiente de antifúngico, e logo que a tira é inserida em uma placa com ágar sólido, a droga difunde-se para o ágar e inibe o crescimento

microbiano em um padrão elíptico, o qual será interpretado como o valor da CIM (Espinel-Ingroff e Rezusta, 2002; Yenisehirli *et al.*, 2015) .

Em busca do aperfeiçoamento dos estudos de sensibilidade, no decorrer das décadas, vários ajustes foram propostos para garantir a consistência e a reprodutibilidade aos mesmos. Existem muitos fatores que podem influenciar os ensaios, como: tamanho do inóculo, composição do meio, pH, leitura dos testes, temperatura e tempo de incubação (Johnson, 2008; Rex *et al.*, 2011).

Conforme Rex e cols. (2001), um valor de CIM sem correlação clínica, tem pouco valor. No caso de infecções fúngicas, fatores do hospedeiro desempenham um papel importante na resposta ao tratamento. Além disso, a sensibilidade *in vitro* nem sempre pode prever o êxito do tratamento.

Um trabalho abrangendo o efeito das variáveis processuais em CIMs foi realizado por Rambali e cols. (2001). Os autores examinaram combinações de possíveis variáveis de testes e seus efeitos na susceptibilidade a itraconazol frente a isolados de leveduras e fungos filamentosos em dois tipos de meios de cultura e constataram que modificando as condições dos testes, os isolados poderiam parecer suscetíveis ou resistentes ao itraconazol, salientando assim a importância da normatização dos testes.

Referente ao exposto é incontestável a necessidade da padronização dos ensaios de sensibilidade, bem como a interpretação dos pontos de corte/leitura (*Breakpoints*). Em 1982 o órgão encarregado pela normatização das técnicas laboratoriais nos EUA, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI (antigo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* - NCCLS), designou um subcomitê para padronizar os testes de sensibilidade para fungos. Sendo assim, em 1992 foi apresentado um protocolo de referência

para a avaliação da susceptibilidade pela técnica de diluição em caldo para *Candida sp.* e *Cryptococcus neoformans* publicado em 1997 o documento M27-A (CLSI, 1992; CLSI, 1997).

O M27-A tornou-se uma ferramenta valiosa para todos os investigadores neste domínio, conferindo adequada reprodutibilidade interlaboratorial em vários estudos multicêntricos. Consecutivamente, outras versões atualizadas seguiram sendo publicadas até abril de 2008 (Rex, *et al.*, 2001; CLSI, 2008).

Em decorrência das dificuldades para estabelecer uma metodologia que avaliasse a susceptibilidade de fungos filamentosos, devido às especificidades desse grupo, o NCCLS em 1998 edita o documento M38-A, que só é aprovado em 2002. O protocolo M38-A de diluição em caldo, contempla *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Rhizopus spp.*, *Pseudallescheria boydii* e *Sporothrix schenckii*. Este documento teve sua última atualização publicada em 2008 (NCCLS, 2002; CLSI, 2008).

Esses métodos abordam as técnicas de macro e microdiluição para a determinação da CIM, e entre suas principais características estão à preparação do inóculo por espectrofotometria, meio de cultura RPMI 1640 (meio quimicamente definido e bastante complexo), sob pH 7.0 (Cuenca-Estrella e Rodríguez-Tudela, 2002). Contudo, apesar desses métodos estarem bem difundidos, importantes limitações têm sido descritas.

Com o objetivo de reverter os problemas metodológicos, algumas modificações foram introduzidas nos documentos publicados pelo CLSI. Baseado no documento M27-A, o *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST), organização conjunta da Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas (ESCMID), do Centro Europeu

de Controle de Doenças (ECDC) e dos Comitês Europeus Breakpoint Nacionais, propôs modificações na determinação da CIM em leveduras fermentadoras de glicose, primariamente, em *Candida* spp. (Arendrup *et al.*, 2012).

Entre essas modificações, destacam-se a suplementação do RPMI com 2% de glicose, o aumento do tamanho do inóculo e a leitura espectrofotométrica. Também um método para a determinação da susceptibilidade às drogas antifúngicas para fungos formadores de conídios foi proposto com base nas modificações do documento M38-A do CLSI (EUCAST, 2002; EUCAST, 2008).

O CLSI, em 2004, propôs o documento M44-A o qual padroniza o método de disco-difusão para *Candida* spp. frente ao fluconazol e ao voriconazol. Em 2009, na sua segunda edição, trazia em escopo a utilização de discos de papel contendo 25 µg da droga, meio Mueller-Hinton com 2% de glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno para facilitar a interpretação dos halos de inibição e tempo estimado para a leitura de 20 a 24 horas (Arikan, 2007; CLSI, 2009).

Atualmente, distintas provas de sensibilidade baseadas em parâmetros do CLSI vem sendo intensamente verificadas. Dentre estas, o E-test, a microdiluição colorimétrica (método comercial Sensititre YeastOne[®]), diluição em ágar, a determinação da atividade fungicida, a citometria de fluxo e a quantificação de ergosterol são os que têm apresentado as melhores correlações clínicas (Arikan, 2007; Alexander *et al.*, 2007).

Resultados obtidos pelo método E-teste mostram uma correlação >71% com os obtidos pelo método EUCAST. Em ambos os métodos, (CLSI e

EUCAST), o E-test tem sido proposto como uma tecnologia mais sensível para discriminar estirpes resistentes de *Candida*. Já em relação a fungos filamentosos o método também apresentou uma boa correlação com o documento M38 do CLSI para detectar a resistência por *Aspergillus* (Chryssanthou e Cuenca-Estrela, 2002).

A crescente necessidade de padronização das técnicas para testes de sensibilidade aos antifúngicos vem causando um progresso considerável na acurácia da avaliação *in vitro* da atividade dos antifúngicos. Todavia, ainda há algumas limitações quanto à discordância entre os resultados estabelecidos pelos testes e os tratamentos *in vivo* e *in vitro*.

Segundo Rex e Pfaller (2002), os clínicos ainda são confrontados com o desafio de como interpretar os resultados dos testes *in vitro*, pois nem sempre podem associar os valores da CIM diretamente com a resposta à terapia antifúngica. A discordância entre os testes *in vitro* com os resultados do tratamento é elucidada pela regra dos "90-60", onde infecções ocasionadas por cepas suscetíveis respondem à terapia apropriada em 90% dos casos, enquanto que as infecções provocadas por estirpes resistentes respondem à terapêutica em 60% dos casos.

Outra questão a ser abordada dentre os problemas descritos nos métodos de referência é fenômeno *trailing*, sua ocorrência pode conferir erros graves na leitura da reação de inibição. O fenômeno consiste no crescimento residual da levedura mesmo em concentrações inibitórias das drogas induzindo a interpretação errônea de resistência. Isto ocorre em isolados sensíveis que passam a ser interpretados como resistentes às drogas fungistáticas, como no caso do fluconazol e do itraconazol (Arthington *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004).

A fim de minimizar o impacto do *trainling* pelo fluconazol, o protocolo EDef 7.2 do EUCAST para diluição em caldo recomenda que a leitura das placas sejam realizadas em detector espectrofotométrico, assim obtém-se uma menor subjetividade na determinação da CIM (EUCAST, 2008).

Conforme Pfaller e cols. (2008), um dos mais importantes subprodutos da padronização dos métodos de ensaio suscetibilidade aos antifúngicos tem sido a capacidade de realizar uma vigilância ativa da resistência aos agentes antifúngicos.

Embora a escassa disponibilização nas redes em que se fornece assistência fica imperativa a qualificação e a capacitação de recursos humanos para a execução e a interpretação dos resultados de forma que possam ter uma maior aplicabilidade e produtividade (Pedroso e Rocha, 2009; Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2015).

1.6. Vigilância e controle das infecções

As infecções fúngicas nosocomiais são muito impactantes para a saúde individual e um grande problema para o sistema público de saúde, não importando a taxa de desenvolvimento do país. O percentual de incidência de infecções de um determinado estabelecimento é um indicador da qualidade e da segurança dos serviços prestados e para isso o monitoramento é essencial para apontar os problemas e as prioridades locais (WHO, 2002).

De acordo com as publicações internacionais, os sistemas de vigilância são ferramentas importantes para determinar quais as doenças infecciosas estão surgindo ou retrocedendo. Sendo essenciais para garantir a utilização de

abordagens mais eficazes de baixo custo, os cuidados preventivos e curativos (CDC, 2013).

O ARTEMIS DISK é um programa de vigilância global de grande relevância que teve sua implantação na última década. Ele é responsável por um sistema de vigilância sobre resistência fúngica, monitorando a resistência ao fluconazol e ao voriconazol em 134 instituições de 41 países (incluindo o Brasil), gerando enormes quantidades de dados e contribuindo para estudos epidemiológicos mundiais (Pfaller e cols., 2008).

Com os dados gerados por este programa é possível compreender melhor as variações micro-epidemiológicas, a melhoria contínua das práticas de testes de susceptibilidade aos antifúngicos, identificar as tendências temporais e geográficas na distribuição das espécies de *Candida* e outras leveduras oportunistas e as opiniões de especialistas da área.

O SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, é um outro programa de vigilância longitudinal e prospectivo, com escala mundial e ativo desde 1997, que visa determinar a etiologia de patógenos nosocomiais e o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos a partir de procedimentos de diagnóstico laboratorial e biologia molecular, bem como os protocolos de referência quantitativos (Pfaller *et al*, 2013).

Recentemente foi realizado um trabalho de monitoramento pelo SENTRY para documentar a mais ampla gama de fungos implicados como causas de infecções fúngicas e a atividade *in vitro* de isavuconazol, micafungina e mais 8 agentes antifúngicos em 1.613 isolados clínicos oriundos de distintas regiões do mundo (América do Norte, Europa, América Latina, Ásia - Pacífico) (Pfaller *et al.*, 2015).

O Projeto de Vigilância e Controle de Patógenos de Importância (SCOPE) Epidemiológica na Virginia (EUA) realizou um apanhado multicêntrico incluindo 49 hospitais que estão geograficamente dispersos por todo o país. De acordo com os dados observados, a proporção de infecções nosocomiais hematogênicas por organismos resistentes está aumentando nos hospitais norte-americanos (Wisplinghoff *et al.*, 2004).

Seguindo a mesma proposta do Projeto SCOPE, foi realizado um estudo brasileiro, conduzido pela Vigilância e Controle de Patógenos de Importância Epidemiológica (BrSCOPE), e que incluiu 16 hospitais públicos e privados das cinco regiões do Brasil. Os resultados obtidos afirmam que as taxas de mortalidade permanecem altas no Norte do País, enfatizando a necessidade de melhorar as práticas locais de manejo clínico de candidemia, incluindo o diagnóstico precoce, controle de origem e terapêutica antifúngica precisa.

O CANDIPOP Project é uma rede de vigilância epidemiológica que avalia a resistência microbiana na América Latina, por meio de seus dados possibilita o conhecimento sobre as fungemias em hospitais locais (Guinea *et al.*, 2014).

Os avanços no campo das ciências e tecnologia no Brasil têm refletido em progressos na promoção a saúde para a população, não obstante, ainda não se conseguiu superar questões antigas como é o caso das infecções nosocomiais e os indícios de resistência dos microrganismos pelo uso indiscriminado de antibióticos (Andrade *et al.*, 2000).

No Brasil, a magnitude da resistência fúngica ainda não é completamente compreendida. Há pouca captação de informações sobre o

assunto, decorrente do descompasso da produção científica sobre a diligência da resistência fúngica. (Brasil, 2006).

A vigilância hospitalar, bem como o monitoramento da resistência microbiana, obteve o seu marco histórico na década de 50, por meio de questionamentos quanto a medidas ambientais, práticas relativas aos procedimentos invasivos como as técnicas assépticas e os processos de esterilização dos instrumentos médico-hospitalares (Lacerda, 2002).

A portaria n.º 930 de 27 de agosto de 1992 substituiu a portaria n.º 196, com o Programa de Controle de Infecção Hospitalar (PCIH) institucional. Deliberando a gestão de competência da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) e do novato Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH). O PCIH foi definido como: um pacto para a redução da incidência e gravidade das infecções hospitalares (ANVISA, 2004; Brasil, 1992).

No ano de 2000 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), aprova o Roteiro de Inspeção do PCIH, estabelecendo a sistemática para a avaliação do cumprimento das ações do programa. Também concebeu o Sistema Nacional de Informação para o Controle da Infecção em Serviços de Saúde (SINAISS) e a formação da Rede de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Brasil, 1999; ANVISA, 2004).

A Rede de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde objetiva elevar a assistência em saúde, mediante o uso racional de antimicrobianos, da detecção, prevenção e controle da emergência e propagação da resistência microbiana em todos os centros de serviços de saúde Brasileiros (Brasil, 2006).

Considerando a realidade quanto à emergência das infecções fúngicas invasivas e frente aos poucos trabalhos publicados no Brasil sobre o tema (incidência de agentes fúngicos emergentes e os fatores relacionados), torna-se altamente recomendável a elaboração de estudos geradores de pilares para a configuração de programas e protocolos norteadores. (Brito *et al.*, 2006; Colombo *et al.*, 2006; Wille *et al.*, 2013).

1.7. Referências bibliográficas

Alastruey-Izquierdo A, Melhem MS, Bonfietti LX, Rodriguez-Tudela JL. Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015;57(Suppl19):57-64.

Alcazar-Fuoli L, Mellado E. Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice. *Br J Haematol*. 2014;166(4):471-84.

Alexander BD, Byrne TC, Smith KL, Hanson KE, Anstrom KJ, Perfect JR, et al. Comparative evaluation of E-test 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. *J Clin Microbiol*. 2007;45:698-706.

Al-Sweih N, Khan ZU, Ahmad S, Devarajan L, Khan S, Joseph L et al. *Kodamaea ohmeri* as an emerging pathogen: a case report and review of the literature. *Med Mycol*. 2011;49(7):766-70.

Anaissie, E. J. Diagnosis and therapy of fungal infection in patients with leukemia-new drugs and immunotherapy. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2008;(21)4:683-690.

Anderson TM, Clay MC, Cioffi AG, Diaz KA, Hisao GS, Tuttle MD, et al. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nat Chem Biol*. 2014;10(5):400-6.

Andrade D, Angerami ELS, Padovani CR. Condição microbiológica dos leitos hospitalares antes e depois de sua limpeza. *Rev. Saúde Pública*. 2000;34(2):163-9.

Antas PR, Brito MM, Peixoto É, Ponte CG, Borba CM. Neglected and emerging fungal infections: review of hyalohyphomycosis by *Paecilomyces lilacinus* focusing in disease burden, in vitro antifungal susceptibility and management. *Microbes Infect*. 2012;14(1):1-8.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Microbiologia Clínica para o controle de infecção em serviços de saúde. Módulos I-X. Brasília: ANVISA, 2004.

Aquino VR, Lunardi LW, Goldani LZ, Barth AL. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2005;9(5):411-8.

Arendrup MC, Boekhout T, Akova M, Meis JF, Cornely OA, Lortholary O. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Fungal Infection Study Group; European Confederation of Medical Mycology. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20 (Suppl 3):76–98.

Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W. EUCAST-AFST. EUCAST technical note on the 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). Clin Microbiol Infect. 2012;18:246-7.

Arendrup MC, Sulim S, Holm A, Nielsen L, Nielsen SD, Knudsen JD, et al. Diagnostic issues, clinical characteristics, and outcomes for patients with fungemia J Clin Microbiol. 2011;49(9):3300-8.

Arikan S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. Med Mycol. 2007;45(7):569-87.

Arthington-Skaggs BA, Lee-Yang W, Ciblak MA, Frade JP, Brandt ME, Hajjeh RA, et al. Comparison of visual and spectrophotometric methods of broth microdilution MIC end point determination and evaluation of a sterol quantitation method for in vitro susceptibility testing of fluconazole and itraconazole against trailing and non-trailing. Candida isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46:2477-2481.

Balajee SA, Weaver M, Imhof A, Gribskov J, Marr KA. *Aspergillus fumigatus* variant with decreased susceptibility to multiple antifungals. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(4):1197-1203.

Balkis MM, Leidich SD, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Mechanisms of fungal resistance: an overview. Drugs. 2002;62:1025-1040.

Barata RB. Cem anos de endemias e epidemias. Ciênc. saúde coletiva. 2000;5(2):333-345.

Barker KS, Rogers, PD. Recent Insights into the Mechanisms of Antifungal Resistance. Curr Infect Dis Rep. 2006;(8)6449-456.

Barreto ML, Carmo EH. Padrões de adoecimento e de morte da população brasileira renovados desafios para o Sistema Único de Saúde. Ciênc Saúde Coletiva. 2007;12(Suppl):1179-1790.

Barton RC. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis: from diagnosis to prediction of outcome. Scientifica. 2013;459405.

Bitar D, Lortholary O, Le Strat Y, Nicolau J, Coignard B, Tattevin P, et al. Population based analysis of invasive fungal infections France, 2001-2010. Emerg Infect Dis. 2014;20:1149-55.

Blum G, Perkhofer S, Haas H, Schrettl M, Würzner R, Dierich MP, et al. Potential basis for amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus*. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52:1553-1555.

Boff E, Lopes PG, Spader T, Scheid LA, Loreto E, Dal Forno NF, et al. Reevaluation of *Candida* susceptibility to amphotericin B: comparative study

using isolates from three hospitals in the state of Rio Grande do Sul. Rev Soc Bras Med Trop. 2008; 41(1):36-40.

Bonamigo RR, Auler A, Duro KM, Cartell A. Infecção por *Scedosporium apiospermum* e tratamento com voriconazol. An Bras Dermatol. 2007; 82(6):572-4.

Borman AM, Szekely A, Johnson EM. Comparative pathogenicity of United Kingdom isolates of the emerging pathogen *Candida auris* and other key pathogenic *Candida* species. mSphere. 2016;1(4):e00189-16.

BRASIL, Saúde Md, Sanitária ANdV. Monitoramento e prevenção da resistência microbiana em serviços de saúde – Termo de Cooperação 37 (TC-37) entre Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em parceria com a Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB/SVS/MS). Brasil 2006. p. 22.

BRASIL. Congresso Nacional. Lei No. 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, Cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e Dá Outras Providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 jan. 1999. Disponível em: <http://legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=182&word=>. Acesso em: 24 out. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria No. 930, de 27 de agosto de 1992. Expede, na Forma de Anexos, Norma para o Controle das Infecções Hospitalares. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 28 ago. 1992. Disponível em: <http://legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=490&word=>. Acesso em: 24 out. 2016.

Brito LR, Guimaraes T, Nucci M, Rosas RC, Paula Almeida L, Da Matta DA, et al. Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. Med Mycol. 2006; 44:261–266. Brown GD, Denning DW, Gow NAR, Levits SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: Human fungal infections. Sci. Transl. Med. 2012;4:1-9.

Bustamante B, Martins MA, Bonfietti LX, Szeszs MW, Jacobs J, Garcia C, et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* isolates from bloodstream infections in Lima, Peru. J Med Microbiol. 2014;63(6):855-60.

Calvo B, Melo AS, Perozo-Mena A, Hernandez M, Francisco EC, Hagen F, et al. First report of *Candida auris* in America: Clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia. J Infect. 2016;73:369-74.

Campana EH, Carvalhaes CG, Nonato B, et al. Comparison of M.I.C.E. and Etest with CLSI agar dilution for antimicrobial susceptibility testing against oxacillin-resistant *Staphylococcus* spp. PLoS One. 2014; 9(4):e94627.

Campo M, Lewis RE, Kontoyiannis DP: Invasive fusariosis in patients with hematologic malignancies at a cancer center: 1998-2009. *J Infect.* 2010;60:331-337.

Castanheira M, Woosley LN, Diekema DJ, Messer SA, Jones RN, Pfaller MA. Low prevalence of *fkp1* hot spot 1 mutations in a worldwide collection of *Candida* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(6):2655-2659.

Castro LL, Schütze M, Bückner DH, Vasconcellos Lde S. Prevalence of fungemia in a tertiary hospital: Analysis of the last decade. *Rev Assoc Med Bras.* 2016;62(4):315-9.

CDC- Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. Disponível em <<http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/index.html>>. Acesso em 20 de out. 2016.

Chagas-Neto TC, Chaves GM, Melo AS, Colombo AL. Bloodstream infections due to *Trichosporon* spp.: species distribution, *Trichosporon asahii* genotypes determined on the basis of ribosomal DNA intergenic spacer 1 sequencing, and antifungal susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 2009;107:4-81.

Chakrabarti A, Rudramurthy SM, Kale P, Hariprasath P, Dhaliwal M, Singhi S, et al. Epidemiological study of a large cluster of fungaemia cases due to *Kodamaea ohmeri* in an Indian tertiary care center. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(2):83-9.

Chakrabarti A, Shivaprakash MR. Microbiology of systemic fungal infections. *Mycopatho.* 2005;51(5):16-20.

Chakrabarti A, Sood P, Rudramurthy SM, Chen S, Kaur H, Capoor M et al. Incidence, characteristics and outcome of ICU-acquired candidemia in India. *Intensive Care Med.* 2015;41(2):285-95.

Chalmers C, Gaur S, Chew J, Wright T, Kumar A, Mathur S, et al. Epidemiology and management of candidaemia a retrospective, multicentre study in five hospitals in the UK. *Mycoses.* 2011;54(6):795-800.

Chandrasekar P. Diagnostic challenges and recent advances in the early management of invasive fungal infections. *Eur J Haematol.* 2010;84(4):281-290.

Chaveiro M, Vieira R, Cardoso J, Afonso A. Cutaneous infection due to *Scedosporium apiospermum* immunosuppressed patient. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2003;17:47-9.

Chitasombat MN, Kofteridis DP, Jiang Y, Tarrand J, Lewis RE, Kontoyiannis DP, et al. Rare opportunistic (non-*Candida*, non-*Cryptococcus*) yeast bloodstream infections in patients with cancer. *J Infect.* 2012;64(1):68-75.

Chowdhary A, Sharma C, Duggal S, Agarwal K, Prakash A, Singh PK, et al. New clonal strain of *Candida auris* Delhi, India. *Emerg Infect Dis.* 2013;19:1670-3.

Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M. Comparison of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing proposed standard and the E-test with the NCCLS broth microdilution method for voriconazole and caspofungin susceptibility testing of yeast species. *J Clin Microbiol.* 2002;40:3841-4.

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

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Approved standard M-44A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2009.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard. CLSI document M27-A. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 1997.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Proposed Standard M27P. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 1992.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Zone Diameter Interpretive Standards, Corresponding Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Interpretive Breakpoints, and Quality Control Limits for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Third Informational Supplement. CLSI document M44-S3. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.

Colombo AL, Guimarães T, Silva LR de Almeida, Monfardini LP, Cunha AK, Rady P, et al. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007;28(5):570-6.

Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouer SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol.* 2006;44(8):2816-23.

Colombo AL, Padovan ACB, Chaves GM. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and trichosporonosis. *Clin Microbiol Ver.* 2011;24: 682–700.

Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, Garbino J, Kullberg BJ, Lortholary O, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(Suppl 7):19-37.

Cornely OA, Böhme A, Buchheidt D, Einsele H, Heinz WJ, Karthaus M, et al. Primary prophylaxis of invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies. Recommendations of the Infectious Diseases Working Party of

the German Society for Haematology and Oncology. *Haematologica*. 2009; Jan 94(1):113-22.

Cornely OA, Cuenca-Estrella M, Meis JF, Ullmann AJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Fungal Infection Study Group (EFISG) and European Confederation of Medical Mycology (ECMM) 2013 joint guidelines on diagnosis and management of rare and emerging fungal diseases. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(Suppl3):1-4.

Cortés JA, Reyes P, Gómez CH, Cuervo SI, Rivas P, Casas CA, et al. Clinical and epidemiological characteristics and risk factors for mortality in patients with candidemia in hospitals from Bogotá, Colombia. *Braz J Infect Dis*. 2014;18(6):631-7.

Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, Meletiadiis J, Antachopoulos C, Knudsen T, et al. Infections Caused by *Scedosporium* spp. *Clinical Microbiology Reviews*. 2008;21(1):157-197.

Coste A, Selmecki A, Forche A, Diogo D, Bougnoux ME, d'Enfert C, et al. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot Cell*. 2007;6(10):1889-1904.

Cowen LE. Hsp90 orchestrates stress response signaling governing fungal drug resistance. *PLoS Pathog*. 2009;5(8):e1000471.

Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Monzon A, Buitrago MJ, Rodriguez-Tudela JL. Activity profile in vitro of micafungin against Spanish clinical isolates of common and emerging species of yeasts and molds. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(5):2192-5.

Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Should antifungal treatments be based upon results of antifungal susceptibility testing?. *Rev Iberoam Micol*. 2002;19(3):133-8.

Da Costa VG, Quesada RM, Abe AT, Furlaneto-Maia L, Furlaneto MC. Nosocomial bloodstream *Candida* infections in a tertiary-care hospital in South Brazil: a 4-year survey. *Mycopathologia*. 2014;178(3-4):243-50.

De Pauw BE, Picazo JJ. Present situation in the treatment of invasive fungal infection. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32 (Suppl 2) 167-71.

Denning DW. The ambitious '95-95 by 2025' roadmap for the diagnosis and management of fungal diseases. *Thorax* 2015;70:613e4.

Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. A point mutation in the 14 alpha-sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1120-1124.

Diekema D, Arbefeville S, Boyken L, Kroeger J, Pfaller M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;73(1):45–48.

Dimopoulos G, Antonopoulou A, Armaganidis A, Vincent JL. How to select an antifungal agent in critically ill patients. *J Crit Care*. 2013;28(5):717-27.

Dismukes WE. Introduction to antifungal drugs. *Clin Infect Dis* 2000;30:653–7.
Doi AM, Pignatari AC, Edmond MB, Marra AR, Camargo LF, Siqueira RA, et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146909.

Drgona L, Khachatryan A, Stephens J, Charbonneau C, Kantecki M, Haider S et al. Clinical and economic burden of invasive fungal diseases in Europe: focus on pre-emptive and empirical treatment of *Aspergillus* and *Candida* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33:7-21.

Eggimann P, Bille J, Marchetti O. Diagnosis of invasive candidiasis in the ICU. *Ann Intensive Care*. 2011;1:37.

Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis* 2003;3:685-702.
Eggimann P. Therapeutic strategies in intensive care units. *Med Mal Infect*. 2007;37(Suppl2)5-8.

Ellis D. Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2002;49(Suppl1):7-10.

Ernst EJ, Klepser ME, Pfaller MA. Postantifungal effects of echinocandin, azole, and polyeneantifungal agents against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1108-11.

Ernst EJ. Susceptibility testing methods of antifungal agents. *Methods Mol Med*. 2005;118:3-12.

Espinell-Ingroff A., Rezusta A. E-test method for testing susceptibilities of *Aspergillus* spp. to the new triazoles voriconazole and posaconazole and to established antifungal agents: comparison with NCCLS broth microdilution method. *J. Clin. Microbiol*. 2002;40:2101–2107.

EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:398-405.

Fridkin SK. The changing face of fungal infections in health care settings. *Clin Infect Dis*. 2005;41(10):1455-60.

Gadea I, Cuenca-Estrella M, Martín E, Pemán J, Pontón J, Rodríguez-Tudela J L. et al. Microbiological procedures for diagnosing mycoses and for antifungal susceptibility testing. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007;25:336-40.

Ge S-H, Wan Z, Li J, Xu J, Li R-Y, Bai F-Y. Correlation between azole susceptibilities, genotypes, and ERG11 mutations in *Candida albicans* isolates associated with vulvovaginal candidiasis in China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:3126-3131.

Girmeria C, Pagano L, Martino B, D'Antonio D, Fanci R, Specchia G, et al. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hema-tological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. *J Clin Microbiol* 2005;43:1818-28.

Godoy P, Tiraboschi IN, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, Almeida LP, et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(3):401-5.

Gooley TA, Chien JW, Pergam SA, Hingorani S, Sorrow ML, Boeckh M, et al. Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2010;363:2091-101.

Gross BN, Steib-Bauert M, Kern WV, Knoth H, Borde JP, Krebs S, et al. Hospital use of systemic antifungal drugs: a multi-center surveillance update from Germany. *Infection*. 2015;43:423–9.

Guarro JAS, Kantarcioglu R, Horre JL, Rodriguez-Tudela, M. Cuenca Estrella J. Berenguer, et al. *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Med Mycol*. 2006;44:295-327.

Guarro JAS, Kantarcioglu R, Horre JL, Rodriguez-Tudela, M. Cuenca Estrella J. Berenguer, et al. *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Med Mycol*. 2006;44:295-327.

Guinea J, Zaragoza Ó, Escribano P, Martín-Mazuelos E, Pemán J, Sánchez-Reus F, et al. Molecular Identification and Antifungal Susceptibility of Yeast Isolates Causing Fungemia Collected in a Population-Based Study in Spain in 2010 and 2011. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014;58(3):1529-1537.

Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacheck I, Sionov E, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol*. 2015;78:16-48.

Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. 2008;51(Suppl 4):2-15.

Herbrecht R, Bories P, Moulin JC, Ledoux MP, Letscher-Bru V. Risk stratification for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1272:23–30.

Hope W, Morton A, Eisen DP. Increase in prevalence of nosocomial non-*Candida albicans* candidaemia and the association of *Candida krusei* with fluconazole use. *J Hosp Infect*. 2002;50(1):56–65.

Hull CM, Bader O, Parker JE et al. Two clinical isolates of *Candida glabrata* exhibiting reduced sensitivity to amphotericin B both harbor mutations in ERG2. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:6417–6421.

Johnson E M. Issues in antifungal susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 2008;61(Suppl1) i13-8.

Kanafani ZA, Perfect JR. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis*. 2008;1:46(1):120-8.

Kett DH, Azoulay E, Echeverria PM, Vincent JL. *Candida* bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. *Crit Care Med*. 2011;39(4):665-70.

Köhler, JR, Casadevall, AC, Perfect J. The spectrum of fungi that infects human. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;3:5(1):a019273.

Kothavade RJ, Kura MM, Valand AG, Panthaki MH. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *J Med Microbiol*. 2010;59(8):873-80.

Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive candidiasis. *N Engl J Med*. 2016;374:794.

Kumar D, Banerjee T, Chakravarty J, Singh SK, Dwivedi A, Tilak R. Identification, antifungal resistance profile, in vitro biofilm formation and ultrastructural characteristics of *Candida* species isolated from diabetic foot patients in Northern India. *Indian J Med Microbiol*. 2016;34(3):308-14.

Lacerda, RA. Produção científica nacional sobre infecção hospitalar e a contribuição da enfermagem: ontem, hoje e perspectivas *Rev. Lat. Am. Enferm*. 2002;10(1):55-63.

Lass-Flörl C, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Perkhofer S, Rodriguez-Tudela JL. In vitro activities of various antifungal drugs against *Aspergillus terreus*: global assessment using the methodology of the European committee on antimicrobial susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:794-795.

Lee MK, Williams LE, Warnock DW, Arthington-Skaggs BA. Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:217-224.

Lee WG, Shin JH, Uh Y, Kang MG, Kim SH, Park KH, et al. First three reported cases of nosocomial fungemia caused by *Candida auris*. J Clin Microbiol. 2011;49:3139-42.

Lewis RE. Current Concepts in Antifungal Pharmacology. Mayo Clinic Proceedings. 2011;86(8):805-817.

Liu CY, Liao CH, Chen YC, Chang SC. Changing epidemiology of nosocomial bloodstream infections in 11 teaching hospitals in Taiwan between 1993 and 2006. J Microbiol Immunol Infect. 2010;43:416-429.

LOO, D. S. Systemic antifungal agents: an update of established and new therapies. Adv Dermatol. 2006;22:101-124.

Luna EJ. The emergence of emerging diseases and emerging and reemerging infectious diseases in Brazil. Rev Bras de Epidemiol. 2002; 5(3):229-243.

Maertens J, Raad I, Petrikos G, Boogaerts M, Selleslag D, Petersen FB et al. Efficacy and safety of caspo - fungin for treatment of invasive aspergillosis in patients refractory to or intolerant of conventional antifungal therapy. Clin Infect Dis. 2004;39(11):1563-1571.

Magalhães YC, Bomfim MR, Melonio LC, Ribeiro PC, Cosme LM, Rhoden CR, et al. Clinical significance of the isolation of *Candida* species from hospitalized patients. Braz J Microbiol. 2015;46(1):117-23.

Magobo RE, Corcoran C, Seetharam S, Govender NP. *Candida auris*-associated candidemia, South Africa. Emerg Infect Dis. 2014;20:1250-1.

Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Substitutions at methionine 220 in the 14 alpha-sterol demethylase (Cyp51A) of *Aspergillus fumigatus* are responsible for resistance in vitro to azole antifungal drugs. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:2747-2750.

Mensa J, Pitart C, Marco F. Treatment of critically ill patients with candidemia. Int J Antimicrob Agents. 2008;32 (Suppl2)S93-7.

Miceli MH, Díaz JA, Lee SA, MD. Emerging opportunistic yeast infections. Lancet Infect Dis. 2011;11(2):142-51.

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis. 1995;1(1):7-15.

Nivoix Y, Launoy A, Lutun P, Moulin JC, Phai Pang KA, Fornecker LM, et al. Adherence to recommendations for the use of antifungal agents in a tertiary care hospital. J Antimicrob Chemother. 2012;67:2506-13.

Nucci M, Anaissie EJ, Queiroz-Telles F, Martins CA, Trabasso P, Solza C, et al. Outcome predictors of 84 patients with hematologic malignancies and *Fusarium* infection. Cancer 2003;98:315-319.

Nucci M, Garnica M, Gloria AB, Lehugeur DS, Dias VC, Palma LC, et al. Invasive fungal diseases in haematopoietic cell transplant recipients and in patients with acute myeloid leukaemia or myelodysplasia in Brazil. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(8):745-51.

Nucci M, Marr KA, Queiroz-Telles F, Martins CA, Trabasso P, Costa S, et al. *Fusarium* infection in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2004;38(9):1237-42.

Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobon AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis.* 2010;51(5):561-70.

Okubo Y, Tochigi N, Wakayama M, Shinozaki M, Nakayama H, Ishiwatari T, et al. How histopathology can contribute to an understanding of defense mechanisms against cryptococci. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:465319.

Ostrosky-Zeichner L, Casadevall A, Galgiani JN, Odds FC, Rex JH. Na insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9:719–27.

Pagano L, Akova M, Dimopoulos G, Herbrecht R, Drgona L, Blijlevens N. Risk assessment and prognostic factors for mould-related diseases in immunocompromised patients. *J Antimicrob Chemother* 2011;66(Suppl1):i5–14.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009; Mar 1;48(5):503-35.

Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids.* 2009;23(4):525-30.

Pasqualotto AC, Denning DW. New and emerging treatments for fungal infections. *J Antimicrob Chemother.* 2008 *J Antimicrob Chemother.* 2008;61 (Suppl1):i19-30.

Pasqualotto AC, Zimmerman RA, Alves SH, Aquino VR, Branco D, Wiltgen D, et al. Take control over your fluconazole prescriptions: the growing importance of *Candida glabrata* as an agent of candidemia in Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29(9):898-9.

Pasqualotto GC, Copetti FA, Meneses CF, Machado AR, Brunetto AL. Infection by *Rhodotorula* sp. in children receiving treatment for malignant diseases. *J Pediatr Hematol Oncol* 2005;27:232– 233.

Pastor FJ, Guarro J: Clinical manifestations, treatment and outcome of *Paecilomyces lilacinus* infections. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12: 948–960.

Pavie J, Lacroix C, Hermoso DG, Robin M, Ferry C, Bergeron A et al. Breakthrough disseminated *Aspergillus ustus* infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients receiving voriconazole or caspofungin prophylaxis. J Clin Microbiol. 2005; 43(9):4902-4904.

Pedroso ERP, Rocha MOC. Emerging and reemerging infectious. Rev Med Minas Gerais. 2009;19(2):140-50.

Perlin DS, Shor E, Zhao Y. Update on Antifungal Drug Resistance. Curr Clin Microbiol Rep. 2015;12(2): 84-95.

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

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, et al. Results from the ARTEMIS disk global antifungal Surveillance study, 1997 to 2007: a 10.5 year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. J Clin Microbiol. 2010;48(4):1366-7748.

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Meis JF, Gould IM, et al. Global Antifungal Surveillance Study. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8 year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. J Clin Microbiol. 2007;45(6): 1735–45.

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ng KP, Colombo A, et al. Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: a global assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. J Clin Microbiol. 2008;46(3):842-9.

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev. 2007;20(1):133-63.

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. Crit Rev Microbiol. 2010;36(1):1-53.

Pfaller MA, Hazen KC, Messer SA, Boyken L, Tendolkar S, Hollis RJ, et al. Comparison of results of fluconazole disk diffusion testing for *Candida* species with results from a central reference laboratory in the ARTE-MIS Global Antifungal Surveillance Program. J Clin Microbiol 2004;42:3607-12.

Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Messer SA, Houston A, et al. Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(3):747-51.

Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M. Candida bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in intensive care unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Int J Antimicrob Agents*. 2011;38(1):65–69.

Pfaller MA, Messer SA, Woosley LN, Jones RN, Castanheira M. Echinocandin and Triazole Antifungal Susceptibility Profiles for Clinical Opportunistic Yeast and Mold Isolates Collected from 2010 to 2011: Application of New CLSI Clinical Breakpoints and Epidemiological Cutoff Values for Characterization of Geographic and Temporal Trends of Antifungal Resistance. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(8):2571-2581.

Pfaller MA, Rhomberg PR, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Isavuconazole, micafungin, and 8 comparator antifungal agents' susceptibility profiles for common and uncommon opportunistic fungi collected in 2013: temporal analysis of antifungal drug resistance using CLSI species-specific clinical breakpoints and proposed epidemiological cutoff values. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;82(4):303-13.

Plato A, Hardison SE, Brown GD. Pattern recognition receptors in antifungal immunity. *Semin Immunopathol*. 2015;37:97-106.

Rambali B, Fernandez JA, Van Nuffel L, Woestenborghs F, Baert L, Massart DL et al. Susceptibility testing of pathogenic fungi with itraconazole: a process analysis of test variables. *J Antimicrob Chemother* 2001;48: 163–77.

Ramos A, Cabero M, Orden B, Ángel-Moreno A, Forés R. Fungemia por *Rhodotorula mucilaginosa*. Presentación de dos casos. *Rev Esp Quimioter*. 2012;25:76–8.

Rex J H, Pfaller M A, Walsh T J, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum M A, et al. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:643-58.

Rex JH, Pfaller MA. Has antifungal susceptibility testing come of age?. *Clin Infect Dis*. 2002;1535(8):982-9.

Richardson M, Lass-Flórl C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(Suppl 4) 5-24.

Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:1-23.

Romeo O, Scordino F, Chillemi V, Criseo G. *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* species complex in southern Italy: an overview on the environmental diffusion of serotypes, genotypes and mating-types. *Mycopathologia*. 2012;174:283-91.

Saag MS, Graybill RJ, Larsen RA, Pappas PG, Perfect JR, Powderly WG, et al. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. *Clin Infect Dis*. 2000;30:710-8.

Sales-Campos H, Tonani L, Cardoso CR, Kress MR. The immune interplay between the host and the pathogen in *Aspergillus fumigatus* lung infection. *Biomed Res Int.* 2013;2013:693023.

Saliba F, Dupont B. Renal impairment and amphotericin B formulations in patients with invasive fungal infections. *Med Mycol.* 2008;46(2):97-112.

Sanglard D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeast. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002;20(9):462-9.

Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H. *Candida auris* sp., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol Immunol.* 2009; 53:41-4.

Selmecki A, Forche A, Berman J. Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 2010;9(7):991-1008.

Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev.*2011;75: 213-67.

Shields RK, Nguyen MH, Press EG et al. Caspofungin MICs correlate with treatment outcomes among patients with *Candida glabrata* invasive candidiasis and prior echinocandin exposure. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57: 3528-3535.

Singh-Babak SD, Babak T, Diezmann S, Hill JA, Xie JL, Chen YL, et al. Global analysis of the evolution and mechanism of echinocandin resistance in *Candida glabrata*. *PLoS Pathog.* 2012; 8(5):e1002718.

Spanakis EK, Aperis G, Mylonakis E. New agents for the treatment of fungal infections: clinical efficacy and gaps in coverage. *Clin Infect Dis.* 2006;43(8):1060-8.

Tapia PC. An update on antifungal susceptibility testing. *Rev Chilena Infectol.* 2009;26(2):144-50.

Tobudic S, Kratzer C, Presterl E. Azole-resistant *Candida* spp. Emerging pathogens?. *Mycoses.* 2012;55:24-32.

Turnidge J. and Paterson DL. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clin Microbiol Rev.* 2007 Jul;20(3):391-408.

Ullmann AJ, Akova M, Herbrecht R, Viscoli C, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, et al. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT). *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(Suppl7):53-67.

Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. PLoS Pathog. 2009;5:e1000639.

Vallabhaneni S, Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Schaffner W, Beldavs ZG, et al. Epidemiology and Risk Factors for Echinocandin Nonsusceptible *Candida glabrata* Bloodstream Infections: Data From a Large Multisite Population-Based Candidemia Surveillance Program, 2008–2014. Open Forum Infect Diseases 2015;2(4):ofv163.

Vallabhaneni S, Kallen A, Tsay S, Chow N, Welsh R, Kerins J, et al. Investigation of the First Seven Reported Cases of *Candida auris*, a Globally Emerging Invasive, Multidrug-Resistant Fungus - United States, May 2013-August 2016. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2016;11:65(44):1234-1237.

Vandeputte P, Larcher G, Berges T, Renier G, Chabasse D, Bouchara JP. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:4608-4615.

WHO-World Health Organization Prevention of hospital-acquired infections. 2002. Disponível em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/WHO_CDS_CSR_EPH_2002_12/en/>. Acesso em 20 out. 2016.

Wille MP, Guimarães T, Furtado GHC, Colombo AL. Historical trends in the epidemiology of candidemia: analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108(3): 288-292.

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. Clin Infect Dis. 2004;39(3): 309-317.

Yang BH, Peng MY, Hou SJ, Sun JR, Lee SY, Lu JJ. Fluconazole resistant *Kodamaea ohmeri* fungemia associated with cellulitis: case report and review of the literature. Int J Infect Dis 2009; 3: 493–7.

Yang F, Kravets A, Bethlendy G, Welle S, Rustchenko E. Chromosome 5 Monosomy of *Candida albicans* Controls Susceptibility to Various Toxic Agents, Including Major Antifungals. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2013;57(10):5026-5036.

Yenisehirli G, Bulut N, Yenisehirli A, Bulut Y. In Vitro Susceptibilities of *Candida albicans* Isolates to Antifungal Agents in Tokat, Turkey. Jundishapur Journal of Microbiology. 2015;8(9):e28057.

Ying Y, Zhao Y, Hu X, Cai Z, Liu X, Jin G, et al. In vitro fluconazole susceptibility of 1,903 clinical isolates of *Candida albicans* and the identification of ERG11 mutations. Microb Drug Resist. 2013;19(4):266-73.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral:

Verificar a incidência de agentes causadores de infecções fúngicas emergentes em amostras encaminhadas ao Laboratório Central de Saúde Pública da Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul (LACEN), no período entre 2003 e 2015.

2.2. Específicos:

- Verificar a incidência específica dos agentes etiológicos encontrados, entre os denominados emergentes, registrados no LACEN no período de 2003 a 2015.
- Averiguar o perfil geral dos pacientes infectados com os fungos emergentes, referente à faixa etária, ao sexo, ao sítio da infecção, à sorologia para o HIV, ao município de notificação do caso.
- Analisar a susceptibilidade das suspensões celulares de *Candida* spp. frente ao fluconazol.
- Contribuir com os órgãos de Saúde Pública no Rio Grande do Sul e no Brasil na compreensão sobre o tema, auxiliando nas decisões sobre a implementação no LACEN do Projeto da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana, recomendado pelo Ministério da Saúde.

3. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

Para publicação na seção Report International Journal of Dermatology

Emerging fungi and fluconazole susceptibility profile of *Candida* species in Southern Brazil: a longitudinal study

Vanessa da Silva Fay¹, Stela Maris Bottin Gonçalves¹, Diana Mara Rodrigues¹, Tatiana Schaffer Gregianini¹ and Renan Rangel Bonamigo^{2,3}

¹IPB-Lacen/RS (SES/FEPPS, State Foundation for Production and Research in Health), Porto Alegre, RS, Brazil, ²Postgraduate Program of Pathology, and ³Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA, Health Sciences State University of Porto Alegre), Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondence

Vanessa da Silva Fay

Avenida Ipiranga, 5400 CEP 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

E-mail: nessabiosinos@yahoo.com.br

Funding: This study was sponsored by Support Program for Scientific and Technological Development - PADCT/FEPPS), Brazil.

Conflicts of interest: None.

Abstract

Background: The number of new cases of emerging fungal infections has increased considerably in recent years, mainly due to the large number of immunocompromised individuals. The objective of this study is to evaluate the incidence and the etiology of the emerging fungal infections diagnosed at IPB-Lacen/RS (Research Institute of Biology at the Central Laboratory of Rio Grande do Sul State, Brazil), and the susceptibility of *Candida* species to fluconazol by disk diffusion method (DD).

Methods: A retrospective and longitudinal study was carried out in the Mycology Department of IPB-Lacen/RS, between 2003-2015, to verify the incidence of fungal etiology and the clinical profile of the patients - age, sex, anatomic location, classification into superficial mycoses (SM) or systemic mycoses (Sims), HIV serological status and the State's region of notification. For *Candida* species the susceptibility to fluconazole was tested.

Results: In the study period, 13707 fungal infections was evaluated and 840 cases of emerging fungi were reported (6.12%); 471 (55.9%) in women; the medium age was 43 years. *Candida* species was the most incident pathogen (486 cases or 57.7%), and the main isolated species was *Candida albicans* with 450 cases (53.38%; $P < 0.001$). Among 51 samples of outpatients tested for fluconazole, most of *Candida* isolates (78.43%) was susceptible to fluconazole, although three isolates (5.88%) was susceptible dose-dependent and eight of them (15.69%) was resistant.

Conclusions: The female gender was the most affected by emerging fungal infections, with the nails being the site with the highest frequency of infection and with a predominance of the *C. albicans* species. Systemic mycoses were predominant in male gender and HIV infection was demonstrated as a risk factor for systemic mycoses. According to fluconazole sensitivity tests, 15.69% resistance rate of *Candida* species was found in non-hospitalized patients in this sampling of southern Brazil.

Introduction

In recent decades, with the increase in the number of susceptible patients clinically and microbiologically exposed, there have been opportunistic infection rate increases with a high potential of lethality. According to Morse (1995),¹ the term “emerging infection” may be used to denote an infection that has newly appeared in the population or one that is rapidly increasing in incidence or geographic range. In this context, some fungal infections have emerged and become more frequent causing a change in the epidemiological profile of fungal infections².

Fungi can cause diseases ranging from cutaneous skin infections to lethal acute or chronic infections of deep tissues. There are an estimated 600 fungal species that are human pathogens, including *Candida* species³.

Candida albicans originates from the taxonomical division of ascomycetes and is a fungal species with the potential to cause life-threatening systemic infections. Still considered the major pathogen associated with invasive mycoses, however non-*albicans* species are increasing and may reported as a cause of infection in patients with underlying diseases.⁴⁻⁶ The epidemiology of such infections varies among different geographic regions and even between medical centers within the same region, but numbers appears to be stable or increasing in most series.^{7,8}

Local studies are important in order to obtain relevant epidemiological data and the *Candida* susceptibility profile to anti-fungal drugs is necessary in order to assist in the management and treatment of patients with *Candida* infection.⁹

Fluconazole (FCZ) is the first option for prophylaxis and treatment, due to its good tolerance, few side effects and low costs. However due to the long use for fluconazole to the invasive candidiasis treatment, strains of non-*albicans* species with low susceptibility have appeared in the hospital ambient. Some species, such as *Candida glabrata* and *Candida krusei*, already present decreased susceptibility or resistance to FCZ.^{10, 11}

Besides this new epidemiology, there is perception of an increase in fungal resistance to the medicines that would justify the need of carrying out susceptibility tests in clinical isolates.^{12, 13} Determining the sensibility profile of the agents enables safe conduct as well as the study of the evolution of resistance from the agents.

The ARTEMIS DISK, one of the most important surveillance programs on fungal resistance to fluconazole and voriconazole in 134 institutions from 40 countries, including Brazil, uses the disk diffusion method.¹⁴ Among several available methods to evaluate the sensibility, the disk diffusion method is considered accurate method of assessing susceptibility of *Candida* species to fluconazole because it is affordable and easily reproducible to apply in clinical laboratories.^{15, 16}

The objectives of this study are to verify the rate of the new cases and the etiology of emerging fungi infections in a sample of Southern Brazil, and to verify the fungal susceptibility to fluconazole.

Methods

Patients and samples

From December 2003 to December 2015 we conducted a retrospective and longitudinal study in the Mycology Department of the Central Laboratory of Rio Grande do Sul State (LACEN), Brazil. Criteria for inclusion was positive culture for emergent fungi (*Candida species*, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium species*, *Trichosporon species*, *Aspergillus species*, *Scytalidium species*, *Curvularia species*, *Chaloropsis species*, *Scopulariopsis species*, *Acremonium species*, *Onychocola species*, *Penicillium species*, *Scedosporium species*, *Hendersonula species* and others). We also verified the fungal etiology and the clinical profile of the patients: age, sex, lesion topography, State's region of notification, definition of superficial mycoses (SM: cutaneous tegument, nails) or systemic mycoses (Sims: internal organs) and HIV serological status.

To susceptibility testing, we selected the 51 strains more recently isolated of *Candida species* (year: 2015); all were from outpatients. The identification of *Candida* isolates and the fluconazole disk diffusion susceptibility testing were performed at Mycology Department of the LACEN - Porto Alegre, Brazil.

Candida species identification

All isolates of *Candida species* were identified based on their morphophysiological characteristics. The cultivation in CHROMagar-*Candida* medium (Conda, Espanha) was performed to confirm the viability and pureness, as well as for a preliminary identification of the isolates by the production of chromogen pigments (green: *Candida albicans*, blue: *Candida tropicalis* and

rose: *Candida krusei*).¹⁷ The observation of the formation of germinative tube in human serum and the production of chlamydo spores in cornmeal agar (BD, EUA) with tween 80 (Synth, SP, Brazil) was performed in order to identify *C. albicans*.^{18,19}

The biochemical identification was conducted through the API ID 32C commercial system (BioMérieux, France) according to the manufacturer recommendation. The isolates were maintained in sterile distilled water at room temperature up to the moment of the susceptibility tests.

Antifungal susceptibility testing

The agar disk-diffusion test was performed in accordance to the methodology described in M44-A2 document published by CLSI (CLSI, 2009).²⁰ Paper disks containing 25 mcg of fluconazole (CECON, Brazil) and Petri dishes (90 mm of diameter) containing Mueller-Hinton agar (Oxoid, Hampshire, England) supplemented with 2% of glycerol. In order to monitor the precision, accuracy and performance of the test, *C. albicans* ATCC 14053 and *C. parapsilosis* ATCC 22019 were used as control strains. Each isolate of *Candida* species was subcultivated into plates with Sabouraud dextrose agar (Difco, England), which were incubated at 35-37°C for 24 h. Five colonies of the isolates were collected and suspended in 5 mL of sterile saline (0.85%).

The turbidity suspension was adjusted to the 0.5 McFarland scale (10^6 cell/mL). Suspension was inoculated using a sterile swab over the surface of agar Mueller-Hinton. The disk with fluconazole was aseptically deposited over the inoculated agar and the plate was incubated aerobically at a 35-37°C temperature for 24 h. The diameter of the inhibition area was measured for determining the susceptibility and calculating the minimal inhibitory

concentration (MIC). The interpretative criteria of the fluconazole disk-diffusion test were those suggested by CLSI: susceptible (S): ≥ 19 mm; susceptible dose-dependent (SDD): 15-18 mm; resistant (R): ≤ 14 mm.

Statistical Analysis

Statistical analyses were conducted on SPSS software, version 17.0 (Chicago, IL, USA). Categorical variables were compared using chi-square test and continuous variables by ANOVA test. The values of ($P < 0.05$) were considered as being statistically significant.

Results

Etiology and characteristics of patients

In the period of the study, we evaluated 13707 epidemiological records of fungal infections and 840 cases of emerging fungi were included in this study. The incidence of emergent fungi in IPB/LACEN-RS was 612/10.000 (or 6.12% of fungal infections). The period that presented the highest number of reports was from 2007 to 2010 (38%). Of the total number of cases evaluated, 471 were in women (55.9% $P < 0.001$). The age group most affected by emerging fungal infections was from 36 to 60 years, with 543 cases. However, the average age was 43 years (0-90 year age range).

C. albicans was the main isolated fungi (450 or 53.8%; $P < 0.001$) followed by *Cryptococcus neoformans* (332 or 39.4%) and *Candida parapsilosis* (24 or 2.86%). *C. neoformans* was the agent responsible for 317 (95.48%) cases of meningitis and the most frequent among the seropositive group, isolated from

124 (81.58%) samples. Women presented the highest frequency to *C. albicans* (71.13%) and men had the highest frequency to *C. neoformans* (64.23%).

Systemic mycoses (Sims) accounting for 450 cases (53.4%). In 322 events (38.24%) the Cerebrospinal Fluid (CSF) was the place of occurrence. Men had the highest frequency to Sims (310 or 68.8%, $P < 0.001$) and to Cerebrospinal Fluid (CSF) (227 or 61.52%), too.

Among the samples of Sims, 149 (33.11%) were seropositive for HIV infection (108 male and 41 female), in SM only three patients (1.97%) were seropositive for HIV ($P < 0.01$).

Superficial mycoses (SM) accounted 390 cases (46.43%). In 364 cases, the fingernail was the place of occurrence. Among the 331 SM in women, 312 were in fingernails (85.71%, $P < 0.001$).

The metropolitan region of the Capital of Rio Grande do Sul State, Porto Alegre, accounted for 610 of the notifications (72.4%, $P < 0.001$). All the variables covered in the study are summarized in Table 1.

Table 1. General characteristics of the study. (IPB-LACEN/RS, 2003-2015).

Variable	N	%
Period studied 2003-2015	840	100
Sex		
Female	471	55.9
Male	369	43.8
Prevalence by age group		
0-15	14	1.6
16-35	146	17.38
36-60	543	64.64
>60	137	16.30
Superficial mycoses	390	

Nails	375	96.15
Skin	15	3.85
Systemic mycoses	450	
Cerebrospinal Fluid	322	71.55
Bronchoalveolar Fluid	77	17.11
Sputum	27	6
Blood	8	1.78
Hepatic	8	1.78
Others*	8	1.78
HIV serology status		
HIV+	152	18.1
HIV-	688	81.9
Regions of Southern Brazil		
Metropolitan	610	72.4
Others**	230	27.6

Others:* Vaginal Fluid, Forearm Lesion, Foot Secretion, and Lymph Node, Mucous of Lip, Pleural Fluid and Secretion of Ulcerated Colon.

Others: **North, South, Mountainous, Missionary, Valleys and Central-West.

Susceptibility profile

Among the 51 studied species of *Candida*, 40 (78.43%) was susceptible to fluconazole, three (5.88%) were susceptible dose-dependent and eight (15.69%) was resistant (Table 2).

Table 2. Susceptibility profile of *Candida* to fluconazole (n= 51) tested by DD method (IPB-LACEN/RS, 2003-2015).

Species (n= 51; outpatients)	Susceptible*	SDD*	Resistant*
<i>Candida albicans</i> (n=22)	18	3	5
<i>Candida non-albicans</i> [#]	22	0	3

(n=29)

Total	40	3	8
%	(78.43%)	(5.88%)	(15.69%)

*S: sensible, *SDD: susceptible dose-dependent, *R: resistant.

#Candida non-albicans = C. parapsilosis, C. guilliermondii, C. tropicalis, C. colliculosa, C. famata, C. lipolytica and C. kefyr.

The predominance of resistance in the age range above 60 years (average was 69). The diameters of inhibition zones produced by the agar disk-diffusion for all of the isolates tested varied from 17 to 25 mm. The results of the susceptibility profile of the 51 isolated *Candida* species to antifungal agents tested by DD method are shown in Table 3.

Table 3. Resistance profile to the antifungal by sex, age range and mycoses classification. (IPB-LACEN/RS, 2003-2015).

	S*	SDD*	R*
Female	30	3	7
Male	10	0	1
Total	40	3	8
Age range			
0-15	0	0	0
16-35	3	0	1
36-60	17	1	2
>60	20	2	5
Total	40	3	8
SMis[#]	7	0	1
SM[#]	33	3	7
Total	40	3	8

S*: sensible; SDD*: susceptible dose-dependent; R*: resistant.

SMis[#]: systemic mycoses; SM[#]: superficial mycoses.

Discussion

In the last two decades, fungus has been identified with highest frequency as agents responsible for serious infections. The emergence of organisms with mutant susceptibilities to available antifungal drugs emphasize the clinical importance of establish laboratory diagnostics.²² To date, this longitudinal study is the largest conducted on the subject in southern Brazil. The LACEN is the reference laboratory of Rio Grande do Sul state and receive inpatient and outpatient samples.

During this study (2003-2015), the epidemiological analyses shown that there was a predominance of cases in females (55.9% $P < 0.001$) and an age range widely varied, with average of 43 years. *C. albicans* (53.6% $P < 0.001$) was the most prevalent among the species, followed by *C. neoformans* (39.52%) and non-*albicans* species, with greater representation of *C. parapsilosis* (2.86%). These data agrees with other Brazilian and international studies concerning nosocomial fungal infections, which show *C. albicans* as the most prevalent species isolated.²³⁻²⁶

Adults between 36 and 60 years of age were the most affected by emerging fungal infections, corresponding to 64% of the cases. Observational prospective studies in Latin America in relation to systemic and superficial infections indicate that 22.3% and 35.8%, respectively, of the episodes occurred in adult patients. Thus, our data, although with higher rates, agree with the literature presuming that this age group is more prone to these types of infections due to their lifestyle and immune status.²⁷⁻²⁸

The metropolitan region of the Capital of Rio Grande do Sul state, Porto Alegre, accounted 72.4% of the notifications. This may be related to the fact

that this region is a reference in treatment or even due to gather many health centers. Understand the epidemiological characteristics of a specific community has both local and global importance considering the constant flow of people within a country and around the world.²⁹

Recently, Magalhães *et al.*³⁰ evaluated 108 isolates of yeast from various clinical samples collected in three hospitals in São Luis-MA, Brazil. The identified species were *C. albicans* followed by non-*albicans*, which were the most prevalent agent in relation to fungal infections. According to Lagrou³¹ *C. albicans* remains as a major cause of invasive infections; but the incidence of *C. parapsilosis* has grown significantly surpassing *C. albicans* in some studies, depending on the period and the geographical area evaluated.

Systemic mycoses were highest (53.4%) in relation to superficial mycoses (46.3%), perhaps because Lacen, as central reference laboratory, receive many samples of hospitals and ambulatory which works as reference for the treatment of patients with HIV and other serious diseases. Men had the highest frequency of Sims (68.8% $P < 0.001$). The CSF was the site of greatest occurrence on them and, in general, on Sims too (61.52 $P < 0.001$).

There was a female predominance in relation to superficial mycoses (85.71% $P < 0.001$), especially in the fingernails (43.23%), perhaps because women search more health care. Studies by Ribeiro *et al.*³² at a hospital in São Paulo, Brazil, pointed a similar pattern, shown that 66% patients treated for onychomycosis were women and 34% men. Resemblant to our findings, a recent study conducted in Porto Alegre, Brazil, evaluating the prevalence of superficial mycoses, found that the *Candida* genus was the most prevalent, with women being the most affected in their fingernails.³³ These authors argue that

the epidemiology of onychomycosis is of multifactorial influence and its prevalence is directly related to age, geography, climate of the region, lifestyle and association to other diseases.

Concomitant HIV infection rates were higher in systemic mycoses than in superficial mycoses, presenting 149 (98.03% $P < 0.001$) and 3 (1.97%) cases, respectively. Therefore, in our study the presence of HIV could be considered as a risk factor for systemic mycoses.

Cryptococcus neoformans was the most representative agent in males with 64.23% of the isolates. It was also the most prevalent among systemic mycoses, accounting for 95.48% of the meningitis cases, and the most frequent in seropositives (81.58%). These findings agree with what³⁴ sustain they argue that infections due to *C. neoformans* in hospitalized patients have increased in recent years, and more than 80% of cryptococcosis cases worldwide are associated with HIV infection.

In relation to susceptibility tests to fluconazol, 15.69% species of *Candida* were resistant. It is very important to remember that the all isolates were coming of outpatients Services. A similar Brazilian study, but with hospital samples, realized by Neves-Junior and colleagues,³⁵ with a 93 isolates of *Candida* species demonstrated similar distribution of susceptibility rates, where 58 isolates presented a susceptible profile (62.5%), 6 were susceptible dose-dependent (6.5%) and 29 were resistant to fluconazol (31%).

In our work, even with a limited number of strains, it was noted an elevated resistance rate of the *Candida* species, some what higher than those of other authors.³⁶⁻³⁷ Indeed, in 2013, the CDC comunicated the increasing incidence of *Candida* infections due to azole-resistant strains and considers it to

be a serious public health threat that must be addressed through improved use of antifungal agents.³⁸

The age range above 60 years showed a high resistance rate to fluconazole (62.50%), of the 8 resistant samples, 5 were part of this group. An epidemiological study carried out in Spain (FUNGEMYCA)³⁹ a similar result was proposed by Pemán and colleagues the rate of resistance to fluconazole was also ten times higher in patients over than 65 years of age (46.7%). As well, within the same age range Pfaller et al in their study (SENTRY-Asia-Pacific, European, Latin American and North American)⁴⁰ observed a higher percentage of fluconazole-resistant isolates in the 29-59 age group.

Given the results obtained in this work, we would like to suggest that this process be continued. With a larger number of strains, it would be possible to make comparisons between different fungal agents and existing susceptibility tests until the present moment, so that the results may again contribute to public health services.

Conclusion

In the study we observed that female gender was the most affected by emerging fungal infections, with the nails being the site with the highest frequency of infection. The *Candida* genus presented the highest incidence rate, with a predominance of the *C. albicans* species. Systemic mycoses were predominant in male gender, mainly in CSF, and HIV infection was demonstrated as a risk factor for systemic mycoses.

According to fluconazole sensitivity tests, a worrying resistance rate of *Candida* species was found in non-hospitalized patients in this sampling of

southern Brazil. Sensitivity tests to antifungal agents have been expanding slowly and are necessary for clinical practice, which makes necessary to have improvements, investments, and training of technicians in areas where these tests will be conducted.

Acknowledgments: The authors wish to thank PADCT/FEPPS, Brazil.

References

1. Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 1995; **1**(1):7-15.
2. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2003, issued August 2003. *Am J Infect Control* 2003; **31**(8):481-98.
3. Brown GD, Denning DW, Levitz SM. Tackling human fungal infections. *Science* 2012; **336**(6082):647.
4. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al. Global Antifungal Surveillance Study. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5- year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol* 2007; **45**(6):1735–45.
5. Arendrup MC, Sulim S, Holm A, et al. Diagnostic issues, clinical characteristics, and outcomes for patients with fungemia. *J Clin Microbiol* 2011; **49**(9):3300-8.
6. Slavin MA. The epidemiology of candidaemia and mould infections in Australia. *J Antimicrob Chemother* 2002; **49**(Suppl1:3)-6.
7. Eggimann P., Garbino J., Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill nonimmunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis* 2003; **3**(11):685-702.
8. Bassetti M, Righi E, Ansaldi F, Merelli M, Trucchi C, De Pascale G, et al. A multicenter study of septic shock due to candidemia: outcomes and predictors of mortality. *Intensive Care Med* 2014; **40**(6):839–45.
9. Aquino VR, Lunardi LW, Goldani LZ, et al. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. *Braz J Infect Dis* 2005; **9**(5):411-8.

10. LI H, Zhang C, Chen Z, *et al.* A promising approach of overcoming the intrinsic resistance of *Candida krusei* to fluconazole (FLC) combining tacrolimus with FLC. *FEMS Yeast Res* 2014; **14**:808-811.
11. Chen TC, Chen YH, Chen YC *et al.* (2012) Fluconazole exposure rather than clonal spreading is correlated with the emergence of *Candida glabrata* with cross-resistance to triazole antifungal agents. *Kaohsiung J Med Sci* 2012; **28**:306-315.
12. Lopez J, Pernot C, Aho S, *et al.* Decrease in *Candida albicans* strains with reduced susceptibility to fluconazole following changes in prescribing policies. *J Hosp Infect* 2001; **48**(2):122-8.
13. Silvia VV, Díaz MC, Febré N. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. *Rev Chil Infect* 2002; 19(2 Suppl.)149-156.
14. Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, *et al.* Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004-2008. *PLoS One* 2014; **9**(7):e101510.
15. Gomes CL, Cavalcante JE, Cunha FA, *et al.* Identificação e perfil de sensibilidade de *Candida* spp. isoladas de urina de pacientes com candidúria em Iguatu-Ceará. *Rev bras anal Clin* 2010; **42**(3):223-225.
16. Pfaller MA, Hazen KC, Messer SA, *et al.* Comparison of results of fluconazole disk diffusion testing for *Candida* species with results from a central reference laboratory in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol* 2004; **42**:3607-12.
17. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1994; **32**(8):1923-9.
18. Dalmau LM. Observations on mycological technique with particular reference to pathogenic fungi. *Public Heath Trop Med.* 1929; **5**:302-11.
19. Taschdjian CL, Burchall JJ, Kozinn PJ. Rapid identification of *Candida albicans* by filamentation on serum and serum substitutes. *AMA J Dis Child* 1960; **99**:212-5.
20. CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Approved standard M-44 A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2009.
21. Favalessa OC, de Paula DA, Dutra V, *et al.* Molecular typing and in vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus* spp. from patients in Midwest Brazil. *J Infect Dev Ctries* 2014; **8**(8):1037-43.
22. Nucci M, Marr KA. Emerging fungal diseases. *Clin Infect Dis* 2005; **41**(4):521-6.

23. Wille MP, Guimarães T, Furtado GH, et al. Historical trends in the epidemiology of candidaemia: analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013; **108**(3).
24. DA Costa VG, Quesada RM, Abe AT, et al. Nosocomial bloodstream *Candida* infections in a tertiary-care hospital in South Brazil: a 4-year survey. *Mycopathologia* 2014; **178**:243-250.
25. Corzo-Leon DE, Alvarado-Matute T, Colombo AL, et al. Surveillance of *Candida* spp. bloodstream infections: epidemiological trends and risk factors of death in two Mexican tertiary care hospitals. *PloS One* 2014; **9**:e97325.
26. Neufeld PM, Melhem MS, Szeszs MW, et al. Nosocomial candidiasis in Rio de Janeiro State: Distribution and fluconazole susceptibility profile. *Braz J Microbiol* 2015; **46**(2):477-84.
27. Puig-Asensio M, Pemán J, Zaragoza R, et al. Impact of therapeutic strategies on the prognosis of candidemia in the ICU. *Crit Care Med* 2014; **42**:1423–32.
28. Silva-Rocha WP, de Azevedo MF, Chaves GM. Epidemiology and fungal species distribution of superficial mycoses in Northeast Brazil. *J Mycol Med* 2016; **20**(16)8.
29. Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobon AM, et al. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis* 2010; **51**(5):561-70.
30. Magalhaes YC, Bomfim MR, Melonio LC, et al. Clinical significance of the isolation of *Candida* species from hospitalized patients. *Braz J Microbiol* 2015; **46**(1):117-23.
31. Lagrou K, Verhaegen J, Peetermans WE, et al. Fungemia at a tertiary care hospital: incidence, therapy, and distribution and antifungal susceptibility of causative species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; **26**(8):541-7.
32. Ribeiro CS, Zaitz C, Framil VM, et al. Descriptive study of onychomycosis in a hospital in Sao Paulo. *Braz J Microbiol* 2015; **46**(2):485-92.
33. Heidrich D, Stopiglia CD, Magagnin CM, et al. Sixteen years of dermatomycosis caused by *Candida* spp. in the metropolitan area of porto alegre, southern brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2016; **58**:14.
34. Sionov E, Chang YC, Garraffo HM, et al. Hetero resistance to Fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**:2804-2815.
35. Neves-Junior A, Cartágenes-Pinto AC, Rocha DA, et al. Prevalence and Fluconazole Susceptibility Profile of *Candida* spp. Clinical Isolates in a Brazilian Tertiary Hospital in Minas Gerais, Brazil. *An Acad Bras Cienc* 2015; **87**(2 Suppl):1349-59.

36. Dalazen D, Zanrosso D, Wanderley L, et al. Comparação do perfil de suscetibilidade entre isolados clínicos de *Candida* spp. orais e vulvovaginais no Sul do Brasil. *J Bras Patol Med Lab* 2011; **47**(1):33–38.
37. Arendrup MC. *Candida* and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. *Dan Med J* 2013; **60**(11):B4698.
38. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. Disponível em <<http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/index.html>>. Acesso em 23 de out. 2016.
39. Pemán J, Cantón E, Camarena Minana JJ, et al. Variación de la epidemiología de las fungemias y de la sensibilidad a fluconazol de los aislamientos en los últimos 10 años en España: resultados del estudio FUNGEMYCA. *Rev Iberoam Micol* 2011; **28**:91-9.
40. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, et al. Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010 ;**68**: 278-83.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A relação entre as populações de homens, vetores e agentes etiológicos é bastante complexa e não parece reservar uma vida livre de infecções para as próximas gerações. (Barata, 2000).

A observação do quadro atual quanto às infecções fúngicas emergentes em amostra de laboratório de referência em Saúde Pública no Rio Grande do Sul (Brasil), reforça a preocupação existente quanto às dificuldades de controle epidemiológico e quanto ao manejo terapêutico individualizado. Ressalta-se a necessidade da manutenção de um laboratório nacional que realize estudos de vigilância e mantenha estrita observação dos resultados apresentados nas MIC's de leveduras isoladas em diversos Serviços do país. (Tapia, 2009).

Ficamos motivados em colaborar com as instituições de saúde, viabilizando informações acerca da epidemiologia e ecologia desses fungos, por meio desta ação científica em nível regional.

5. ANEXOS

5.1. Material e métodos

5.1.1. Delineamento e Período: estudo longitudinal, de coorte retrospectiva, com análise amostral entre 2003 e 2015.

5.1.2. Variáveis: incidência de fungos emergentes, incidência específica dos agentes etiológicos, idade, sexo, sítio da infecção, sorologia ao HIV e o município de notificação do caso.

5.1.3. Local: Seção de Micologia do Instituto de Pesquisas Biológicas do Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul (IPB-LACEN/RS).

5.1.4. Instrumento de aferição: amostras providas de todas as regiões do Estado do Rio Grande do Sul. As informações são inseridas em prontuários individuais dos pacientes.

5.2. Parecer do Comitê de Ética

O Projeto foi aprovado pelo CEP da UFCSPA: 23523513.4.0000.5345, data da Relatoria: 19/12/2013 e pelo CEP da FEPPS: 23523513.4.3001.5320, data da Relatoria: 14/04/2014.