XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia

ÁREA – INFECÇÃO HOSPITALAR

"Sensibilidade a antifúngicos em amostras hospitalares do gênero *Candida*"

Profª. Drª. Claudete Rodrigues Paula

Laboratório de Leveduras Patogênicas – ICB/USP

- 2003 -

Pesquisadores Envolvidos

- Prof. Dr. Augusto Cezar Montelli – UNESP
- Profª. Drª. Claudete Rodrigues Paula – ICB/USP
- Profª. Drª. Maria de Fátima Sugisaki - UNESP
- Mestranda – Elza Helena da Silva – ICB/USP
- Doutorando – Eriques Gonçalves da Silva – ICB/USP
- Doutoranda – Flavia Emi Matsumoto – ICB/USP
- Doutoranda – Luciana da Silva Ruiz – UNESP/USP
- Profª. Sônia Khouri – UNIVAP/SP

NOVOS GRUPOS

- Prof. Dr. Francisco de Assis Baroni – UFRRJ/RJ
- Profª. Drª. Junia Hamdan – UFMG/MG
- Profª Drª. Marcia Melhem – IAL/SP

O QUE É UMA INFECÇÃO HOSPITALAR OU NOSOCOMIAL?

- **Infecção Hospitalar**: É aquela adquirida após a admissão do paciente e que se manifesta durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares (MONTELLI, Comunicação Pessoal).

- **Desafio do Século XXI**

- **Alta taxa de mortalidade**

- **Resistência aos poucos fármacos (intrínseca e adquirida)**

IMPORTÂNCIA DO CONTROLE DAS INFECÇÕES HOSPITALARES

- 8% dos pacientes que ingressam nos hospitais podem adquirir uma infecção hospitalar fúngica.
- Nesse grupo a mortalidade costuma ser elevada.
- Infecção Hospitalar em UTI Neonatal pode variar de 2% - 10%, com mortalidade variando de 15 a 45%, dependendo do agente etiológico.

IMPORTÂNCIA DAS INFECÇÕES FÚNGICAS HOSPITALARES

Últimas décadas

Avanços da tecnologia na área médica

Introdução de novos métodos diagnósticos e técnicas cirúrgicas, novos biomateriais para próteses, sondas, cateteres, avanços na quimioterapia de tumores, novos antibióticos e técnicas de transplantes de órgãos.

Maior sobrevida de doentes críticos (AIDS, Imunodeprimidos, Neutropênicos, e transplantados.

↑Risco de aquisição de infecções fúngicas

Ministério da Saúde - ANVISA

Infecções Fúngicas:

- Leveduroses - (Candidiase e Criptococose)
- Aspergilose
- Leveduras emergentes

Fungemias Hospitalares:

- Infecções fúngicas da corrente sanguínea adquirida na maioria das vezes de microbiota autóctone do paciente ;
- Uso de antibacterianos aumenta a colonização de *Candida* no trato gastrintestinal;
- Imunidade baixa (AIDS, uso de corticóides, doença maligna, quimioterapia, radioterapia, desnutrição, idade avançada, neutropenia;
- Cateter, sondas.

Infecção Fúngica do Trato Uninário: (Candidúria)

- Cateterização Urinária;
- Agentes predominantes: *Candida albicans* e *Candida glabrata*;
- Patologia urinária sugestiva: 10.000 ufc/mL;
- Hemácias, leucócitos, leveduras, pseudo-hifas.

Candida spp:

✓ *Candida* – importância médica –

Grupo dominante de infecção fúngica nos hospitais

Projeto NNIS (1970) { Fungemia, Candidemia, Candiduria

1975 – Não estava entre os dez agentes etiológicos
1984 – 8º lugar;
1989 – 4º lugar;
2002 – 3º lugar.

ESPÉCIES NÃO - *ALBICANS*
(resistência aos antifúngicos)

- ✓Reservatórios em potencial
- ✓Modo de transmissão dentro do ambiente hospitalar

Candida albicans - ↑

Fungemia – sítios predominantes clinicamente importantes

(já descritos cepas resistentes a Anfotericina B, estudos?)

↓

✓ ↑ de sp não *albicans* causando infecções significativas:
C. tropicalis, C. glabrata, C. parapsilosis, C. krusei, C. lusitaniae e *C. dubliniensis*

↓

✓Seleção das sp menos sensíveis pelo uso de antifúngicos;
✓Discussão do uso profilático de antifúngicos.

Candida tropicalis:

✓Infecções endógenas; colonização prévia do trato gastrintestinal e outros sítios antes de causar fungemia e formas sistêmicas de candidiase. Resistência a vários azólicos de última geração

Candida parapsilosis:

✓ infecções exógenas; sem prévia colonização em outros
✓sítios; fungemia, endocardite, artrite e peritonite. (CATETER) – Formação de Biofilmes que "protege" a levedura contra os fármacos.

Candida krusei:

✓Colonização prévia do trato gastrintestinal e outros sítios, causando fungemia e formas sistêmicas de candidiase. (resistência ao fluconazol)

Candida lusitaniae:

✓ infecção endógena, sendo a mesma cepa que coloniza e, posteriormente, invade o trato urinário, respiratório e circulatório do paciente.

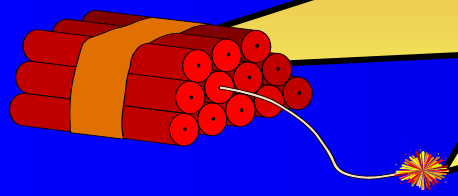
Candida glabrata:

- ✓ ⬆ virulência ; coloniza vários sítios em um mesmo paciente (cepas resistentes aos azólicos)

⬇

fungemia com alta letalidade (candiduria)

Alguns estudos recentes ocupa o 2° lugar em freqüência depois de *C. albicans*



Epidemiologia da Transmissão Nosocomial por *Candida*

Não existem métodos de tipagem ideais

Sistemas

- Marcadores fenotipicos
  - "morfotipagem"
  - "micocinas killer"
  - "enzimas"
- Padrão de sucetibilidade a agentes antifúngicos
  - (NCCLS), (EUCAST), ("Kits")
- Marcadores moleculares
  - RFLP, PCR, cariotipagem

Critérios utilizados para a determinação da sensibilidade aos antifúngicos:

- THORNSBERRY & SABATH -- (o mais tradicional) – nível sérico da droga (1986)
- NCCLS ("standard") – Documento M27 – A2 – (2002)
- EUCAST (NCCLS – modificado) – Doc. E. Dis. 7.1.(2002)

Agente antifúngico	SensíveL CIM	Sensível Dose – dependente CIM	Resistente CIM
Fluconazol	≤ 8	16 - 32	≥ 64
Itraconazol	≤ 0,125	0,25 – 0,5	≥ 1
5-Fluorocitosina	≤ 4	-	≥ 32
Anfotericina B	-	-	> 2

NCCLS – "breakpoints" (mg/mL) para espécies de *Candida*

MÉTODOS EMPREGADOS PARA SE ESTABELECER A SENSIBILIDADE DE AMOSTRAS DE LEVEDURAS AOS ANTIFÚNGICOS

1 - NCCLS – Macro e Microdiluição;
2 – EUCAST – Leitura em espectrofotômetro;
3 – "Kits" comerciais = "E – Test" (boa concordância); discos com os fármacos, "Candifast"

FATORES IMPORTANTES PARA A REALIZAÇÃO DOS TESTES

- ✓ **Preparação do fármaco – (diluição, tampão);**
- ✓ **Preparação e inóculo fúngico;**
- ✓ **Meio de cultivo;**
- ✓ **Temperatura e tempo de leitura;**
- ✓ **Cepas padrões com CIM(s) conhecidos;**
- ✓ **Instruções do fabricante (Kits);**
- ✓ **Pessoas que conduzem os testes e leiam os resultados.**

RESULTADOS DA PESQUISA

- Critério = NCCLS (2002);
- Método = "E - Test" (AB-BIODISK, SUÉCIA)
  (boa concordância, rapidez e fácil execução);
- Amostras = 300;
- Meio de cultivo = RPMI + MOPS
  (Leitura 48 hs, temperatura = 35°C).

Sensível ? - Resistente ?

"IN VIVO"

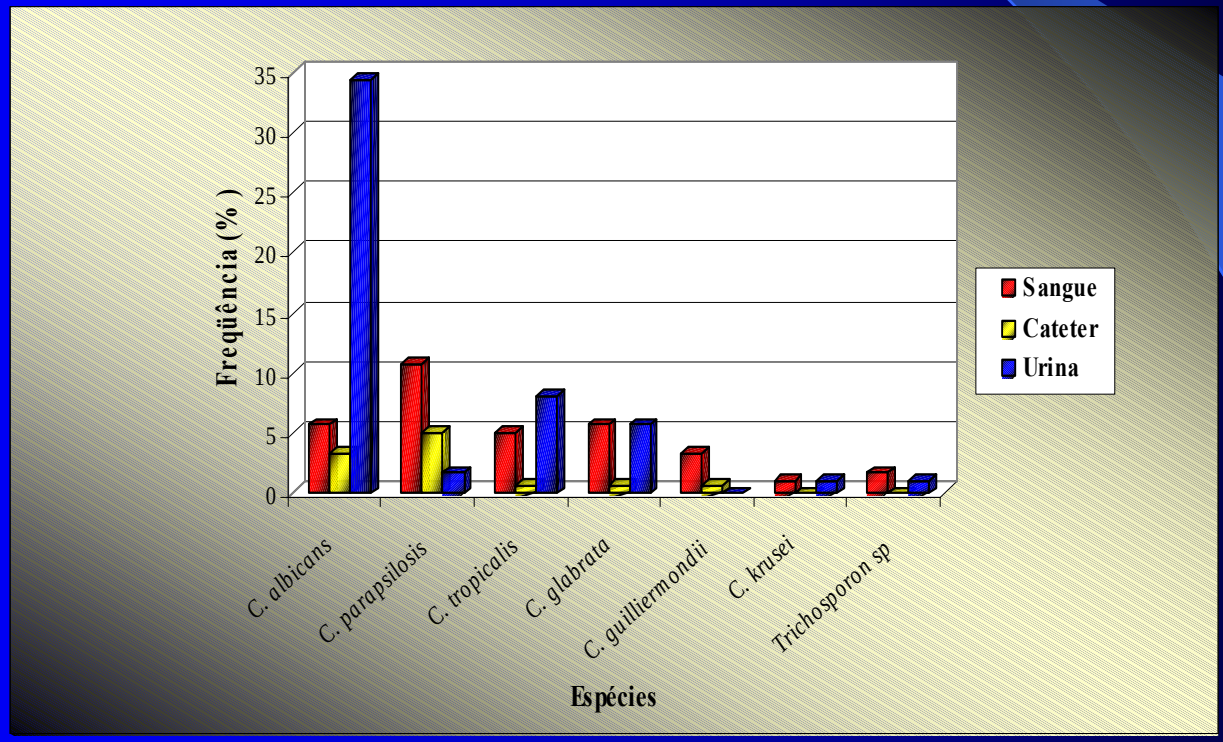
- Composição do fármaco;
- Interação Medicamentosa;
- Farmacocinética da droga;
- Absorção pelo paciente;
- Risco X Beneficio (toxicidade, reações adversas);
- Profilaxia;
- (Pensar sempre nestes fatores)

HOSPITAL I: HOSPITAL PÚBLICO INFANTIL DE SÃO PAULO (1999-2002)

HOSPITAL I – HOSPITAL PÚBLICO INFANTIL DE SÃO PAULO - SP (sangue, cateter e urina)

- Nº de leitos → 100
- atendimento de crianças → 0 a 15 anos
- classe → renda baixa
- clínicas com maior n° de casos → UTI Neonatal
- Dados de 1999 a 2002

Freqüência das espécies de leveduras isoladas de sangue, cateter e urina de crianças hospitalizadas



PROTEINASE E FOSFOLIPASE

Atividade da proteinase com índice 3: 81% das amostras

Atividade da fosfolipase com índice 3: 24% das amostras

SENSIBILIDADE ÀS TOXINAS "KILLER"

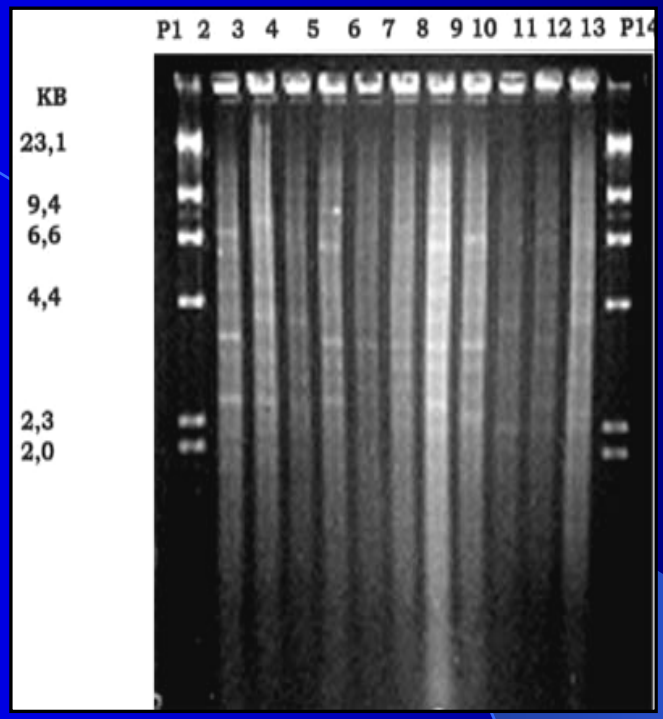
Biotipos mais freqüêntes: 511 (56%) e 888 (38%)

Padrão "killer", atividade enzimática e espécies de leveduras isoladas em associação de pacientes provenientes de Hospital Público Infantil de São Paulo, SP.

Paciente	Mat. Clin./Cateter	Espécie	Killer	Proteinase	Fosfolipase
1	Cateter*	*C. parapsilosis*	888	0,21	(-)
	Sangue	*C. parapsilosis*	888	0,19	(-)
2a	Cateter*	*C. parapsilosis*	888	0,15	(-)
	Sangue	*C. parapsilosis*	888	0,15	(-)
2b	Sangue	*C. guilliermondii*	811	0,14	(-)
	Sangue	*C. guilliermondii*	888	0,15	(-)
3a	Cateter*	*C. parapsilosis*	888	0,33	(-)
	Sangue	*C. parapsilosis*	888	0,25	(-)
3b	Cateter*	*C. guilliermondii*	888	0,80	(-)
	Sangue	*C. guilliermondii*	888	0,27	(-)
4	Cateter*	*T. cutaneum*	888	(-)	(-)
	Sangue	*T. cutaneum*	888	(-)	(-)
5	Cateter*	*C. albicans*	511	0,25	0,71
	Urina	*C. albicans*	514	0,25	0,70

Pacientes 2 e 3 ("a" e "b") → Amostras isoladas em duas ocasiões
*** Cateter venoso**

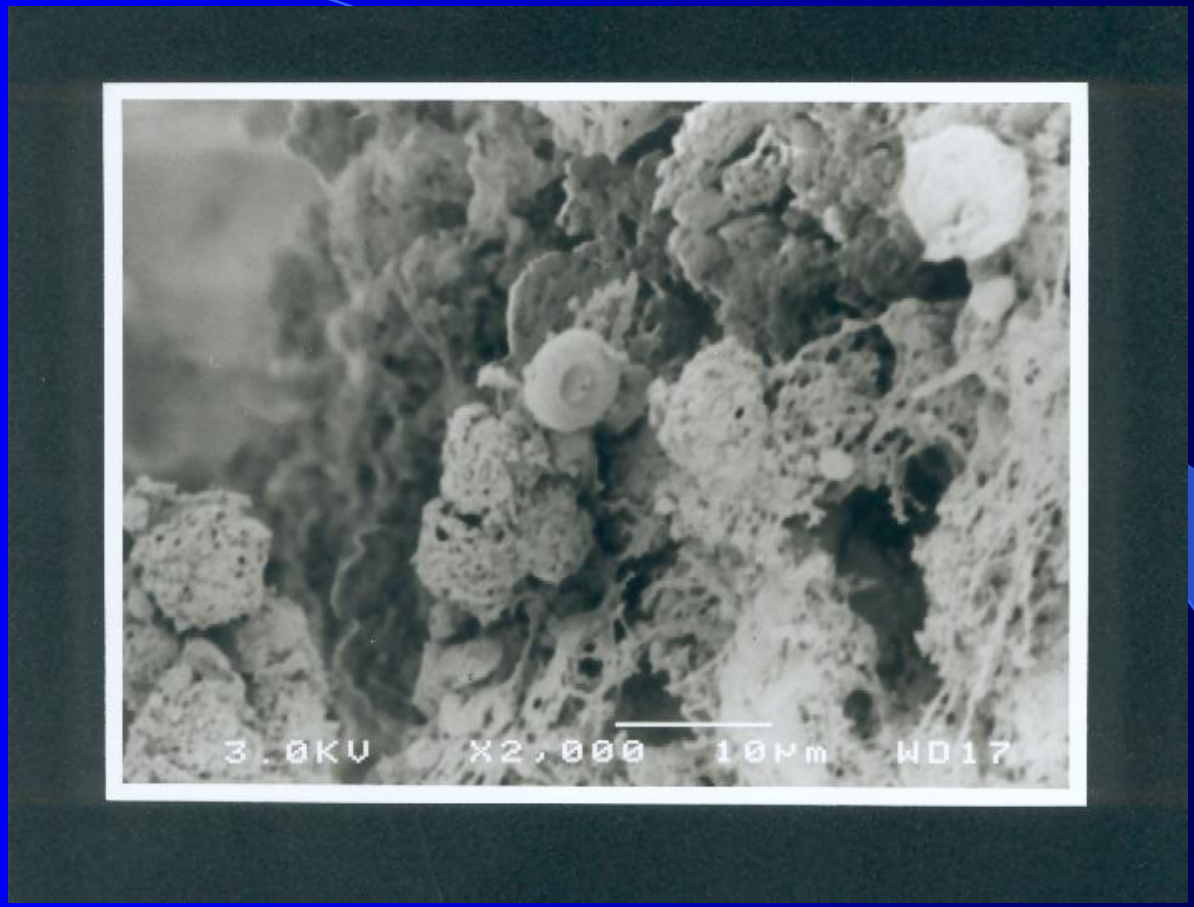
Perfil genotípico- RFLP- das espécies de leveduras em associação de pacientes internados em Hospital Público Infantil de São Paulo.



*P1 Marcador de peso molecular-Kb

*Colunas 5 e 6: Paciente 2a (cateter/sangue)

*Colunas 8 e 9: Paciente 3a (cateter/ sangue)



Formação de biofilme em cateter por amostra de *C. parapsilosis*

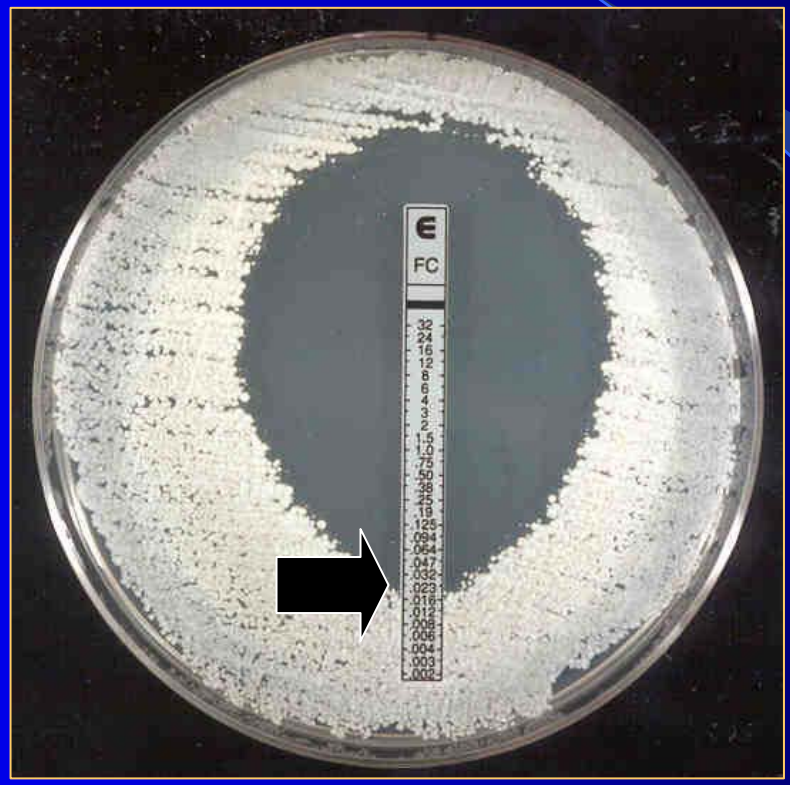
Resultados de CIM50 e CIM90 das amostras frente aos antifúngicos

Espécies	CIMs (µg/mL)									
	Cetoconazol		Itraconazol		Fluconazol		Anfotericina B		5Fluorocitosina	
	50	90	50	90	50	90	50	90	50	90
C. albicans	>32	>32	>32	>32	>256	>256	0,75	1,5	2,0	>32
C. parapsilosis	0,19	>32	0,023	2,0	8,0	32	0,75	2,0	>32	>32
C, tropicalis	>32	>32	>32	>32	>256	>256	0,75	3,0	>32	>32
C.guilliermondii	0,25	4,0	0,047	4,0	6,0	12	0,5	6,0	>32	>32
C. glabrata	0,38	12	1,5	>32	24	>32	0,5	3,0	0,75	>32
Trichosporon sp	6,0	>32	1,0	8,0	24	>256	4,0	4,0	>32	>32

CIM50 – Concentração fungicida ou fungistática que inibe 50% das amostras

CIM90 - Concentração fungicida ou fungistática que inibe 90% das amostras

SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA



Porcentagem de amostras sensíveis segundo os critérios do NCCLS

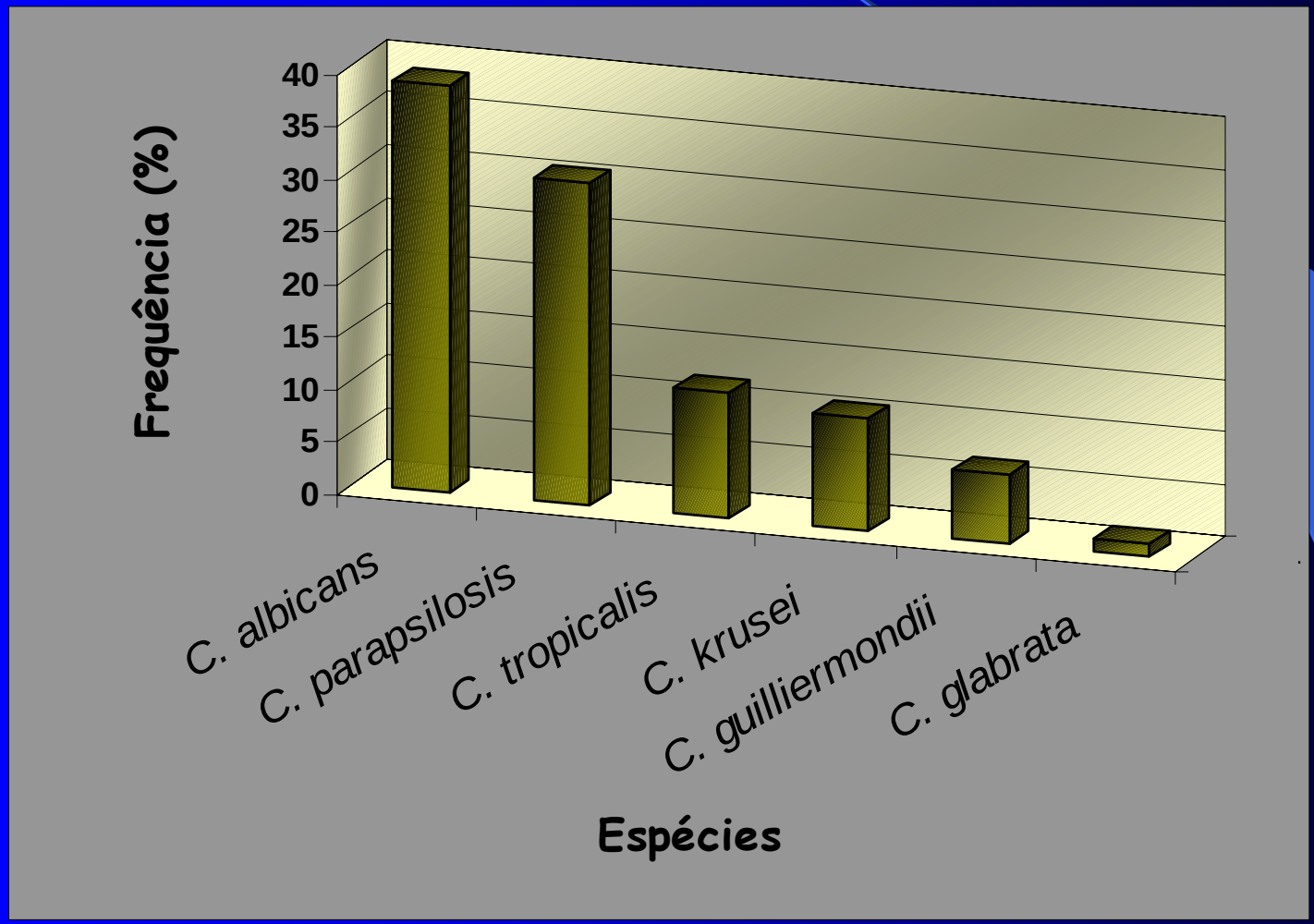
Espécies de *Candida* (N°)	Antifúngicos n(%)					
	5FC	KZ	FZ	IZ	AB	VZ
C. albicans (16)	8(50)	5(31)	5(31)	7(44)	11(69)	6(66.7)
C. parapsilosis (28)	7(25)	20(71)	25(89)	24(86)	21(75)	12(100)
C. tropicalis (11)	3(27)	0	1(9)	1(9)	6(55)	5(83)
C. guilliermondii (7)	2(29)	4(57)	6(86)	4(57)	3(43)	6(100)
C. glabrata (11)	8(73)	5(45)	7(64)	3(27)	8(73)	1(100)
C. krusei (2)	1(50)	2(100)	2(100)	2(100)	0	1(100)
Trichosporon sp (5)	1(20)	0	3(60)	1(20)	1(20)	-
Total (80)	30(38)	36(45)	49(61)	38(48)	50(63)	31(87)

HOSPITAL II: HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU, SP

HOSPITAL II - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU, SÃO PAULO - FUNGEMIA

- Nº de leitos → 375
- atendimento de crianças e adultos
- classe → renda baixa
- clínicas com maior n° de casos → UTI neonatal
- Dados de 1999 a 2001

Frequência das espécies de leveduras isoladas de sangue de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP.



Sensibilidade das 75 amostras de *Candida* isoladas de sangue de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP, frente aos antifúngicos estudados.

Droga Antifúngica	MIC (μg/mL)		
	MIC 50	MIC 90	Variações do MIC
Cetoconazol	0.154	13.25	0.016 - ≥ 32
Fluconazol	6.09	126	0.016 - ≥ 256
5-Fluorcitosina	0.012	0.079	0.002 - ≥ 32
Anfotericina B	0.135	0.89	0.002 - ≥ 32
Itraconazol	0.016	0.718	0.002 - ≥ 32

Cetoconazol → concentração de 0.002 a 32μg/mL

Fluconazol → concentração de 0.016 a 256μg/mL

5-Fluorcitosina → concentração de 0.002 a 32μg/mL

Anfotericina B → concentração de 0.002 a 32μg/mL

Itraconazol → concentração de 0.002 a 32μg/mL

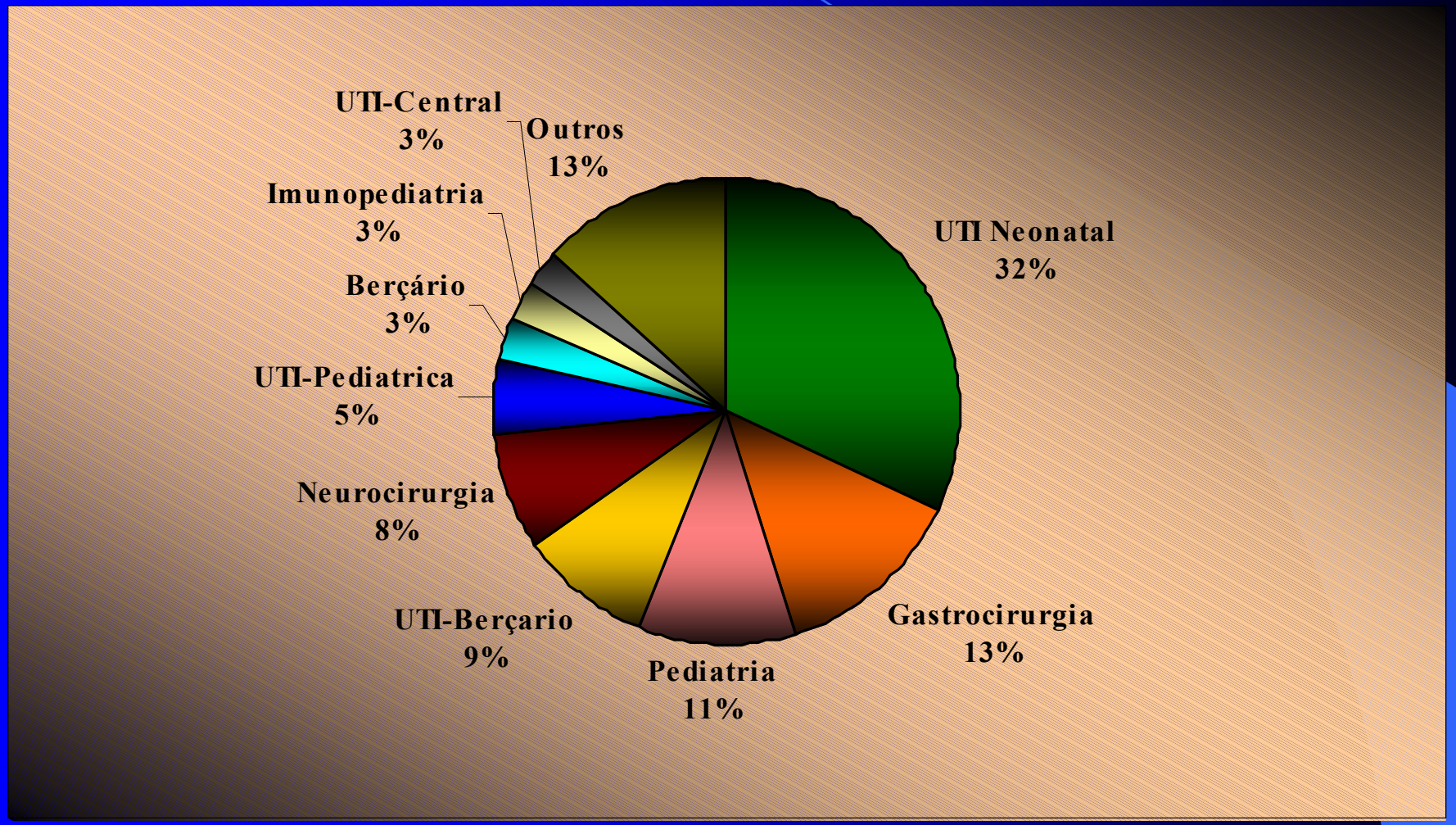
Sensibilidade das espécies de *Candida* isoladas de pacientes com fungemia no Hospital das Clínicas de Botucatu, SP.

	CIMs (µg/mL)									
Espécies	**Cetoconazol**		**Itraconazol**		**Fluconazol**		**AnfotericinaB**		**5Fluorocitosina**	
	50	**90**	**50**	**90**	**50**	**90**	**50**	**90**	**50**	**90**
C. albicans	0.131	9.16	0.014	0.492	4.5	138	0.084	0.263	0.013	0.097
C. parapsilosis	0.119	0.639	0.016	0.47	6.6	20.53	0.35	1.35	0.013	0.026
C, tropicalis	0.22	24.85	0.04	22.39	3.5	6.4	0.118	0.321	0.01	17.6
C. krusei	0.125	3	0.012	6.6	2.75	35.20	0.22	1.2	0.009	0.017
C.guilliermondii	0.75	1.75	0.44	0.44	13.5	152	0.05	0.44	0.009	15.96
C. glabrata	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Perfil de sensibilidade das leveduras segundo critério do NCCLS

Espécies de *Candida* (n°)	Droga Antifúngica n (%)					
	5-Fc	**Ke**	**Fl**	**Itra**	**AB**	**Vz**†
C. albicans* (29)	27(93)	25(86)**	23(79)	24(83)	29(100)	13(93)
***C. parapsilosis* (23)**	23(100)	23(100)	15(65)	6(78)	21(91)	7(85)
***C. tropicalis* (09)**	7(78)	5(56)	5(56)	6(67)	9(100)	6(67)
***C. krusei* (08)**	8(100)	8(100)	5(63)	6(75)	8(100)	2(100)
***C. guilliermondii* (05)**	4(80)	5(100)	1(20)	1(20)	5(100)	2(100)
***C. glabrata* (01)**	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	-
Total (75)	70(93)	67(89)	52(64)	44(75)	73(97)	30(86)

Distribuição, segundo o serviço médico, das 75 amostras de leveduras isoladas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP.



HOSPITAL III: HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE TAUBATÉ, SP

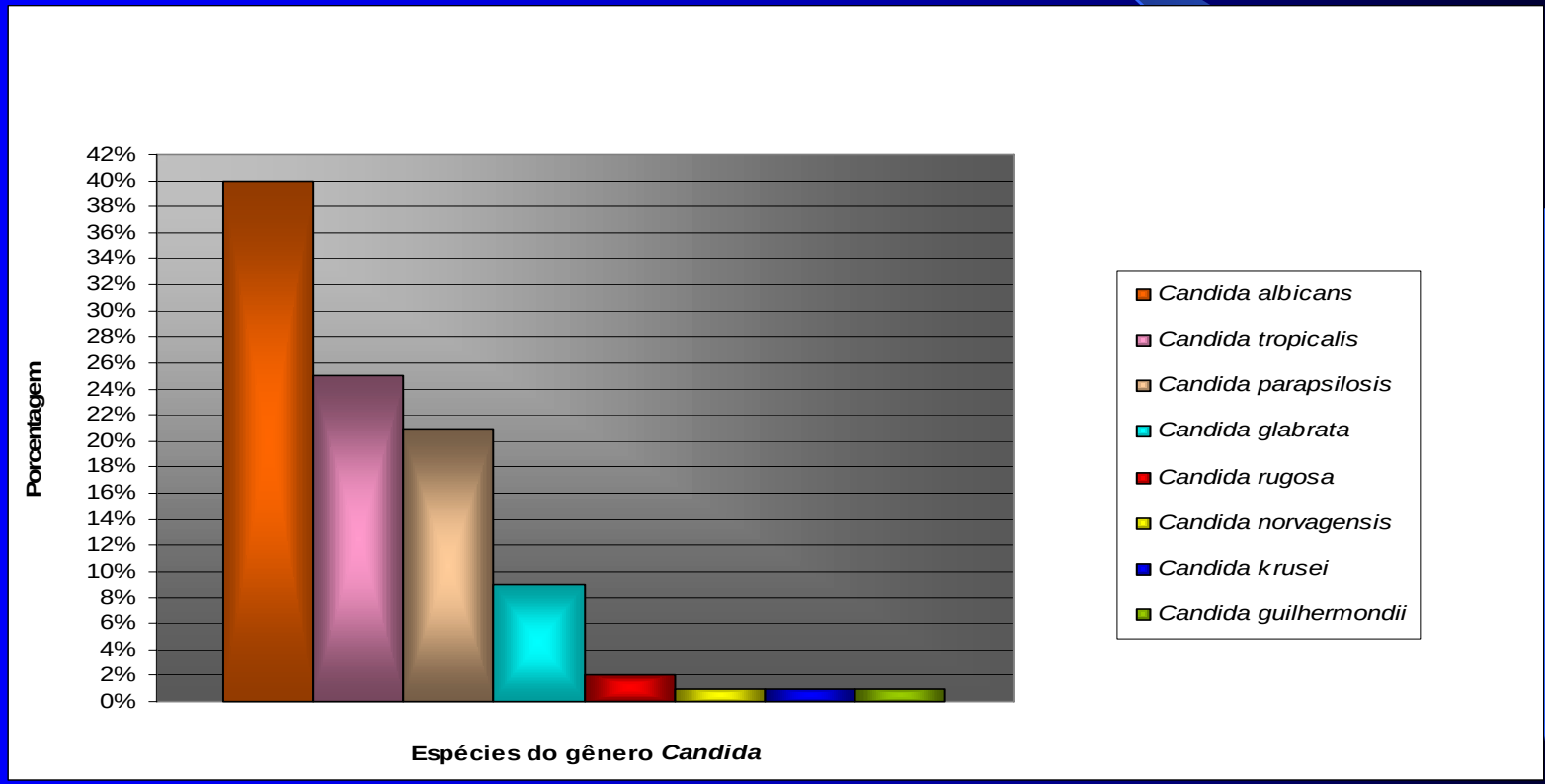
HOSPITAL III – HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE TAUBATÉ-SÃO PAULO (sangue, cateter e secreções)

- Nº de leitos → 170
- atendimento de crianças e adultos
- classe → renda baixa
- clínica com maior n° de casos → UTI adultos
- Dados de 2002 a 2003

Freqüência das espécies de Leveduras Isoladas de Diversos Materiais Clínicos em um Hospital Público de Taubaté - SP

Espécies	Quantidade	Porcentagem
Candida albicans	40	37%
Candida tropicalis	25	24%
Candida parapsilosis	21	20%
Candida glabrata	09	9%
Candida rugosa	02	2%
Candida norvagensis	01	1%
Candida krusei	01	1%
Candida guillermondii	01	1%
Saccharomyces cerevisiae	01	1%
Trichosporon asahii	02	2%
Hansenula sp.	01	1%
Não identificado	01	1%
Total	105	100%

Freqüência das leveduras do gênero *Candida* isoladas de diversos materiais clínicos de Hospital Universitário de Taubaté



Resultados de CIM50 e CIM90 das amostras frente aos antifúngicos

	CIMs (µg/mL)									
Espécies	**Cetoconazol**		**Itraconazol**		**Fluconazol**		**AnfotericinaB**		**5Fluorocitosina**	
	50	**90**	**50**	**90**	**50**	**90**	**50**	**90**	**50**	**90**
C. albicans	**0,023**	**>32**	**0,38**	**>32**	**1,0**	**>256**	**0,125**	**>32**	**1,0**	**>32**
C. parapsilosis	**0,032**	**>32**	**0,064**	**>32**	**1,0**	**4,0**	**0,25**	**>32**	**>32**	**>32**
C, tropicalis	**1,5**	**>32**	**>32**	**>32**	**4,0**	**>256**	**1,5**	**3,0**	**2,0**	**>32**
C. glabrata	**1,0**	**>32**	**>32**	**>32**	**>256**	**>256**	**0,75**	**>32**	**1,5**	**6,0**

Porcentagem de amostras sensíveis segundo os critérios do NCCLS

Espécies de *Candida* (N°)	Antifúngicos n(%)				
	5FC	KZ	FZ	IZ	AB
C. albicans (17)	19(74)	20(74)	23(81)	19(70)	20(74)
C. parapsilosis (13)	6(46)	9(69)	12(92)	8(62)	6(46)
C. tropicalis (14)	7(50)	4(29)	11(79)	4(29)	5(36)
C. glabrata (6)	5(83)	1(17)	2(33)	1(17)	4(67)
Total (60)	37(62)	34(57)	48(80)	32(53)	35(58)

HOSPITAL IV: HOSPITAL PÚBLICO DO RIO DE JANEIRO, RJ

Perfil de sensibilidade frente a antifúngicos de leveduras isoladas em Hospital Público do Rio de Janeiro, RJ - Fungemia

Espécies de *Candida* (n=40)	Droga Antifúngica (%)				
	5-Fc	Ke	Fl	Itra	AB
C. albicans (13)*	-	8	25	17	58
C. parapsilosis (15)	0	53	33	13	13
C. tropicalis (04)	0	25	0	25	50
C. guilliermondii (05)	0	60	20	0	0
C. famata (02)	0	0	0	0	0
C. lusitaniae (01)	0	0	0	0	0

Teste de difusão em ágar – perfil de sensibilidade segundo fabricante (CECON)
Prof. Dr. Francisco de Assis Baroni – UFRRJ
Mestrando Geraldo Oliveira - UFRRJ

ANTIFÚNGICOS ESTUDADOS

- Polienicos
- AnfotericinaB*
- ✓Nistatina

- ✓Fluorocitosina*

- Azólicos

- ✓IMIDAZÓLICOS
- ✓Cetoconazol*
- ✓Miconazol
- ✓TRIAZÓLICOS]
- ✓Fluconazol*
- ✓Itraconazol*

NOVOS ANTIFÚNGICOS

- **TRIAZÓLICOS**
  - ✓ **VORICONAZOL*;**
  - ✓ **POSOCONAZOL;**
  - ✓ **RAVUCONAZOL**

- ✓ **CASPOFUNGINA.**

(único que age na parede)

Perfil de Sensibilidade de 300 Amostras Hospitalares de Leveduras, São Paulo-SP

ESPÉCIES DE LEVEDURAS (Nº)	5- Fluorocitosina	Cetoconazol	Fluconazol	Itraconozol	Anfotericina B	Voriconazol†
C. albicans (138)*	88**	87	88	83	100	82
C. parapsilosis (64)	56	81	81	78	94	95
C. tropicalis (48)	52	48	50	40	85	75
C. glabrata (23)	78	52	65	30	83	71
C. guilliermondii (12)	50	75	58	42	67	100
C. krusei (10)	90	100	70	80	90	100
Trichosporon sp (05)	20	0	60	20	20	-
Total (300)	70	74	75	67	90	84

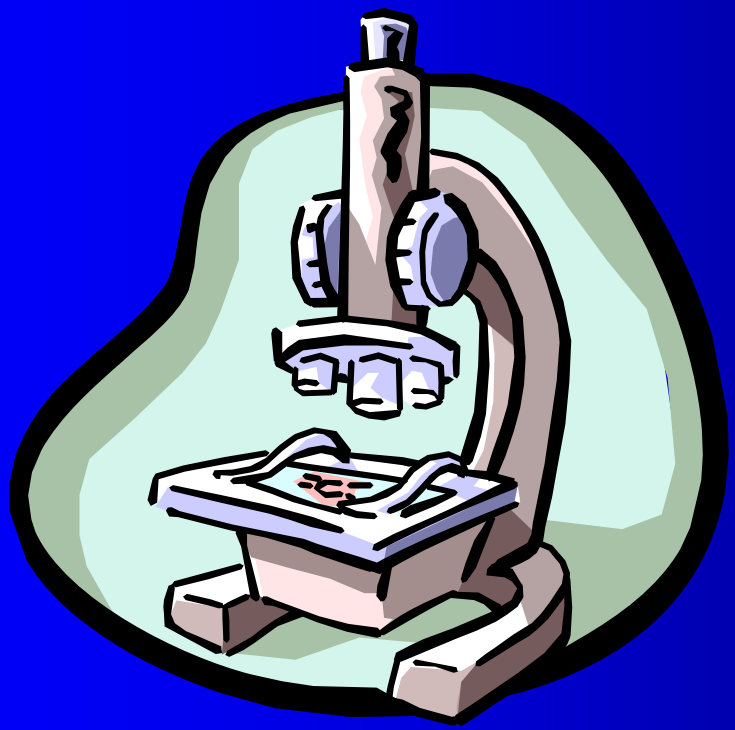
Empregamos o "Kit" comercial "E-Test" (AB-BIODISK-Suécia).

(*) Número de amostras testadas.

(**) Percentual de amostras sensíveis.

(†) Foram estudadas 100 amostras frente ao voricomazol.

LEVEDURAS



CANDIDA

PORTANTO...

- Faz-se necessário estabelecer e padronizar testes de sensibilidade antifúngica "in vitro", factíveis, na tentativa de controlar as infecções fúngicas nosocomiais e minimizar o risco da emergência de resistência a antifúngicos;

- Diagnóstico adequado (casuística subestimada)

- Necessidade de realizar estudos de correlação dos resultados "in vitro" e "in vivo";

- Pesquisa de novos fármacos:

- Realização de simpósios e afins, sobre o tema, reunindo os vários grupos de pesquisadores brasileiros.