



Original

Sensibilidad de aislamientos de *Candida albicans* de hemocultivos a 3 fármacos: estudio retrospectivo en Rio Grande do Sul, Brasil, 1999 a 2009[☆]

Antonella Souza Mattei^{a,*}, Sydney Hartz Alves^{b,c}, Débora Alves Mario^c, Guilherme Watted^d, Cecília Bittencourt Severo^e, Luciana da Silva Guazzelli^e, Flávio de Mattos Oliveira^e y Luiz Carlos Severo^f

^a Programa de Pós-graduação em Ciências Pneumológicas, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre/Rio Grande do Sul, Brasil

^b Departamento de Microbiologia y Parasitología, Universidad Federal de Santa Maria, Santa Maria/Rio Grande do Sul, Brasil

^c Laboratorio de Micología, Universidad Federal de Santa Maria, Santa Maria/Rio Grande do Sul, Brasil

^d Programa de Pós-graduação em Salud Colectiva, Universidad del Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo/Rio Grande do Sul, Brasil

^e Laboratorio de Micología, Hospital Irmandade Santa Casa de Misericórdia, Universidad Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

^f Facultad de Medicina, Universidad Federal de Rio Grande del Sul, Porto Alegre/Rio Grande do Sul, Brasil

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 26 de octubre de 2012

Aceptado el 8 de febrero de 2013

On-line el 14 de marzo de 2013

Palabras clave:

Candida albicans
Candidemia
Anfotericina B
Fluconazol
Anidulafungina

R E S U M E N

Antecedentes: La candidiasis es una de las micosis más importantes entre las frecuentes infecciones invasivas por hongos en pacientes hospitalizados; por esta razón, el tratamiento antifúngico es un desafío constante.

Objetivos: Este estudio evaluó la sensibilidad *in vitro* de aislamientos clínicos de *Candida albicans* procedentes de hemocultivos a fluconazol, anfotericina B y anidulafungina, aislados en un hospital del sur de Brasil.

Métodos: Para los estudios de sensibilidad *in vitro* se testaron 153 aislamientos de *C. albicans* frente a los fármacos mencionados, en concordancia con el *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Se determinaron las concentraciones inhibitorias y fungicidas mínimas (CMI y CMF, respectivamente) de cada fármaco y el punto de corte epidemiológico (ECV).

Resultados: Todas las cepas fueron susceptibles a anidulafungina, con la CMI y CMF $\leq 1 \mu\text{g/ml}$; sin embargo, cuando se comparó con el ECV, un 3% de los aislamientos presentó valores más altos. Con relación al fluconazol, un 96% fue sensible, un 3%, susceptible dependiente de la dosis, y un 1%, resistente. Sin embargo, se observó que el 21% de los aislamientos presentó valores mayores que el ECV. Bajo la acción de la anfotericina B, una de las cepas fue resistente y, el resto, susceptible, de acuerdo con la CMF; por otro lado, un 1,5% de los aislamientos presentó valores mayores al ECV.

Conclusiones: Los aislamientos de *C. albicans* presentaron mayor sensibilidad a la anidulafungina y un 90% de estas cepas (CMI₉₀) presentó los menores valores frente a la anfotericina B. Basados en el ECV y la nueva clasificación descrita por Pfaller, los aislamientos podrían ser resistentes a fluconazol, lo que demuestra la importancia de la asociación y revisión de estos parámetros.

© 2012 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Susceptibility of *Candida albicans* blood isolates to 3 antifungal drugs: Retrospective study in Rio Grande do Sul, Brazil, 1999-2009

A B S T R A C T

Background: Candidiasis is one of the most important among recurrent invasive yeast infections in patients, thus antifungal treatment becomes a challenge.

Aims: The aim of this study was to evaluate the *in vitro* activity of clinical *Candida albicans* isolates from blood cultures to fluconazole, amphotericin B and anidulafungin, in a hospital from Rio Grande do Sul, Brazil.

Methods: The susceptibility of 153 isolates to the 3 drugs mentioned was tested according to Clinical and Laboratory Standards Institute. Minimal inhibitory and fungicidal concentrations (MIC, MFC, respectively) of each drug were determined, as well as the epidemiological cutoff value (ECV).

Keywords:

Candida albicans
Candidemia
Amphotericin B
Fluconazole
Anidulafungin

[☆] Ese manuscrito es parte de la tesis de doctorado del primer autor.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: antonella.mattei@hotmail.com (A.S. Mattei).

Results: All of the isolates were susceptible to anidulafungin, MIC and MFC $\leq 1 \mu\text{g/ml}$; however, when compared with ECV, 3% of the isolates exhibited higher values against fluconazole, 96% were susceptible, 3% susceptible dose-dependent, and 1% resistant. Also, it was observed that 21% of the isolates exhibited higher values than ECV. One isolate was resistant to amphotericin B; the other ones, susceptible, based on the MFC; furthermore, 1.5% of the isolates exhibited higher values.

Conclusions: *C. albicans* isolates exhibited more susceptibility to anidulafungin, and 90% of them (MIC₉₀) exhibited the lowest values against amphotericin B. Based on ECV and Pfaller classification, isolates could be resistant to fluconazole, demonstrating the importance of the combination of these parameters.

© 2012 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Las infecciones invasivas por hongos en pacientes hospitalizados son frecuentes a causa de la inmunosupresión, del uso prolongado de antibióticos o corticosteroides, de la nutrición parenteral y de los procedimientos invasivos; en consecuencia, una alta tasa de mortalidad es observada^{1,11,13}.

La candidiasis es una micosis cutánea o sistémica, causada por *Candida* y clasificada como el cuarto tipo de infección que afecta al tejido sanguíneo, lo que contribuye al aumento de la morbilidad, de los costes y del tiempo de hospitalización^{3,22}.

En las unidades de cuidados intensivos (UCI), las candidemias constituyen un grave problema, debido a que la permanencia prolongada de los pacientes en las mismas trae como consecuencia la colonización por *Candida*, principalmente *Candida albicans*¹¹. Recientemente, un estudio realizado en Brasil describió que *C. albicans* es la principal especie en episodios de candidemia⁴.

La gran mayoría de los aislamientos clínicos de *C. albicans* es sensible a fluconazol; sin embargo, se puede observar resistencia clínica durante el tratamiento^{9,15,18,23}. La anfotericina B es un antifúngico poliénico ampliamente utilizado en la práctica clínica, a pesar de su elevada toxicidad³. Así, en 2005, surgió una nueva alternativa terapéutica para el tratamiento y la prevención de la candidiasis: la anidulafungina, una de las equinocandinas aprobada por la *United States Food and Drug Administration* (FDA)¹⁶, que ha demostrado ser más eficaz que el fluconazol²³.

La anidulafungina se diferencia de las otras equinocandinas en que no se metaboliza en el hígado, su degradación es química, posee un volumen de distribución equivalente al volumen acuoso total corporal y una semivida biológica más larga que sus congéneres. Diversos estudios muestran una excelente actividad *in vitro* de este antifúngico sobre *Candida*, con valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) menores que los obtenidos con la caspofungina y la micafungina^{10,12,16}.

El objetivo de este estudio fue evaluar la sensibilidad *in vitro* a fluconazol, anfotericina B y anidulafungina de aislamientos clínicos de *C. albicans* procedentes de hemocultivos.

Materiales y métodos

Aislamientos

Se utilizaron 153 aislamientos de *C. albicans* procedentes de hemocultivos procesados de 1999 a 2009 en el Hospital Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Las muestras fueron identificadas por el método semi-automatizado ID 32C® (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francia) y almacenadas en agua destilada a -20°C hasta el momento de realizar el presente estudio.

Fármacos

La anfotericina B (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE. UU.), la anidulafungina y el fluconazol (Pfizer, Inc., New York, NY, EE. UU.) fueron obtenidos en polvo estándar a través del fabricante,

y preparados de acuerdo con el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) en su documento M27-A3^{5,6}.

Prueba de sensibilidad antifúngica

La prueba de microdilución en caldo se realizó de acuerdo con el CLSI M27-A3, y se utilizó el inóculo con una concentración final de $1,5 \pm 1,0 \times 10^3$ cél/ml en medio RPMI-1640, incubado a 35°C durante 24 - 48 h. La CMI se determinó por la concentración más baja capaz de producir la disminución de la turbidez en comparación con el control positivo de los fármacos (fluconazol y anidulafungina $\geq 50\%$ y anfotericina B $\geq 90\%$). La concentración mínima fungicida (CMF), realizada para pruebas con anfotericina y anidulafungina, se determinó mediante el subcultivo de 10 μL de cada pocillo de la microplaca que presentó ausencia de turbidez, en placas que contenían agar Sabouraud con posterior incubación a 35°C durante 48 h.

Análisis de los resultados

Se realizó la media geométrica de las CMI y CMF de cada fármaco, así como determinar la concentración capaz de inhibir el 50% y el 90% de los aislamientos. Se establecieron puntos de corte clínicos (CBP) de acuerdo con el CLSI^{5,6} para el fluconazol (aislamientos sensibles: CMI $\leq 8 \mu\text{g/ml}$; de 16 a 32 $\mu\text{g/ml}$, aislamientos sensibles con dependencia de la dosis, $y \geq 64 \mu\text{g/ml}$, resistentes), anidulafungina ($\leq 2 \mu\text{g/ml}$, sensibilidad, $y > 2 \mu\text{g/ml}$, aislamientos no sensibles) y anfotericina B ($\leq 1 \mu\text{g/ml}$, aislamientos sensibles, $y \geq 2 \mu\text{g/ml}$, resistentes). También se evaluaron los CBP de acuerdo con Pfaller et al.^{15,19,21}, que describieron que concentraciones $< 1 y \geq 1 \mu\text{g/ml}$ de anfotericina B son consideradas de sensibilidad y resistencia, respectivamente. Con relación al fluconazol, cepas con concentraciones $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ son consideradas sensibles, con 4 $\mu\text{g/ml}$, sensibles dependientes de la dosis, $y \geq 8 \mu\text{g/ml}$, resistentes. Para la anidulafungina, los aislamientos con valores $\leq 2 \text{ mg/ml}$ son considerados sensibles, con 4 mg/ml intermedios, y resistentes a partir de 8 mg/ml . Por otra parte, se obtuvieron los puntos de corte epidemiológicos (ECV) para los fármacos utilizados, de acuerdo con Turnidge et al.²⁴, que consideran la distribución de la CMI obtenida, la moda de la CMI de cada uno de los fármacos y la variabilidad de la prueba. En general, el ECV es aproximadamente 2 diluciones sobre la moda, y abarca un 95% de los valores de la distribución de la CMI obtenidos. Estos ECV son medidas sensibles para valorar aislamientos emergentes con menor sensibilidad a los mencionados fármacos.

Resultados

El número de aislamientos de *C. albicans* de hemocultivos obtenidos durante 10 años de estudio (1999 a 2009) y su sensibilidad a cada uno de los antifúngicos utilizados en este trabajo, de acuerdo con los valores CMI y ECV, se describen en la [tabla 1](#).

Los valores de las CMI y CMF de los fármacos: fluconazol, la anfotericina B y la anidulafungina frente a los aislamientos de *C. albicans*

Tabla 1

Sensibilidad de los aislamientos de *C. albicans* obtenidos de hemocultivos, frente a anfotericina B, anidulafungina y fluconazol, en el periodo de 1999 a 2009

Fármacos (ECV µg/ml)	Año	n	CMI (µg/ml)		
			Rango	Moda	
Anfotericina B (1 µg/ml)	1999	2	0,015-0,03	-	
	2000	4	0,125-0,25	0,125	
	2001	3	0,03-0,125	0,03	
	2002	6	0,03-0,25	0,125	
	2003	3	0,03-0,125	0,03	
	2004	1	0,25	-	
	2005	20	0,003-0,25	0,03	
	2006	42	0,015-0,5	0,06	
	2007	25	0,003-0,25	0,03	
	2008	22	0,03-0,25	0,06	
	2009	25	0,03-0,25	0,06	
	Anidulafungina (1 µg/ml)	1999	2	0,003	-
		2000	4	0,003-0,06	0,015
2001		3	0,03-0,125	0,03	
2002		6	0,003-0,125	0,007	
2003		3	0,03-0,125	0,03	
2004		1	0,003	-	
2005		20	0,0015-0,06	0,003	
2006		42	0,0015-0,5	0,003	
2007		25	0,003-0,25	0,015	
2008		22	0,003-0,25	0,125	
2009		25	0,003-0,125	0,06	
Fluconazol (1 µg/ml)		1999	2	0,125-0,25	-
		2000	4	0,125-0,5	0,25
	2001	3	0,125-0,25	0,125	
	2002	6	0,25-4	0,5	
	2003	3	0,25-0,5	0,25	
	2004	1	0,5	-	
	2005	20	0,125-64	0,25	
	2006	42	0,125-16	0,125	
	2007	25	0,125-8	0,125	
	2008	22	0,125-2	0,125	
	2009	25	0,125-8	0,125	

CMI: concentración mínima inhibitoria; ECV: puntos de corte epidemiológicos.

se describen en la tabla 2. Cuando se compararon los resultados del promedio geométrico de las CMI de los 3 fármacos, se pudo observar que el valor más bajo se obtuvo para la anidulafungina; sin embargo, el valor más bajo de CMI₉₀ fue observado para la anfotericina B, y el valor mayor para el fluconazol. Al mismo tiempo, con relación al CMF₉₀, no se observó ninguna diferencia entre la anfotericina B y la anidulafungina. Por otro lado, el fluconazol es clasificado como fungistático.

De acuerdo con el CLSI^{5,6}, todas las cepas fueron sensibles a la anidulafungina, con la CMI y la CMF ≤ 1 µg/ml. No obstante, cuando se comparó con el ECV, un 3% (n=4) de los aislamientos presentó valores más altos. En relación con el fluconazol, un 96% (n=148) fue caracterizado como sensible, un 3% (n=4), como sensible dependiente de la dosis, y un 1% (n=1), como resistente. Asimismo, se observó que un 21% (n=31) de los aislamientos presentó valores mayores que el ECV. Con relación a la anfotericina B, todos los aislamientos fueron susceptibles; solo un aislamiento se caracterizó como resistente en base a la concentración fungicida. Además, el 1,5% (n=2) de los aislamientos presentó valores mayores a los valores de ECV.

Tabla 2

Sensibilidad (µg/mL) *in vitro* de 153 aislamientos de *Candida albicans* frente a anfotericina B, anidulafungina y fluconazol

Antifúngico	CMI (µg/ml)				CMF (µg/ml)			
	MG	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀	MG	Rango	CMF ₅₀	CMF ₉₀
Fluconazol	0,4	0,125 a 64	0,25	2	-	-	-	-
Anfotericina B	0,06	0,003 a 0,5	0,06	0,03	0,12	0,003 a 2	0,125	0,25
Anidulafungina	0,017	0,0015 a 0,5	0,015	0,125	0,05	0,0015 a 1	0,06	0,25

CMF: concentración mínima fungicida; CMI: concentración mínima inhibitoria; MG: media geométrica; -: prueba no realizada debido a que el fluconazol es clasificado como fungistático.

Cuando se utilizó la clasificación hecha por Pfaller et al.^{15,19,21}, todas las cepas resultaron sensibles a la anidulafungina. Con relación a la anfotericina B y al fluconazol, hubo cambios en la clasificación de las cepas. La comparación valores obtenidos con de los antifúngicos de acuerdo con Pfaller et al.^{15,19,21} y el CLSI^{5,6} arrojó diferencias estadísticamente significativas en la prueba de chi-cuadrado de Pearson, con p=0,035 (tabla 3).

Discusión

El uso de las pruebas de sensibilidad antifúngica *in vitro* tiene como finalidad detectar aislamientos de *Candida* potencialmente resistentes. De este modo, constituye una ayuda en el tratamiento rápido y eficaz de la candidiasis¹⁶. El CBP se utiliza para indicar cuáles de los aislamientos responden comúnmente al tratamiento con la dosis recomendada de cada fármaco, mientras que el ECV se puede utilizar como una medida más sensible para las cepas emergentes con una menor sensibilidad al fármaco utilizado¹⁵ y, de esta manera, la respuesta clínica puede ser diferente de lo esperado.

La mayoría de los aislamientos (96%) fueron sensibles al fluconazol; sin embargo, cuando se utilizó el ECV, un 21% de los aislamientos presentó una menor sensibilidad, lo cual no se puede observar por medio del CBP. Un porcentaje similar han observado Pfaller et al.¹⁵; según los autores, un 15% de los aislamientos presentó valores de CMI mayores que el ECV; por otro lado, la mayoría de los estudios utiliza el CBP^{8,10-12}, con lo cual, se observan resultados similares a los obtenidos en nuestra investigación, que describe a la mayoría como sensibles, y a un 5% de los aislamientos como resistentes al fluconazol.

Solo un aislamiento fue resistente al fluconazol. Frente a la anidulafungina, presentó una CMI de 0,003 µg/ml, una de las concentraciones más bajas, que demostró, así, la alta eficacia de esta equinocandina. Pfaller et al.²⁰ realizaron una prueba con 41 aislamientos resistentes a fluconazol. La CMI₉₀ frente a la anidulafungina fue de 0,06 mg/ml, sin que se encontrara resistencia cruzada entre ambos antifúngicos, aunque no se ha confirmado que esta resistencia no exista¹⁶. El fluconazol, como todos los azoles, actúa inhibiendo la enzima lanosterol 14- α -desmetilasa del citocromo P450, que convertiría el lanosterol en ergosterol, un constituyente de la membrana celular de los hongos. La resistencia observada en nuestro estudio puede haber tenido lugar por la cantidad y calidad del lugar de unión de la enzima o por la reducción del acceso del fármaco a este lugar. Además, existe la posibilidad de la mutación del gen que codifica el lugar de unión de la enzima, con lo que disminuye la afinidad al fluconazol, y su sobreexpresión resultaría en la necesidad de altas concentraciones del fármaco para inhibir la presencia de la enzima en el interior de la célula. Otra posibilidad sería la salida del fármaco por las bombas de eflujo presentes en el hongo^{14,15}.

Con relación a la anidulafungina, todos los aislamientos fueron sensibles de acuerdo con el CBP (tabla 1), mientras que el 3% de estos presentaron una menor sensibilidad según el ECV. La resistencia a las equinocandinas ha sido relatada en aislamientos de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*, resultante de la mutación en la subunidad Fksp de la enzima β -(1,3)-D-glucano sintasa, sin la necesidad de

Tabla 3

Valores obtenidos con los antifúngicos ensayados, clasificados en sensibles, intermedios, sensibles-dosis dependiente y resistentes, de acuerdo con Pfaller et al. y el Clinical and Laboratory Standards Institute

Antifúngicos	Sensible (n)		Intermedio/SSD (n)		Resistente (n)	
	A	B	A	B	A	B
Fluconazol	141	148	3	4	9	1
Anidulafungina	153	153	0	0	0	0
Anfotericina B	151	152	-	-	2	1

A: Pfaller et al.^{15,19,21}; B: *Clinical and Laboratory Standards Institute*^{5,6}; SSD: susceptible dependiente de la dosis; -: no se dispone de la clasificación (p=0,035).

que la CMI sea mayor de 2 µg/mL en estos aislamientos^{2,14,16,20}. Además, la menor sensibilidad *in vitro* a las equinocandinas y el fracaso clínico no siempre están vinculados¹³.

Varios estudios han tratado de determinar la sensibilidad de los aislamientos de *Candida* a las equinocandinas; en ellos, la mayoría de los valores encontrados fluctuaban entre 0,03 y 0,06 µg/mL^{12,16-18,20,23}, lo que coincide con los resultados de este estudio. Pfaller et al.¹⁶ describen que un 1,2% de los aislamientos de *C. albicans* de hemocultivos podrían ser resistentes a anidulafungina cuando se utiliza el ECV, de acuerdo con lo que se observó en este estudio. Por lo tanto, se podría predecir qué aislamientos podrían responder de manera diferente a lo esperado durante el tratamiento.

Todos los aislamientos fueron sensibles a anfotericina B, mientras que en el CMF solo uno fue resistente de acuerdo con Pfaller et al.²¹, lo que coincide también con Boff et al.³, que demostraron la sensibilidad de *C. albicans* a ese fármaco por la CMI y la CMF. Cuando se utilizó el ECV, un 1,5% de los aislamientos presentó valores mayores. Pfaller et al.²¹ describieron un valor de ECV mayor (2 µg/ml) que en nuestro estudio. La resistencia a la anfotericina B puede estar asociada con el aumento o disminución de los esteroides de la membrana o, incluso, con la producción de proteínas y enzimas fúngicas que actuarían en el fármaco⁷, lo que puede explicar el fracaso del tratamiento.

Pfaller et al.^{15,19,21} han descrito diferencias en los CBP utilizados por CLSI^{5,6}; esto también se observó en nuestro estudio, con diferencia estadística y p=0,035 (tabla 3).

Con estos nuevos CBP, que son específicos de especie, se pueden identificar aislamientos resistentes y que fueron previamente catalogados como sensibles, con un resultado satisfactorio en el tratamiento^{15,19}. De esta manera, deberían considerarse estos nuevos CBP en los CLSI.

La mayoría de los estudios sobre la sensibilidad *in vitro* solo utiliza la CMI y, en comparación con este estudio, los aislamientos de *C. albicans* serían sensibles a anfotericina B^{1,4,8,11,12}. No obstante, a través de la CMF, un aislamiento sería resistente, lo que demuestra la importancia de esta evaluación. Cuando se testó el aislamiento resistente a la anfotericina B frente a la anidulafungina, se observó que era sensible y presentaba la concentración más baja (0,0015 µg/ml). Pfaller et al.²¹ y Rambach et al.²² utilizaron, además del CBP, el cálculo del ECV, lo que demostró la importancia del seguimiento de especies con sensibilidad reducida.

Utilizar solamente el valor de CMI elevado para definir la resistencia frente a un fármaco no es suficiente, es necesario tener en cuenta las características de la posible mutación del gen de la resistencia, lo que es posible a través del ECV.

Conclusión

Con los resultados de este trabajo se concluyó que los aislamientos de *C. albicans* presentan mayor sensibilidad a anidulafungina; sin embargo, los valores más bajos obtenidos en el 90% de los aislamientos (CMI₉₀) se deben a la acción de la anfotericina B. Asimismo, a través del ECV y la nueva clasificación descrita por Pfaller, los

aislamientos podrían ser resistentes a fluconazol, lo que demuestra la importancia de la asociación y revisión de estos parámetros.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no hay conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Pfizer Inc. la donación de los fármacos utilizados en este estudio, y a la Coordinación de Perfeccionamiento de Personal de Nivel Superior (CAPES), la beca de doctorado del primer autor.

Bibliografía

1. Antunes A, Pasqualotto A, Diaz M, D'Azevedo P, Severo L. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: Species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2004;46:239-41.
2. Arendrup M, Garcia-Effron G, Lass-Flörl C, Lopez A, Rodriguez-Tudela J, Cuenca-Estrella M, et al. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* species: Comparison of EUCAST EDef 7.1, CLSI M27-A3, Etest, disk diffusion, and agar dilution methods with RPMI and isosensitest media. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:426-9.
3. Boff E, Lopes P, Spader T, Scheid L, Loreto E, dal Forno N, et al. Reavaliação da suscetibilidade de *Candida* à anfotericina B: estudo comparativo com isolados de três hospitais do Estado do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41:36-40.
4. Bonfietti L, Szesz M, Chang M, Martins M, Pukinskas S, Nunes M, et al. Ten-year study of species distribution and antifungal susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates at a Brazilian tertiary hospital. *Mycopathologia*. 2012;174:389-96.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeasts. Approved standard M27-A3, 3rd ed. Wayne: CLSI; 2008. p. 25.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeasts. Approved standard M27-S3, 3rd ed. Wayne: CLSI; 2008. p. 19.
7. Filippin F, Souza L. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Braz J Pharm Sci*. 2006;42:167-94.
8. Godoy P, Tiraboschi I, Severo L, Bustamante B, Calvo B, Almeida L, et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98:401-5.
9. Hazen K, Baron E, Colombo A, Girmenia C, Sanchez-Sousa A, del Palacio A, et al. Global Antifungal Surveillance Group. Comparison of the susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole and voriconazole in a 4-year global evaluation using disk diffusion. *J Clin Microbiol*. 2003;41:5623-32.
10. Labbé A, Pépin J, Patiño C, Castonguay S, Restieri C, Laverdiere M. A single-centre 10-year experience with *Candida* bloodstream infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2009;20:45-50.
11. Matta D, Almeida L, Machado A, Azevedo A, Kusano E, Travassos N, et al. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: Results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;57:399-404.
12. Ostrosky-Zeichner L, Rex J, Pappas P, Hamill R, Larsen R, Horowitz H, et al. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:3149-54.
13. Perlin D. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat*. 2007;10:121-30.
14. Pfaller M. Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med*. 2012;125 1 Suppl:S3-13.
15. Pfaller M, Andes D, Diekema D, Espinel-Ingroff A, Sheehan D. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: Time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist Updat*. 2010;13:180-95.
16. Pfaller M, Boyken L, Hollis L, Kroeger J, Messer S, Tendolkar S, et al. Use of epidemiological cutoff values to examine 9-year trends in susceptibility

- of *Candida* species to anidulafungin, caspofungin and micafungin. J Clin Microbiol. 2011;49:624–9.
17. Pfaller M, Boyken L, Hollis R, Messer S, Tendolkar S, Diekema D. In vitro activities of anidulafungin against more than 2,500 clinical isolates of *Candida* spp., including 315 isolates resistant to fluconazole. J Clin Microbiol. 2005;43:5425–7.
 18. Pfaller M, Castanheira M, Diekema D, Messer S, Moet G, Jones R. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Etest methods with the CLSI broth microdilution method for echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. J Clin Microbiol. 2010;48:1592–9.
 19. Pfaller M, Diekema D, Andes D, Arendrup M, Brown S, Lockhart S, et al., CLSI Subcommittee for Antifungal Testing. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: Integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. Drug Resist Updat. 2011;14:164–76.
 20. Pfaller M, Diekema D, Ostrosky-Zeichner L, Rex J, Alexander B, Andes D, et al. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against caspofungin, anidulafungin, and micafungin: Analysis and proposal for interpretive MIC breakpoints. J Clin Microbiol. 2008;46:2620–9.
 21. Pfaller M, Espinel-Ingroff A, Canton E, Castanheira M, Cuenca-Estrella M, Diekema D, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine, and itraconazole and *Candida* spp. as determined by CLSI broth microdilution. J Clin Microbiol. 2012;50:2040–6.
 22. Rambach G, Oberhauser H, Speth C, Lass-Flörl C. Susceptibility of *Candida* species and various moulds to antimycotic drugs: Use of epidemiological cutoff values according to EUCAST and CLSI in an 8-year survey. Med Mycol. 2011;49:856–63.
 23. Reboli A, Shorr A, Rotstein C, Pappas P, Kett D, Schlam H, et al. Anidulafungin compared with fluconazole for treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis caused by *Candida albicans*: A multivariate analysis of factors associated with improved outcome. BMC Infect Dis. 2011;11:2611–2618.
 24. Turnidge J, Kahlmeter G, Kronvall G. Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. Clin Microbiol Infect. 2006;12:418–25.