

# SUGESTII PENTRU ABORDAREA INFECȚIILOR FUNGICE LA BOLNAVUL CRITIC

Elena Copaciu, Elena Ursache, Marilena Lache\*

## REZISTENȚA LA ANTIFUNGICE- FACTOR DE RISC MAJOR PENTRU PROGNOSTICUL PACIENTULUI CRITIC

Antibioterapia cu spectru larg a crescut semnificativ speranța de viață la bolnavii cu infecții severe (după unii autori cu cca. 10 ani!), iar progresele suportului de funcții vitale în serviciile de Terapie Intensivă au crescut rata de supraviețuire la bolnavi cu patologii din ce în ce mai grave. Din păcate aceste succese medicale au însemnat în ultimii 15 ani și creșterea incidenței infecțiilor cu fungi, urmată la scurt timp de o tendință insidioasă, dar persistentă de creștere a rezistenței antifungice. Acest aspect a fost semnalat inițial la bolnavi cu potențial de imunodepresie severă (posttransplant sau postchimioterapie în oncologie); incidența rezistenței antifungice variază între 5% la bolnavii cu transplant renal și 35-40% la cei cu transplant de cord sau plămâni, aspect care se corelează cu o rată inacceptabil de mare a mortalității, de până la 40-50%! Până la 30% din bolnavii cu leucemie acută dezvoltă infecții fungice invazive. Candidemia este tot mai des semnalată însă la bolnavi cu staționare prelungită în clinicile de Terapie Intensivă, iar infecțiile fungice hematogene constituie în Statele Unite cea de patra cauză de infecții nosocomiale la bolnavul critic.

Datele statistice arată că tot mai mulți bolnavi internați în secțiile de Terapie Intensivă (și nu ne referim aici la bolnavii cu infecție HIV/SIDA, neoplazie sau transplant) sunt colonizați la porțile de intrare cu tulpini de fungi (cel mai adesea *Candida albicans*); există în permanență riscul unei infecții fungice invazive la bolnavul critic. Date fiind dificultatea diagnosticului clinic și a celui de laborator, terapia de primă intenție adecvată este decisivă pentru prognosticul bolnavului critic. Și în acest caz epidemiologia tulpinilor de fungi și rezistența la antifungice constituie aspecte majore pentru succesul terapeutic. Din fericire medicația antifungică (Fig. 1) a avut efecte semnificative asupra morbidității și mortalității prin infecții fungice, dar datele de epidemiologie ale ultimului deceniu relevă tendințe evolutive îngrijorătoare: creșterea circulației tulpinilor de *Candida nonalbicans*, reducerea ponderii infecțiilor candidozice per ansamblu, apariția rezistenței antifungice etc.

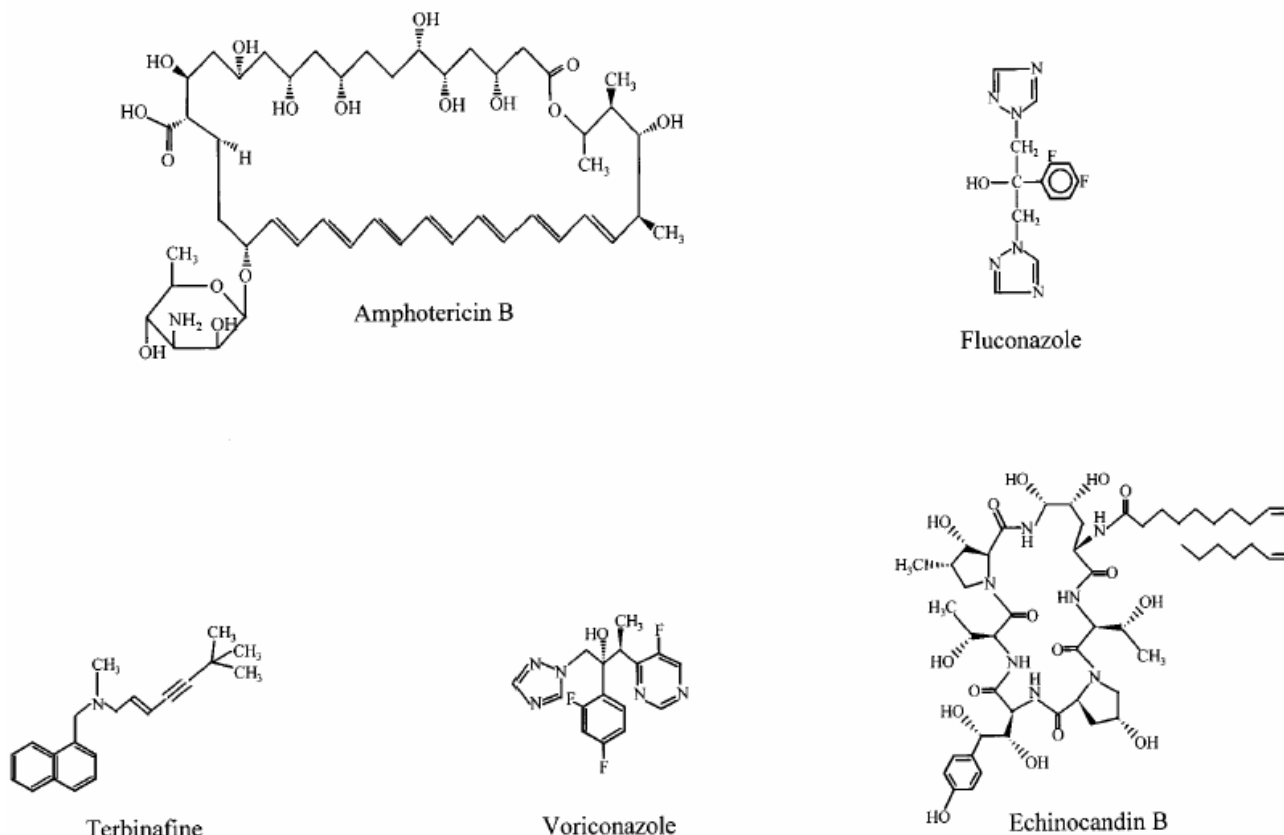
### Factori de risc pentru infecțiile cu fungi la bolnavul critic

Experiența acumulată la bolnavii cu imunodepresie severă (posttransplant, postchimioterapie în oncologie etc.) ne indică noi factori de risc pentru infecții fungice de tip oportunist de care nu este ferit bolnavul critic, cum ar fi: infecții cu tulpini oportuniste de *Aspergillus* sau *Fusarium* prezente în aer, în apa curentă din spital sau pe suprafețe contaminate cu apă. În special apa din spitale poate fi considerată o sursă importantă de infecții

Clinica ATI, Spital Universitar de Urgență București

\*Laborator Clinic, Spital Universitar de Urgență București

Fig. 1. Structura biochimică a principalelor antifungice



nosocomiale fungice! Alte surse de contaminare ar putea fi substanțe probiotice care pot conține *Saccharomyces boulardii* sau *cerevisiae* (folosite în prevenirea și tratamentul infecției intestinale cu *Clostridium difficile*, dar s-a demonstrat că pot contamina apa minerală îmbuteliată sau echipamentul de protecție din fibre sintetice ale personalului medical). La bolnavul critic prezența tulpinilor de *Aspergillus* în secrețiile tractului respirator este urmată de infecție invazivă la peste 50% din bolnavi!

#### Tendențe epidemiologice privind infecțiile fungice la bolnavul critic

**Reducerea incidenței infecțiilor candidozice.** Experții sunt de acord că utilizarea pe scară largă a profilaxiei și tratamentului infecțiilor fungice invazive cu Fluconazole în ultimii 15 ani a redus mult incidența infecțiilor cu *Candida*, dar aceasta se referă numai la infecțiile cu *Candida albicans*, în timp ce se înregistrează tendința de creștere a incidenței infecțiilor cu *Candida glabrata* și, în general, cu specii nonalbicans. Pentru Statele Unite se apre-

ciază incidența infecțiilor sistemice cu *Candida glabrata* la cca. 20% (12-37%), la 15% în Europa, cca. 10% în Asia și sub 5% în America Latină. Studii recente au arătat că în țări precum Brazilia, Norvegia sau Italia *Candida albicans* rămâne cea mai frecventă cauză de candidoză nosocomială, dar ultimul deceniu a înregistrat dublarea infecțiilor cu *Candida nonalbicans* (*parapsilosis*, *tropicalis* și *glabrata*) a căror incidență a crescut de la 31% în 1999, la 61% în 2003!

**Creșterea incidenței infecțiilor cu *Aspergillus* și alți fungi oportuniști.** Se pare că reducerea infecțiilor cu *Candida* se însoțește de creșterea numărului de infecții cu *Aspergillus*; și în cazul acestora ultimul deceniu a adus mutații lente, dar cu tendință persistentă de creștere a incidenței infecțiilor cu specii nonfumigatus, față de infecțiile cu *Aspergillus fumigatus*. Din fericire rare, infecțiile oportuniste cu *Fusarium*, *Scedosporium*, *Alternaria* etc. pot apărea la bolnavul imunodeprimat.

#### Definirea rezistenței antifungice

Din punct de vedere clinic, rezistența in vivo definește persistența sau progresia unei

infecții în ciuda unei terapii antimicrobiene adecvate, dar un răspuns clinic bun nu depinde numai de susceptibilitatea agentului patogen, ci mai ales de imunitatea gazdei, penetrabilitatea agentului antimicrobian, distribuția sa și concentrația fungicidă atinsă în focarul infecțios. Expunerea, din diverse motive, la concentrații suboptimale de agent antimicrobian este cauză de eșec terapeutic (ex.: subdozare sau fracționare incorectă a dozelor, reducerea absorbției la nivelul tubului digestiv - greață, vomă, diaree, mucozită, interacțiune cu alimentația sau medicația alcalină etc., cu modificarea biodisponibilității produsului după administrare orală, penetrabilitatea în țesutul infectat sau a barierei polimerice din biofilme etc.).

Rezistența *in vitro* se referă la concentrația minimă inhibitorie (CMI) a agentului terapeutic (concentrația serică/tisulară a agentului antifungic este mai mică decât CMI agentului antifungic pentru patogenul respectiv). Presupune rezistență primară - apare la un microorganism care nu a fost expus niciodată la agentul medicamentos respectiv, în timp ce rezistența secundară sau dobândită apare după expunerea microorganismului la drogul respectiv. Datele de laborator se bazează pe protocoalele de determinare a CMI breakpoint pentru a stabili sensibilitatea, rezistența sau sensibilitatea dependentă de doză pentru antifungice au fost stabilite de NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) din Statele Unite prin documentul M27 din 1992, revizuit recent (document M27 A). Au fost înregistrate progrese semnificative și în ceea ce privește determinarea sensibilității în cazul fungilor filamentoși, după cum provocarea cea mai mare în acest moment pare că o reprezintă definirea criteriilor de laborator pentru susceptibilitatea germenilor aflați în structura biofilmelor fungice, o formă complet diferită de existență a fungilor în organism față de cea planctonică pentru care sunt stabilite majoritatea criteriilor de diagnostic de laborator amintite mai sus.

Rezistența intrinsecă se referă la rezistența majorității covârșitoare a tulpinilor (ex. rezistența la Fluconazole a tulpinilor de *Candida krusei*), instalată anterior expunerii la drog a acestora. Termenul este similar cu cel de rezistență

primară. Termenul de „rezistență clinică” poate defini eșecul terapiei inițiale sau o nouă infecție cu o tulpină inițial sensibilă la antifungicul utilizat, dar la un bolnav la care s-a produs scăderea imunității (ex. neutropenie). Mai există și noțiunea de rezistență „dependentă de doză” - poate fi depășită prin creșterea concentrației de antifungic. Trebuie să subliniem și faptul că, în cazul terapiei antifungice, rezistența *in vitro* nu se corelează întotdeauna cu un răspuns clinic nefavorabil.

### **Epidemiologia rezistenței antifungice**

Deși este folosită în clinică de peste 30 de ani, experții consideră că în acest moment, rezistența la Amfotericina B nu este o problemă semnificativă pentru clinician. Rezistența primară *in vitro* la **Amfotericina B (AmB)** apare rar, dar este descrisă în infecțiile cu fungi filamentoși de tip *Scedosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus terreus* sau *flavus*, *Trichosporon*, *Candida lusitanae* sau *guilliermondii* etc. și extrem de rar la *Criptococcus neoformans*; nu se pot preciza factorii de risc pentru acest tip de rezistență. Rezistența secundară este foarte rar descrisă la AmB și are ca factori de risc chimioterapia citotoxică, neutropenia, imunodepresia prelungită etc. În cazul AmB a fost descris la bolnavii cu HIV/SIDA un fenomen interesant: apariția de rezistență fenotipică a tulpinilor de *Candida albicans* la AmB după expunere la doze subinhibitorii de azoli (Vazquez, 1998); după doze profilactice de fluconazol este posibil ca tulpini de *Candida albicans* anterior sensibile la AmB să devină temporar rezistente. Această situație nu numai că permite supraviețuirea tulpinilor de *Candida*, dar și multiplicarea lor. Fenomenul poate apare la câteva ore de la expunerea la azoli și durează câteva zile.

Rezistența la **5- flucitozină(5-FU)** este descrisă ca rezistență primară la unele tulpini de *Candida albicans*, *Criptococcus*, *Aspergillus* și fungi dimorfi; apare frecvent rezistență secundară, motiv pentru care nu se recomandă monoterapie cu acest agent antifungic.

Cel mai frecvent rezistența antifungică este descrisă la **azoli**. În clinică patologia care a dus la apariția acestei probleme este reprezentată de candidoza orofaringiană cronică refractară (cu

incidență explozivă după declanșarea pandemiei HIV/SIDA), după cum infecțiile hematogene acute sau subacute la bolnavul critic se conturează ca o cauză din ce în ce mai frecventă de infecții nosocomiale.

În anii '90 terapia cu fluconazole a permis controlul candidozei orofaringiene la bolnavul cu HIV/SIDA, dar a înregistrat o rată rapidă de creștere a rezistenței la antifungice la acești bolnavi; practic s-a demonstrat creșterea incidenței tulpinilor de *Candida nonalbicans* după expunere la azoli, în paralel cu creșterea CMI la azoli. (Nguyen și col., 1996, Price și col., 1994). Unele studii apreciază că 64 - 84% din bolnavii infectați HIV au colonizare faringiană cu tulpini de *Candida albicans*, iar 46% sunt simptomatici. Rezistența la azoli este descrisă la 21-32% din bolnavii simptomatici și 14% din cei asimptomatici! (Rex, Rinaldi, 1995). Pe de altă parte la speciile nonalbicans incidența rezistenței la azoli pare să fie în creștere. "Scenariul" apariției rezistenței la azoli presupune acumularea treptată a mai multor modificări la nivel molecular care merg până la modificarea ARN și a transcripției genelor.

Ca factori de risc pentru rezistența la azoli a bolnavului cu imunodepresie severă sunt descriși: scăderea numărului CD4, cure prelungite sau multiple, terapie intermitentă, profilaxie zilnică, săptămânală sau intermitentă, doza cumulativă de Fluconazole > 10 gr și mai mult de 1 an de la expunere (Millon, 1994, Revankar, 1998).

Pentru bolnavul critic, statisticile din Statele Unite recunosc **infecția hematogenă cu *Candida albicans* ca a patra cauză de infecție nosocomială**. După recurgerea pe scară largă la profilaxia cu Fluconazole după anii '90, a crescut incidența infecțiilor hematogene cu *Candida krusei* și *Candida glabrata*, recunoscând ca factori de risc pentru fungemia cu tulpini nonalbicans: expunerea prelungită la azoli, factori epidemiologici locali și imunodepresia severă, recurgerea pe scară largă la azoli fără prescripție medicală pentru tratamentul vaginitelor micotice etc. Datele statistice din SUA arată o incidență a rezistenței la fluconazole în perioada 1992-1998 de 1-3%, și între 2-14% pentru speciile nonalbicans (raportări CDC 1992 și 1998), în studiul

SENTRY (peste 2000 tulpini de *Candida* izolate din infecții hematogene - 1% rezistența la Fluconazole și 7% pentru speciile nonalbicans, date confirmate și de studiul SENTRY 2003), în timp ce un studiu din Suedia raportează 40% incidența rezistenței la fluconazole a tulpinilor de *C. glabrata* și cca. 15% *C. parapsilosis*. *C. albicans*, *C. parapsilosis* și *C. tropicalis* rămân înalt susceptibile la voriconazole, ravuconazole și fluconazole (<= 1.3% rezistență) cu < 20% rezistență la azoli la tulpinile de *C. glabrata*. De notat că în America Latină tulpinile de *C. glabrata* au fost mai frecvent rezistente la ravuconazole și AmB (33% și respectiv 27%) decât în America de Nord (17% și respectiv 13%). Rezistența *A. fumigatus* la azoli variază de la 52% pentru itraconazole, la 38% - ravuconazole și 11% pentru voriconazole.

Rezistența în acest caz pare să fie indusă de flora endogenă sub presiunea chimioterapiei (antibiotice sau antifungice), dar și de presiunea de selecție de tulpini rezistente din mediu. Pare evident că și în cazul terapiei antifungice terapia empirică va trebui să țină cont de acum încolo tot mai mult de epidemiologia locală.

Din punct de vedere clinic, consecințele rezistenței la azoli apar ca o rezultată a unui complex de factori care ia în discuție atât patogenicitatea fungilor, dar și sistemul imun al gazdei. Este posibil ca fungi rezistenți la azoli să acționeze ca oportuniști adevărați; se selectează după o terapie care elimină, de obicei populația susceptibilă, iar imunodepresia severă favorizează acumularea unei populații dense de germeni, fapt ce crește riscul apariției de mutații rezistenți.

### **Rezistența încrucișată la azoli**

Creșterea ratei de supraviețuire a bolnavilor cu imunodepresie severă, ca și controlul unor infecții bacteriene și virale din cele mai agresive și chiar a infecțiilor cu *Candida albicans*, a dus la creșterea incidenței infecțiilor cu *Aspergillus* (cauză frecventă de deces la bolnavi cu boli hematologice maligne sau rețet de transplant). Acești germeni sunt rezistenți genetic la fluconazole, dar răspunsul clinic la itraconazole este bun. Itraconazole este folosit în profilaxia și tratamentul aspergilozelor tot mai

frecvent și există temerea că ar putea apărea rezistență încrucișată cu agenții noi din clasa triazolilor.

### **Raportul Comisiei Europene de Sănătate și Protecție a Consumatorului privind rezistența la azoli, iunie 2002**

Ca urmare a creșterii incidenței rezistenței antimicotice la azoli înregistrate la sfârșitul deceniului trecut, comitetul științific (steering committee) al Comisiei Europene de Sănătate și Protecție a Consumatorului a analizat în 2002 dimensiunea și impactul social al acestei probleme. Experții au identificat drept cauze principale de creștere a incidenței rezistenței antifungice populația cu imunodepresie severă de diverse cauze, curele prelungite de fluconazole, expunerea la doze subinhibitorii de antifungic, dar și utilizarea în agricultură și în medicina veterinară pe scară largă a acelorași antimicotice ca și la om. La final s-a apreciat că tendința de creștere a incidenței rezistenței antifungice pare să fi stagnat, iar strategiile de management a riscului în domeniul medical par să fi adus chiar o reducere a acestei tendințe în unele locuri și, pe de altă parte, se recomandă utilizarea în agricultură a altor antifungice decât cele folosite în medicina umană, chiar dacă lipsesc dovezi consistente privind implicarea acestora în creșterea incidenței la azoli a infecțiilor fungice de la om.

### **Rezistența la echinocandine**

În acest moment nu se pot spune multe despre rezistența la echinocandine. Este descrisă in vitro o mutație la nivelul genei FKS1 (care, alături de gena FKS2 codează proteine membranare care funcționează drept unități catalitice pentru sintetaza 1,3  $\beta$ D glucanului). In vivo, experții au remarcat de la bun început CMI mari pentru tulpinile de *C. parapsilosis*. Acest aspect a impus o monitorizare atentă a sensibilității tulpinilor de *C. parapsilosis* la echinocandine. Inițial s.-a reușit depășirea acestei probleme prin creșterea dozei de caspofungin administrate. Ulterior au fost descrise situații epidemiologice de rezistență la caspofungin a unor tulpini de *C. glabrata* (Villareal, ICAAC, 2004) și *C. parapsilosis* (Ghannoum, ICAAC, 2005, 27 de tulpini

izolate consecutive într-o unitate de terapie intensivă de arși); din punct de vedere molecular mecanismul de rezistență a implicat MDR1-multidrug resistant gene 1, gena responsabilă de facilitatorii pompei de flux- cu expresie crescută la tulpinile de *C. parapsilosis*.

### **Mecanismele celulare ale rezistenței antifungice**

În cazul unei boli micotice refractare la tratament există posibilitatea infecției cu o specie de fungi cu CMI mare pentru antifungicul folosit. Prezența unei tulpini rezistente la bolnav poate fi dată de rezistența intrinsecă a tulpinilor endogene, înlocuirea cu tulpini mai rezistente din altă specie (*C. krusei*, *C. glabrata*) sau cu o tulpină mai rezistentă de *C. albicans*, modificări genetice care pot face o tulpină endogenă rezistentă sau expresie tranzitorie a genelor care fac o tulpină endogenă temporar rezistentă), modificarea morfologiei celulare (alternanța fenotipului de tip celulă/hife), densitatea populației de fungi etc.

• **Apariția de specii mai rezistente:** determinarea CMI la antifungice a arătat că tulpini de *C. krusei* sau *C. glabrata* sunt mai rezistente la azoli decât *C. albicans*. Aceste specii pot face parte din flora saprofită a individului sănătos, iar terapia antifungică poate controla *C. albicans*, dar celelalte tulpini se comportă ca germeni oportuniști.

• **Infectarea cu o specie de *C. albicans* cu rezistență mai mare:** studiile la bolnavii cu HIV/SIDA au arătat că până la 25% din aceștia pot suferi un fenomen de înlocuire a unei tulpini de *C. albicans* sensibile la azoli cu una mai puțin susceptibilă (strain replacement). Nu există încă o bază demografică largă care să susțină această afirmație. Se pare totuși că selectarea unei tulpini rezistente din flora endogenă este un mecanism mai frecvent întâlnit.

• **Modificări genetice care induc rezistența unei tulpini:** expunerea prelungită la antifungic poate induce rezistență secundară prin modificări genetice. În acest caz se pare că antifungicul ca atare nu produce rezistență, dar favorizează selectarea de populații de celule mai rezistente (mutații genetice apar în organism cu o frecvență extrem de redusă-  $10^{-6}$  –  $10^{-8}$ /genă -

dar într-o populație numeroasă de fungi aflată sub presiune de selecție, o mutație întâmplătoare poate face ca celulele care devin rezistente să devină în timp populația dominantă). Date fiind potențialul de transfer interindividual al tulpinilor și stabilitatea genetică a rezistenței această mutație poate avea curând impact asupra unei populații de bolnavi cu imunodepresie de diverse cauze.

• **Expresia tranzitorie a unei gene care conferă rezistență temporară** - fenomen denumit rezistență epigenetică - o celulă își poate modifica fenotipul, probabil ca urmare a unei asemenea expresii tranzitorii a unei gene și devine rezistentă în timpul expunerii la un antifungic, dar această rezistență încetează la oprirea expunerii la drog. Exemplul cel mai la îndemână este rezistența tranzitorie care apare la bolnavi tratați cu Amfotericina B, după expunere la profilaxia cu fluconazole descrisă mai sus.

• **Modificarea morfologiei celulare:** *Candida albicans* se prezintă sub o varietate de tipuri celulare, cu sensibilitate variabilă la azoli; sunt fungi dimorfi. Celulele de tip blastospori sunt sferice și caracterizează flora comensală. În diverse condiții se pot forma celule elongate – hife - ce caracterizează formele patogene. Este posibil ca o tulpină rezistentă ce formează hife chiar în prezența azolilor să prezinte o patogenicitate crescută. Expresia fenotipică variabilă a *C. albicans* și alte specii de *Candida* și posibilitatea de a-și altera morfotipul între forma celulară sferică și cea elongată exprimă susceptibilitate diferită la azoli.

• **Modificarea populației de fungi:** s-a observat că există o mare variabilitate a CMI între colonii individuale de fungi provenind de la tulpina unui singur bolnav. Acest aspect reflectă instabilitatea genomică sau variația în cadrul unei tulpini. Eradicarea unei populații susceptibile prin terapie antifungică poate permite supraviețuirea unor colonii mici de celule mai predispușe genetic la rezistență

### **Mecanismele moleculare ale rezistenței la antifungice**

• Aportul de antifungic în celulă prin pompe de transport active; alterarea membranei ergosterolice poate afecta capacitatea fluconazole de a pătrunde în celulă.

• Modificarea sau degradarea drogului - este un mecanism important în cazul rezistenței bacteriene, dar mai puțin important pentru rezistența la *Candida albicans*.

• Modificarea căii metabolice de biosinteză a ergosterolului - prin alterarea la nivel de lanosterol - demetilază, enzima țintă a majorității azolilor, se modifică funcția și fluiditatea membranei.

• Modificări moleculare la nivelul genei ERG11 - gena care codează proteina mai sus menționată, enzima lanosterol demetilază - precum: overexpresia genei, amplificarea genei și conversia genei sau recombinări mitotice etc. (un exemplu de asemenea mutație este înlocuirea argininei cu lizină la aminoacidul 467 al genei ERG11, cu inducerea de modificări structurale și funcționale celulare, care pot da rezistență la azoli).

• Modificarea altor gene ERG- dacă pentru *C. albicans* nu sunt descrise alte mutații înafara celei descrise mai sus, la *C. glabrata* sunt descrise mutații la nivelul genelor ERG3 și ERG11.

• Reducerea acumulării intracelulare a antifungicului - prin activitatea a două pompe de eflux: transportorul casetei de cuplare cu ATP și facilitatorii majori. Afectarea activității acestor pompe de eflux, prin mecanism genetic este principalul mecanism de rezistență antifungică.

### **Rolul biofilmelor în rezistența antifungică**

În istoria microbiologiei microorganismele au fost descrise sub formă planctonică (celule plutind în suspensie, sânge, secreții în organism sau mediu de cultură in vitro) și caracterizate în laborator pe baza proprietăților lor în mediile de cultură. Aceasta este percepția clasică a microorganismelor unicelulare Van Leewenhoek a fost cel dintâi cercetător care a descris fenomenul prin care aceste microorganisme aderă și se multiplică pe majoritatea suprafețelor, atât cele exterioare, cât și în organism, dând naștere biofilmelor (microorganisme asociate suprafețelor), biofilme care includ în structura lor germeni cu expresie genetică și fenotipică și rată de multiplicare diferite de cele ale germenilor aflați în stare planctonică; discutăm de un ecosistem cu proprietăți aparte; în acest moment se acceptă

că o bună parte din patologia infecțioasă este generată și/sau întreținută de biofilme.

Biofilmele sunt ansamble formate din celule microbiene și o matrice polizaharidică ce aderă ireversibil de o suprafață. Matricea polimerică poate reprezenta până la 50- 90% din compoziția biofilmului și este formată în principal de polizaharide neutre (frecvent întâlnite în cazul biofilmelor cu germeni Gram negativi) sau anionice (în principal acizi uronici); acestea permit formarea de legături divalente cu ioni de calciu sau magneziu, cu formarea de punți solide de legătură în interiorul matricei polimerice și creșterea aderenței biofilmului. În cazul biofilmelor de germeni Gram pozitivi (ex. stafilococi) (Fig. 2) matricea este predominant cationică, iar bacteriile coagulazo negative „beneficiază” de biofilme mixte de acid teichoic și o cantitate mică de proteine. Germenii microbieni din structura biofilmelor își încetinesc rata de multiplicare, fapt care îi face mai greu de distrus de agenții antimicrobieni; pe de altă parte prezența germenilor facilitează dezvoltarea matricei polimerice, matrice care face germenii mai greu accesibili sau chiar de loc pentru antibioticele/antifungicele din circulația sanguină. Dacă adăugăm la aceste modificări de comportament microbial tipice germenilor din biofilm și faptul că majoritatea acestora suferă modificări la nivelul genelor (de tip up- sau downregulation) caracteristice fiecărei clase în parte, este evident că biofilmele reprezintă o modalitate de creștere a rezistenței antimicrobiene și se conturează ca o problemă de sănătate publică, mai ales pentru bolnavul critic și pentru cel cu imunodepresie severă de diverse cauze.

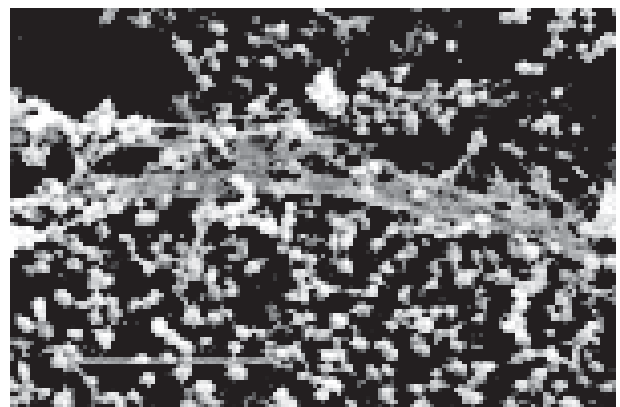
Structura biofilmelor poate fi influențată de interacțiunea cu componente nonmicrobiene ale gazdei sau din mediu; ex. încorporarea de hematii și fibrină pe măsură ce se dezvoltă biofilmele. Biofilmele de pe valvele cardiace includ în mod caracteristic trombocite și fibrină în matricea polimerică. Capsula de fibrină care se formează va proteja germenii de acțiunea leucocitelor gazdei, fapt care duce la apariția endocarditei. Biofilmele de pe cateterele urinare conțin microorganisme care hidrolizează ureea din urină prin ureaze și eliberează amoniac, cu creșterea pH-ului local și precipitarea mineralelor

de tip calciu (cu formare de hidroxiapatită) sau fosfat de amoniu și magneziu (care formează struvită), cauză de formare de cruste pe aceste catetere, care uneori determină obstrucția acestora!

Rareori un biofilm este o structură mono-microbiană. Microcoloniile de germeni au metabolism aparte, facilitat de mediul de cultură reprezentat de matricea polimerică, ce îi protejează de mediul extern. Este facilitat transferul de ADN extracromozomial (plasmide) între celule, element care, de asemenea favorizează apariția și răspândirea rezistenței antimicrobiene. Mai trebuie menționat că agregate de biofilm (cu toate proprietățile microcoloniei de celule din structura sa) se pot desprinde. Celulele își pot relua rapid proprietățile planctonice sau pot adera de alte suprafețe. În ambele situații pot transfera la distanță rezistența antimicrobiană. Putem concluziona că germenii din structura biofilmului reprezintă o populație cu metabolism și ecologie diferite de ale germenilor aflați în stare planctonică și pot declanșa maladii infecțioase din cele mai grave. Dintre caracteristicile biofilmelor care pot fi importante pentru bolile infecțioase amintim: desprinderea de agregate de biofilme care pot genera infecții hematogene sau embolii, schimbul intercelular de plasmide, implicat direct în transmiterea rezistenței antimicrobiene, aspect cu atât mai important cu cât germenii din biofilm sunt protejați de acțiunea antimicrobiană, iar biofilmele nu sunt afectate de clearance-ul sistemului imun al gazdei.

**Fig. 2. Biofilm stafilococic de pe suprafața unui cateter venos central (imagine de microscopie electronică)**

*după: Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis 2002;9:8.*



### Particularitățile biofilmelor fungice

Dacă în unele servicii de terapie intensivă biofilmele formate de germeni din genul *Candida* (Fig. 3) la bolnavi cu dispozitive implantabile (proteze valvulare, endovasculare, articulare, dar, mai ales catetere venoase centrale) și mobilizarea acestora în circulația sistemică se constituie adesea drept puncte de plecare pentru infecții micotice invazive, iar infecțiile fungice de origine hematogenă reprezintă o cauză de infecții nosocomiale cu incidență în creștere, este de înțeles de ce cercetătorii acordă o atenție crescândă modului în care se formează aceste biofilme și cum poate fi influențată încărcarea bacteriană/fungică din matricea lor.

Tulpini de *Candida* intră adesea în microflora obișnuită la om. Dispozitive de tip: stent, sunt, proteze, implante, sonde endotraheale, pacemakere, catetere de diverse tipuri etc., sunt adesea colonizate de tulpini de *Candida* punct de plecare pentru dezvoltarea de biofilme candidozice. Practic ultimul deceniu a cunoscut o creștere exponențială a infecțiilor hematogene cu *Candida* (în special *albicans*), în paralel cu utilizarea pe scară tot mai largă a dispozitivelor mai sus amintite, astfel încât, în acest moment fungii (și în special *Candida albicans*) reprezintă cea de a treia cauză de infecții de cateter, a doua cauză de colonizare urmată de infecție, toate grevate de o rată a mortalității în creștere. În mare parte biofilmele de *Candida* sunt răspunzătoare de rezistența la antifungice, aspect care crește durata spitalizării și rata mortalității, iar din punct de vedere economic impactul este semnificativ.

Pentru a coloniza orice suprafață celulele fungice trebuie să adere la suprafața unui biomaterial, aspect mediat de hidrofobicitatea suprafeței, forțe electrostatice, dar și adezine fungice, ce recunosc liganzi din suprafața de aderat cum ar fi proteine serice (fibrinogen, fibronectină), factori salivari etc. Pe de altă parte, celulele de *Candida* pot coagrega bacterii, cu formarea de biofilme mixte, bacteriene și fungice. Aderarea celulelor la un substrat este urmată de diviziune celulară, proliferare și dezvoltarea biofilmului; rezultă o structură tridimensională complexă, cu aranjament spațial optim pentru transportul nutrienților și eliminarea deșeurilor. Biofilmele de *Candida* au particularități de apariție și

dezvoltare; aderarea celulelor fungice este urmată la 3-6 ore de formare de structuri tubulare. După o incubatie de 24-48 de ore biofilmele maturate de *Candida albicans* dispun de o rețea densă de celule fungice, hife și pseudohife și matrice polimerică extracelulară. Dat fiind că filamentarea nu a fost descrisă la formele planc-tonice, este posibil ca acest aspect să fie favorizat de formarea biofilmului. Microscopia electronică a permis vizualizarea de canale hidrice ramificate în biofilm, cu dimensiuni de 25- 450 μm.

Conversia morfogenetică a *Candidaei albicans* (capacitatea de a se transforma reversibil din celule fungice în filamente) are rol decisiv în dezvoltarea biofilmului. Baillie și Douglas au demonstrat că hifele constituie elemente esențiale pentru integritatea structurală și arhitectura multistratificată ce caracterizează biofilmele maturate. Ramage și col au demonstrat că substratul molecular al filamentării celulelor de *Candida* și dezvoltării ulterioare de biofilme mature, înalt structurate, este asigurat de prezența proteinei Efg1.

Comunicarea intercelulară (quorum sensing) este decisivă pentru formarea biofilmului. Aceasta asigură controlul multiplicării celulare pentru a evita suprapopularea, dar și competiția pentru nutrienți, cu implicații serioase pentru procesul infecțios, în special în diseminarea infecției și apariția de emboli septici la distanță. Studii recente au demonstrat că acest aspect este controlat de proteina de transducție Chk1p (un alt exemplu interesant de comunicare intercelulară în biofilm este dat de interacțiunea *Candida albicans* - *Pseudomonas aeruginosa*; *Pseudomonas* formează un biofilm extrem de dens pe filamentele de *Candida* și distruge fungii, dar bacteriile nu distrug formele celulare de *Candida*; pe de altă parte, celulele de *Candida* pot opri filamentarea ca răspuns la expunerea la contactul cu molecule de comunicare cu *Pseudomonas* de tip 3-oxo- C12 homoserin lactonă). Toate aceste date demonstrează că morfogeneza *Candida albicans* este sub controlul atent la mediului înconjurător din biofilm!

Se știe că biofilmele de *Candida* sunt cauză de creștere a rezistenței antifungice. Este benefic faptul că antifungice noi, cum ar fi echinocandinele și forma liposomală a Amfotericinei B au dovedit capacitate fungicidă pentru germenii din biofilme. Un impediment major este dat de faptul

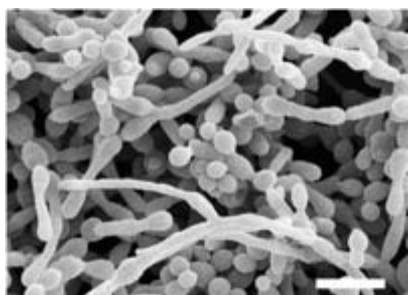
că rezistența la antifungice a acestor biofilme este greu de dovedit. Standardele de laborator NCCLS de diluție în bulion sunt elaborate pentru testarea formelor planctonice și nu permit estimarea sensibilității antifungice pentru celulele din biofilme. Acest aspect ar putea fi o explicație pentru discrepanța dintre determinările de laborator și evoluția clinică a unor asemenea infecții. Determinarea cu precizie a sensibilității antifungice a germenilor din biofilme ar putea asigura însă controlul unor infecții severe la bolnavul critic. Recent a fost descrisă o metodă care folosește microplăci pe care se formează biofilme, care sunt expuse ulterior la diverse antifungice.

Rezistența antifungică a biofilmelor este un fenomen complex multifactorial cu multe aspecte neelucidate. Rezistența intrinsecă a biofilmelor de *Candida* presupune mecanisme diferite: densitatea celulară mare a biofilmului, reducerea ratei multiplicării și limitarea nutrienților, activitatea matricii polimerice extracelulare, expresia genelor responsabile de rezistență (în special a celor care codifică pompele de eflux) etc.

Matricea polimerică extracelulară produsă de celulele aderente constituie o barieră pentru difuziunea antifungicelor. Reducerea ratei multiplicării celulare este de asemenea responsabilă de rezistența antifungică. Chandra și col. au demonstrat că intensificarea ratei metabolice a biofilmului este corelată cu creșterea rezistenței antifungice. Reducerea semnificativă a cantității de ergosterol din biofilme în fazele intermediară și de maturitate, face ca majoritatea antifungicelor care au ca mecanism fungicid interferența cu metabolismul sterolilor să reducă eficiența acestora.

**Fig. 3. Biofilm candidozic pe suprafața unui caterer venos central**

*după:* Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2005;7:8.



Putem spune în acest moment că nu mai putem eluda rolul biofilmelor în evoluția bolilor infecțioase. Date legate de ecologia acestora sunt decisive pentru dezvoltarea de strategii viitoare de prevenire a formării biofilmelor și/sau de tratament a infecțiilor sau întreținute de acestea.

### **Strategii terapeutice propuse pentru depășirea rezistenței antifungice**

**Creșterea dozei de antifungic administrat bolnavului:** nu există dovezi clinice din categoria medicinei bazate pe dovezi pentru această afirmație care este susținută mai mult de observații preclinice; astfel, în cazul amfotericinei B, forma liposomală a crescut tolerabilitatea la creșterea dozei, dar studii pe animale au demonstrat la creșterea dozei o farmacocinetică nonliniară, cu scăderea clearance-ului și a volumului de distribuție. Se pare că la creșterea dozei, preluarea amfotericinei B de unele țesuturi este un proces saturabil, care ar putea induce mecanisme alternative de eliminare, așa cum a demonstrat recent un studiu cu  $> 5-7$  mg/kg/zi AmfB pentru bolnavi cu infecții fungice invazive. (Walsh, 2001).

Există studii clinice care susțin afirmația că doze zilnice de fluconazol ( $> 12$  mg/kg/zi) reprezintă o opțiune sigură și eficientă în infecțiile cu tulpini de *Candida* cu sensibilitate dependentă de doză. Andes, Louie și col. au demonstrat că eficacitatea micologică a Fluconazole apare dacă raportul arie de sub curbă (area under the curve- AUC) / concentrație minimă inhibitorie (CMI) de 25-50%, adică aprox. 1-2 x CMI pe durata a 24 de ore. Astfel, pentru tulpinile susceptibile (CMI  $< 8$  mg/l), doza zilnică de 400 mg fluconazole/zi asigură depășirea consistentă a raportului AUC/CMI eficient. Pentru tulpinile cu CMI = 16- 32 mg/l (cu sensibilitate dependentă de doză), un raport AUC/CMI  $> 25-50\%$  este atins cu doze zilnice de fluconazol  $> 800$  mg.

**Terapia cu combinații antifungice** a fost propusă cu insistență în ultimii ani, ca urmare a creșterii incidenței infecțiilor fungice refractare la monoterapie, dar, cu excepția meningitei criptococice, dovezile clinice care să susțină o asemenea afirmație sunt puține. Dintre acestea,

unele au demonstrat eficacitatea combinației amfotericina B - flucitozină în reducerea nivelului rezistenței la flucitozină. Terapia combinată este propusă de specialiști ca terapie de primă intenție în formele grave, cu risc vital, până la identificarea tulpinei și stabilirea sensibilității sale, urmată de deescaladare sau în infecții rare cu tulpini cu incidență în creștere, ex: *Scedosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus nonfumigatus*, *Trichosporon* etc. extrapolarea datelor de sensibilitate in vitro sau a celor de la animale este discutabilă. Se poate spune, cu puține excepții că asocierea de antifungice are efecte neutre sau pozitive; atenție la combinația AmB- azoli, care uneori se poate dovedi toxică! Pentru infecțiile cu *Cryptococcus* sau *Candida*, combinațiile de antifungice sunt cuprinse în ghiduri, în timp ce pentru infecțiile cu *Aspergillus* nu se recomandă terapia combinată, dar asocierea echinocandine+ AmB sau azoli rămâne o ipoteză promițătoare.

**Imunomodularea.** Observații clinice izolate afirmă că în micozele refractare au un rol benefic citokine (ex. factorul de stimulare a coloniilor de granulocite-macrofage GM-CSF, factorul de stimulare a coloniilor de granulocite), gamma interferon sau celule imune efectoare. Nu numai defectele imune cantitative (ex. neutropenia) afectează răspunsul bolnavilor, dar și defecte calitative, de funcție celulară (ex. citotoxicitate mediată de anticorpi, metabolism oxidativ etc.) sau dereglarea răspunsului imun adaptativ al gazdei la infecția fungică; aceste defecte pot fi ameliorate de terapia cu citokine de tip GM-CSF sau interferon gama.

**Noi molecule de antifungice.** Rezistența antifungică și apariția de tulpini tot mai rezistente a creat o presiune crescândă pentru apariția de noi clase de antifungice. Așa au apărut în ultimii ani în practica medicală noi azoli (voriconazol, posaconazol, ravuconazol) sau echinocandinele (casposungin, micafungin, anidulafungin etc.)

**Studierea germenilor din biofilme** - ar putea schimba în anii care vin modalitatea de abordare a patologiei infecțioase a bolnavului critic. Putem afirma cu certitudine că, în prezența unei infecții fungice invazive, îndepărtarea cateterelor este un gest elementar din categoria medicinei bazate pe dovezi, iar acolo unde acest lucru nu este posibil, se impune recurgerea la

antifungice care acționează asupra germenilor din biofilme (ex. casposungin sau amfotericina B lipozomală).

**Supraveghere epidemiologică.** Faptul că infecții cu *Candida* sau *Aspergillus* se pot transmite nosocomial, dar și în mediu comunitar, extraspitalicesc impune supraveghere epidemiologică atentă, ca și evaluarea în echipă multidisciplinară a micozelor refractare. Activitatea unor asemenea echipe este bine definită în cazul rezistenței bacteriene, în timp ce, în domeniul micologiei schemele terapeutice, dozele, optimizarea farmacocinetică/farmacodinamică a terapiei antifungice, politica de restricționare sau rotație a acestora rămân un domeniu al viitorului.

## **PARTICULARITĂȚI DE TERAPIE ANTIFUNGICĂ LA BOLNAVAL CRITIC NONNEUTROPENIC**

### **Particularitățile infecției fungice la bolnavul critic**

Ultimul deceniu a confirmat faptul că infecțiile fungice invazive devin o problemă de sănătate publică, prin creșterea constantă a incidenței infecțiilor nosocomiale cu tulpini de *Candida albicans* (după unele statistici de la 6% în 1980, la peste 20% în 2002!) și creșterea ratei mortalității pe care o presupune infecția cu fungi la bolnavul critic (peste 50%, iar mortalitatea direct atribuibilă infecției fungice este de cca. 38%!). Pentru bolnavul internat în STI (care nu este sub terapie imunosupresoare posttransplant sau pacient de hematooncologie), factorii de risc pentru infecția fungică sunt: antibioterapia cu spectru larg, staționare prelungită în STI, hemodializă, cateterizări multiple, prezența cateterului venos central, gravitatea bolii, nutriție parenterală totală, perforații gastrointestinale sau chirurgie abdominală recentă, colonizare, diabet zaharat, profilaxia antifungică prelungită etc. Creșterea numărului de situri de colonizare este proporțională cu riscul unei candidoze invazive, după cum, factori de risc precum: vârsta înaintată, malnutriția, eșecul îndepărtării cateterelor venoase centrale sau fungemia cu tulpini nonalbicans, se asociază frecvent cu prognosticul nefavorabil.

Din punct de vedere epidemiologic, după cum s-a văzut o problemă deosebită o ridică și **tendința de creștere a incidenței infecțiilor fungice cu specii nonalbicans sau noncandida**, chiar pentru bolnavii unei secții obișnuite de terapie intensivă; aceste tendințe epidemiologice persistente pe durata ultimului deceniu au impus **schimbarea opțiunilor de terapie empirică**, cu reorientarea strategiei antifungice către molecule care acoperă și acest spectru.

Ca localizare, practic infecția fungică poate atinge orice organ, inclusiv globul ocular sau sistemul nervos central. În mod paradoxal atingerea pulmonară este rară și face parte din tabloul clinic al candidozelor diseminate, iar afectarea hepatosplenică este o entitate nosologică în sine; alte localizări pot fi: la nivel urinar, osos, articulații, cavitatea peritoneală, determinarea esofagiană sau gastrointestinală, endocardul etc. Wey și colab. au demonstrat că la bolnavii cu candidemie incorect tratată rata complicațiilor, inclusiv endoftalmită, endocardită, artrită septică sau candidoză renală poate ajunge până la 15%! La bolnavul neutropenic candidemia se poate complica prin instalarea candidozei cronice diseminate, iar la nou născutul prematur cu meningoencefalită.

Diagnosticul infecției fungice la bolnavul critic continuă să rămână o mare provocare: dacă numai la 50% din bolnavii cu infecții fungice invazive sunt surprinse hemoculturi pozitive, în acest moment rata de succes poate atinge până la 70%; biopsiile din focar sunt de multe ori greu de efectuat la bolnavul aflat în Terapie Intensivă, iar culturile prezintă un risc mare de contaminare. Progresele tehnologice în acest domeniu au determinat renunțarea la determinarea de anticorpi datorită ineficienței metodei, metaboliți de tip D-arabinol sunt dificil de măsurat. Tehnologiile cele mai promițătoare sunt cele care determină componentele peretelui fungic sau PCR fungic. Studii de mici dimensiuni susțin ideea că determinarea de  $\beta$ -glucan în ser (testul Glucall) atinge o sensibilitate de până la 100%.

#### **Particularități de farmacocinetică/ farmacodinamie la bolnavul critic, nonneutropenic**

Bolnavul critic este expus riscului de a dezvolta o infecție fungică agresivă, iar factorii de risc pentru aceasta au fost deja amintiți.

Administrarea terapiei antifungice ridică multe probleme. Calea enterală este rareori disponibilă la bolnavul critic. Acești bolnavi nu pot înghiți, au un grad de ileus și întârziere a pasajului transpiloric și posibil, prin afectarea mucoasei intestinale, un deficit de transfer în circulația sistemică. Biodisponibilitatea antifungicului după administrare orală devine imprezvizibilă la bolnavul critic, astfel încât se preferă administrarea parenterală. Pe de altă parte, administrarea concomitentă a unor medicamente de tip: sedative, analgetice, antibiotice, antifungice, diuretice, antiaritmice etc., ce necesită sistemul citocromului CYP3A4 pentru metabolizare parțială sau totală, modifică semnificativ farmacocinetica majorității antifungicelor. Administrarea continuă de opiacee (uneori pe durata a multe zile- săptămâni la bolnavul critic) crește  $T_{1/2}$  al acestora proporțional cu durata administrării („context sensitive half life”); de exemplu pentru fentanyl, administrarea continuă poate crește  $T_{1/2}$  de la cca. 30 min la câteva ore, după o administrare continuă de numai 8 ore! Administrarea concomitentă de inductori enzimatici de tip fenitoin, macrolide, barbiturice, glucocorticoizi etc. va duce la modificări imprezvizibile de farmacocinetică și farmacodinamie pentru fiecare din aceste droguri în parte. Comunicarea dificilă, uneori imposibilă, cu bolnavul critic face greu de semnalat reacțiile adverse induse de medicația administrată. În aceste condiții, medicația care nu interferă cu activitatea citocromului P450 sau sistemul izoenzimelor CYP3A4, cum este cazul echinocandinelor, pare un avantaj în plus.

Terapia fungemiei la bolnavul critic a beneficiat până acum câțiva ani de terapie parenterală cu Amfotericina B sau fluconazole. Nefrotoxicitatea a limitat utilizarea AmB, iar forma lipozomală care reduce acest risc nu este disponibilă în țara noastră. Fluconazole, utilizat pe scară largă în profilaxia infecției fungice diseminate la bolnavul critic și la noi în țară, tinde să nu mai acopere spectrul infecțiilor diseminate cu *C. Glabrata*, *C. krusei* și în general poate avea răspuns inconsecvent în infecțiile cu specii nonalbicans. Despre dimensiunea epidemiologică a acestei probleme (respectiv despre proporția de specii nonalbicans izolate la bolnavii

din Clinica ATI a Spitalului Universitar București și sensibilitatea lor la azoli vom discuta în partea a doua a acestui material). Pe de altă parte, dacă fluconazole pare să rămână antifungicul de elecție pentru infecțiile cu *C. Albicans*, micozele severe la bolnavul critic ar putea impune opțiunea pentru un agent fungicid, cu toxicitate redusă și profil minim de rezistență.

Dezvoltarea de noi molecule de antifungice nu a fost ușoară în primul rând datorită similarității celulelor de fungi și cele ale mamiferelor (în ambele cazuri celule eucariote); extinderea fungemiei la bolnavul critic a impus utilizarea de noi azoli (voriconazole, posaconazole, ravuconazole), dar și a unei noi clase de antifungice, echinocandinele (caspofungin, micafungin, anidulafungin). Dintre acestea, voriconazole și caspofungin se utilizează și la noi în țară.

Descoperite cu cca. 20 de ani în urmă, echinocandinele sunt hexapeptide ciclice cu catenă laterală de tip N-alil alifatic sau aril, radicali care permit extinderea spectrului antifungic la specii de *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis carinii*, dar nu și *Cryptococcus neoformans*. Fiind vorba de molecule cu greutate mare nu pot fi administrate decât parenteral. Inhibă biosinteza 1,3-beta-glucanilor, componente esențiale ale peretelui celular al fungilor (complexul enzimatic de sinteză al 1,3 beta-glucan nu există la celelalte celule de mamifere, fapt care asigură o bună tolerabilitate produsului). Caspofungin împiedică multiplicarea fungilor prin două mecanisme: unul din ele este împiedicarea sintezei componentelor peretelui celular, fapt care afectează stabilitatea sa. În felul acesta peretele celulei nu mai poate face față presiunii osmotice intracelulare. Acest blocaj al sintezei peretelui celular are atât efect fungistatic, cât și efect fungicid. În acest moment caspofungin este recomandat pentru terapia candidozelor invazive, în peritonite, candidemie la bolnavul nonneutropenic (cel mai adesea acest bolnav este bolnavul critic din secțiunile de Terapie Intensivă), infecții abdominale și ale cavității pleurale. Este aprobat pentru utilizare la adult în Uniunea Europeană. În Statele Unite ale Americii este aprobat de FDA în candidoza esofagiană, în aspergiloza invazivă la bolnavi refractari la alte terapii sau care nu pot tolera terapia primară antifungică.

Studii semnificative statistic au validat eficacitatea caspofungin pentru terapia candidozelor invazive la bolnavul neutropenic (validat cu eficacitate similară amfotericinei B, dar cu tolerabilitate net superioară acesteia); în baza unui studiu recent FDA și EMEA (European Evaluation of Medicinal Products) au aprobat administrarea de caspofungin la adultul neutropenic febril dacă există un nivel ridicat de suspiciune de infecție fungică (de tip *Candida* sau *Aspergillus*).

Avantajele recurgerii la caspofungin pentru bolnavul critic sunt și de ordin farmacocinetic; legarea de proteine se face în proporție ridicată. Frația liberă din plasmă (2-3,5%) se distribuie în țesuturi și se acumulează cu precădere în ficat, rinichi, plămâni și splină. După administrarea iv a unei doze de până la 100mg caspofungin are o farmacocinetică lineară de ordinul I. Concentrația sa plasmatică se reduce în câteva trepte. După o fază scurtă de distribuție,  $t_{1/2}$  (60-90 min.) urmează o fază dominantă,  $t_{1/2}$  (9-11 ore) care va determina acumularea în țesuturi timp de cca. 14 zile după o doză de 50-70mg. La doze terapeutice se mai produce o acumulare adițională, faza  $\beta$ , la 2-3 zile de la administrare, cu  $T_{1/2}$  de cca. 40-50 de ore. Produsul este metabolizat hepatic, prin reacții independente de citocromul P450 (acest aspect farmacocinetic îi conferă risc minim de interferențe cu medicația concomitentă a bolnavului și poate constitui un avantaj față de terapia cu azoli la bolnavul critic, azolii având metabolizare în proporție semnificativă pe calea citocromului P450). Singura interferență medicamentoasă descrisă relativ recent (Stone, 2004) impune ajustarea dozelor în cazul terapiei concomitente și prelungite caspofungin – rifampicină. Produsul este degradat prin hidroliza peptidelor, care sunt eliminate prin urină și fecale. Eliminarea urinară este lentă (clearance de 10-12 ml/min); după o doză unică de 50 mg caspofungin, la 27 de zile 75% din produs este eliminat (41% prin urină și 34% în fecale) (Stone, 2004).

Datele acumulate în toate etapele de cercetare clinică și expunerea ulterioară a unui număr mare de bolnavi la terapie de diverse durate cu caspofungin au arătat un bun profil de siguranță și tolerabilitate a produsului. Cele mai

frecvente reacții adverse au fost de tip febră (12-26%), flebită la locul injectării (12-18%), cefalee (8-15%). Reacții de tip greață, diaree, rash cutanat sau prurit au fost semnalate la 1-9% din bolnavi. Modificări tranzitorii de teste hepatice au fost: creșterea AST (11-27%), ALT (11-24%), fosfataza alcalină (8-24%), cu reducere de hematocrit: 3-12%. La numai 2% din bolnavii care au primit caspofungin a fost nevoie de oprirea terapiei datorită reacțiilor adverse, fără însă să se semnaleze reacții adverse severe. Un avantaj este și faptul că nu este nevoie de ajustarea dozelor în insuficiența renală, iar în cea hepatică doar în formele severe (scor Child Pugh 7-9).

În continuare, în încercarea de a poziționa cât mai corect profilaxia și tratamentul infecțiilor fungice severe la bolnavul critic nonneutropenic vom prezenta o trecere în revistă a ghidurilor actuale de terapie antifungică la această categorie de bolnavi.

### **Candidemia și candidioza acută diseminată hematogen (ghid IDSA-Pappas, 2004)**

**Îndepărtarea tuturor cateterelor venoase centrale.** Pentru populația de bolnavi nonneutropenici această intervenție a redus rata mortalității atât la adult, cât și la nou născut. Se îndepărtează astfel posibilitatea forămării de **biofilme**, cauză majoră de eșec terapeutic și persistență a infecției la bolnavul critic. La bolnavul neutropenic este greu de diferențiat dacă fungemia este dată de prezența cateterului sau de tractul gastrointestinal. În prezența candidozei digestive sau a mucozitei, candidemia este mai degrabă prin translocare, decât având ca sursă cateterul venos central; o particularitate o constituie fungemia dată de *C. parapsilosis* care este frecvent asociată cu prezența cateterului venos central (Anaissie, 1998). Acolo unde îndepărtarea unor asemenea dispozitive infectate (proteze valvulare, articulare, laringiene, dispozitive intrauterine) ar fi dificilă, activitatea dovedită *in vitro* de caspofungin asupra germenilor din biofilmele candidozice, ar putea face din acesta o alternativă terapeutică de elecție (Bachman, 2002).

Terapia inițială va fi constituită de terapie intravenoasă cu caspofungin, fluconazole sau

amfotericina B (Pappas, 2004). Selecția terapiei antifungice va ține cont de starea bolnavului, sensibilitatea tulpinii determinată în laborator și prezența disfuncției de organe, care poate interfera cu farmacocinetica drogului. Expunerea anterioară la antifungic poate influența de asemenea alegerea antifungicului.

Recomandările actuale (ghidul IDSA-Pappas, 2004) pentru bolnavii stabili din punct de vedere hemodinamic și care nu au primit recent terapie cu azoli sugerează Fluconazole cca. 800mg iv (> 6 mg/kg/zi iv)- grad AI. Pentru bolnavul instabil alternativele ar putea fi: Caspofungin (care beneficiază și de un profil de siguranță remarcabil prin rata redusă de reacții adverse) - grad AI - sau fluconazole (800 mg/zi) în monoterapie sau asociat cu amfotericina B (> 0,7 mg/kg/zi) - grad AI.

După izolarea tulpinii alegerea antifungicului ar putea fi ghidată și pe criteriile epidemiologice; astfel, infecțiile cu *C. albicans*, *C. tropicalis* sau *C. parapsilosis* ar putea fi tratate cu AmB sau fluconazole (6 mg/kg/zi) sau caspofungin (doza de încărcare de 70 mg și cea de menținere de 50 mg/zi) – grad AI. Pentru *C. krusei* și *C. glabrata* părerile rămân împărțite. Ambele specii sunt sensibile la Caspofungin - grad AI; pentru bolnavii cu stare nu foarte gravă putem recurge la fluconazole 800 mg/zi sau AmB. AmB este preferată și pentru fungemia cu *C. krusei*. În Europa este validată și indicația de Voriconazole pentru terapia infecțiilor invazive cu tulpini de *Candida* rezistente la azoli. (Fig. 2)

**Durata recomandată** a terapiei antifungice este de cca. 14 zile după ultima hemocultură pozitivă și rezoluția semnelor și simptomelor clinice; se recomandă renunțarea la terapia imunosupresoare pe durata terapiei infecției fungice. Persistența candidemiei sub terapie antifungică sau o recurență infecțioasă impun schimbarea clasei de antifungic, testarea tulpinii, retragerea cateterelor endovasculare și ameliorarea imunosupresiei.

Toți bolnavii cu candidemie vor avea o **examinare oftalmologică** pentru a exclude endoftalmita candidozică.

Datorită gravității deosebite pe care o aduc infecțiile fungice invazive la bolnavul critic, dificultățile diagnosticului pozitiv și costurile

ridicate pe care impun, s-au conturat **trei strategii terapeutice**, după cum urmează:

### 1. Terapia antifungică profilactică

Acest tip de terapie antifungică presupune administrarea medicamentului pentru a preveni apariția bolii la o populație cu risc crescut și se adresează bolnavului cu unul sau mai mulți **factori de risc** (internare prelungită în secția de terapie intensivă, antibioterapie cu spectru larg, imunosupresie medicamentoasă - corticoterapie, citostatice etc., medicație administrată intravenos, cateterizare multiplă, nutriție parenterală totală, perforație gastrointestinală, diabet zaharat, insuficiență renală, hemodializă, boală neoplazică, pancreatită acută severă, colonizare), dar care este asimptomatic. Trebuie să precizăm aici că prezența fungilor la porțile de intrare în organism, colonizarea, reprezintă un factor de risc, dar nu impune terapie antifungică (de ex. colonizarea mai multor situri din organism este un factor de risc, dar terapia antifungică nu aduce beneficii la un bolnav cu fungurie asimptomatică). Prezența factorilor de risc este extrem de importantă pentru a decide pe cine tratăm și când.

### 2. Terapia antifungică pre-emptivă bolnavului

Această modalitate terapeutică se adresează bolnavului asimptomatic, dar cu culturi pozitive sau test la  $\beta$ -glucan pozitiv. Presupune inițierea terapiei antifungice numai pe baza datelor de laborator, înainte de apariția semnelor clinice de boală.

### 3. Terapia empirică a suspiciunii de infecție fungică diseminată la bolnavul nonneutropenic

Terapia empirică presupune administrarea agentului antifungic la bolnavul cu risc crescut și semne și simptome de boală, chiar în absența culturilor pozitive. Dat fiind riscul vital pe care îl implică o infecție fungică invazivă la bolnavul critic, terapia antifungică adecvată precoce pare să fie o condiție esențială pentru supraviețuirea bolnavului. Date fiind dificultatea diagnosticului de laborator și riscul ca la numai 50% din bolnavi să putem surprinde pasaj fungic

hematogen, o terapie empirică adecvată poate să reprezinte cheia pentru salvarea bolnavului. Dacă diagnosticul este greu de stabilit, criteriile de selecție a unei asemenea terapii sau conturat foarte greu în ultimii ani și continuă să genereze controverse între specialiști.

Absența colonizării la bolnavul critic indică un risc redus de infecție fungică invazivă și nu impune terapie antifungică empirică. Asocierea unor factori de risc de tip: colonizare cu *Candida* (localizări multiple), absența altor cauze de febră persistentă sau factori de risc din categoria celor enumerați la începutul acestui material impun terapie empirică (Buchner, 2002). Pentru serviciile de Terapie Intensivă, la adulți cu risc ridicat de infecții fungice invazive se justifică profilaxia cu fluconazole, după ce se asigură un program riguros de combatere a infecțiilor nosocomiale și protocoale pentru manevrele invazive (grad AI).

Practic, terapia antifungică empirică la bolnavul cu risc crescut poate fi inițiată la bolnavul cu febră persistentă sub antibioterapie, cu hemoculturi negative, la bolnavul cu fungurie masivă în absența cateterului urinar sau care persistă după îndepărtarea acestuia, la cei cu funghi izolați din cel puțin două situsuri sau cu leziuni viscerale confirmate. Ghidurile actuale recomandă **fluconazole iv. sau per os la bolnavii stabili**, iar la cei **instabili, caspofungin sau amfotericina B** (aceasta din urmă sub rezerva unei nefrotoxicități redutabile, chiar dacă mai redusă în cazul formei liposomale). Pentru pacientul român rămâne doar opțiunea de caspofungin în caz de stare generală gravă și suspiciune de candidoză invazivă.

Dacă am încerca să sistematizăm datele de mai sus putem spune că în materie de **terapie antifungică empirică la bolnavul din STI febril**, cu colonizare cu tulpini de *Candida* a > 2 situri și > 2 factori de risc majori (antibioterapie prelungită, imunosupresie, neutropenie, arsuri întinse, perforații intestinale, chirurgie abdominală majoră, diaree, ileus, nutriție parenterală totală, epurare extrarenală etc.) sau > 3 factori de risc minori (vârsta > 40 ani, insuficiență renală, internare STI > 10 zile, cateter urinar, cateter venos central multilumen, diabet zaharat, candidurie etc.). La bolnavul hemodinamic stabil se

poate începe terapia empirică de tip fluconazole iv. Ne gândim la altă moleculă- amfotericina B sau caspofungin dacă bolnavul cu profilul descris mai sus este instabil hemodinamic (PA sistolică < 90 mmHg sau o scădere cu > 40 mmHg față de valorile uzuale în ciuda unei repleții hidrice corecte) sau există criterii epidemiologice de risc ridicat de rezistență la azoli (anamneză sau colonizare cu tulpini de *C. glabrata*, *C. krusei* sau tulpini cunoscute ca rezistente la azoli; > 2 săptămâni de profilaxie cu azoli în ultimele 90 de zile; bolnav cu boală hematologică malignă sau seropozitiv pentru infecția HIV).

O asemenea abordare este susținută și de studiul de **cost eficiență al terapiei antifungice empirice la bolnavul din STI** publicat de echipa lui Golan, 2005. Analizând costurile/an de viață salvată (indicatorul unanim acceptat al eficienței oricărei intervenții terapeutice), autorii concluzionează că terapia empirică antifungică de tip fluconazole iv este cost/eficientă pentru majoritatea bolnavilor din STI, dar pentru cei cu risc crescut, cheia eficacității este asigurată de caspofungin, dar cu costuri evident mai ridicate. Încercând să adaptăm aceste date la situația din țara noastră putem sugera că:

- în serviciile care nu au recurs până acum la terapie profilactică antifungică cu fluconazole pe scară largă, terapia empirică a bolnavului critic poate fi fluconazole.

- pentru serviciile care au acum deja 10 ani de terapie profilactică și curativă cu fluconazole se impune un studiu local de epidemiologie a tulpinilor de fungi (epidemiologia locală fiind decisivă în orice decizie de terapie empirică antimicrobiană). Acolo unde aceste studii nu au fost deja efectuate pare mai sigur să se instituie terapie empirică de tip caspofungin, urmând ca la izolarea tulpinii și după stabilirea sensibilității acesteia să se treacă la dezesescaladare. În Clinica ATI a SUUB preferăm acest mod de abordare, având în vedere nivelul de rezistență la fluconazole al tulpinilor de *Candida* izolate în ultimii doi ani. Recurgem la dezesescaladare după determinările de laborator. Acolo unde sensibilitatea este dovedită se trece pe azoli intravenos și apoi per os până la sterilizarea focarului.

- expunerea anterioară la azoli (terapie profilactică sau terapie antifungică în ambulator

în ultimul an) poate aduce risc de rezistență la azoli și impune recurgerea la echinocandine în terapia empirică.

- evident că luăm de fiecare dată în discuție și opțiunea de **voriconazole** pentru terapia antifungică empirică; reținerea de a administra voriconazole în terapie empirică la bolnavul critic, instabil se datorează faptului că testarea sensibilității la voriconazole a început mult mai târziu și datele nu sunt concludente până în acest moment. Din datele de până acum însă caspofungin pare să aibă un trend de sensibilitate mai bun. Pe de altă parte specialiștii sunt departe de a fi tranșat disputa fungicid/fungistatic și până la validarea afirmației că pentru bolnavul critic acest aspect este mai puțin important decât situația de antibiotic bactericid/bacteriostatic, pare mai sigură recurgerea la un agent fungicid (această afirmație are la bază în principal faptul recunoscut de experți că terapia empirică adecvată cât mai precoce instituită scade rata mortalității la bolnavul critic). Folosim voriconazole în dezesescaladare și terapie per os până la sterilizarea focarului.

- cât privește **amfotericina B** (formă simplă sau lipozomală), moleculă care se regăsește în majoritatea ghidurilor actuale de terapie antifungică empirică, pe de o parte aduce un risc de nefrotoxicitate pe care echinocandinele nu o au, iar pe de altă parte molecula nu este disponibilă în țara noastră

- practic, opțiunea între poliene, echinocandine și noii azoli pentru **terapia antifungică empirică a bolnavului critic este dictată de doi parametri de importanță capitală: epidemiologia locală a tulpinilor de fungi** (ex. terapia empirică de tip fluconazole ar putea fi o eroare dacă în secție circulă tulpini de *Candida glabrata* sau *krusei*, dar poate fi o bună alternativă pentru un bolnav stabil și dintr-o secție în care circulă predominant tulpini de *Candida albicans*) și **starea imunitară a gazdei** (ex. severitatea bolii, locul infecției, neutropenia, disfuncții de organ asociate). Pe lângă acestea, **disfuncțiile de organ (hepatică și/sau renală)** pot limita opțiunea pentru o clasă sau alta de antifungice, după cum polipragmazia care se practică, prin forța împrejurărilor la bolnavul critic, impune mare atenție la posibilele **interacțiuni medicamentoase**. Un

alt element deloc de neglijat este și **costul** acestor terapii, pentru că se știe că terapia antifungică nu este niciodată ieftină. Studiul lui Golan 2005 ne ajută să tranșăm discuția în termeni de cost/eficiență (vide supra).

- **conceptul de deescaladare** este extrem de important pentru că permite inițierea terapiei cu agenți mai costisitori și spectru ultralarg, iar apoi, după identificarea tulpinii și/sau stabilizarea pacientului să se recurgă la un agent cu spectru mai îngust și chiar mai ieftin.

- în cazurile foarte grave, împreună cu medicul specialist de boli infecțioase putem lua decizia de **terapie empirică combinată antifungică la un bolnav instabil**, dar aceste combinații nu sunt încă validate de date statistice semnificative.

### Candidoza hepatosplenică (candidoza cronică diseminată)

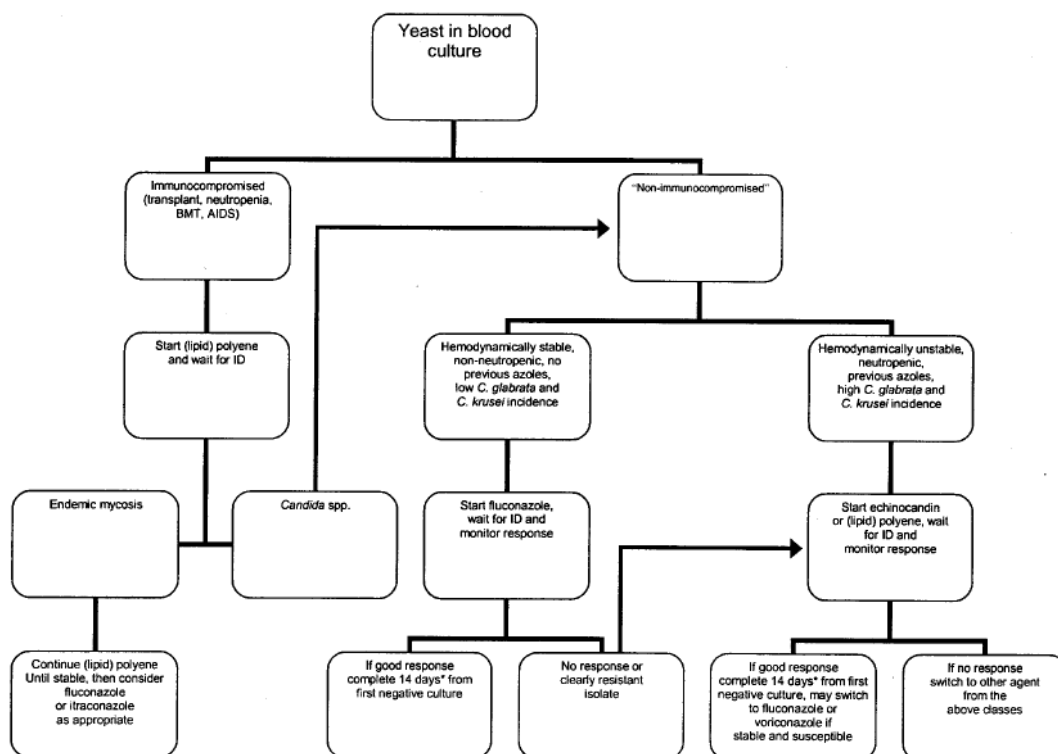
Pentru bolnavul stabil se preferă fluconazole în cure prelungite, în timp ce pentru bolnavul instabil sau în formele refractare se recomandă AmB, de preferat forma lipozomală.

Terapia se continuă până la calcificarea leziunilor, mai ales dacă bolnavul continuă chimioterapia sau imunosupresia. Oprirea prematură a terapiei antifungice poate determina recurențe infecțioase.

### Candidoza urinară

Dacă în anii '40 infecțiile urinare cu fungi nu erau cunoscute, în mai puțin de 60 de ani s-a ajuns în situația de a avea infecții nosocomiale cu acești germeni. În SUA sunt descrise până la 40% infecții nosocomiale la bolnavul din Terapie Intensivă cu specii de candida, iar rata de infecții fungice asociate prezenței cateterului urinar variază între 24,8- 26,5% în studii recente; tot în SUA Candida a devenit germenele cel mai des izolat din urina bolnavilor aflați în STI. Creșterea incidenței funguriei a fost asociată cu utilizarea pe scară tot mai largă a cateterelor urinare, terapiei cu antibiotice cu spectru ultralarg, corticoterapiei, agenților imunosupresori sau chimioterapiei la bolnavul neoplazic. Alți factori de risc pentru fungurie sunt: vârsta, sexul feminin, diabetul zaharat, insuficiența renală

Fig. 4. Modalitatea de abordare recomandată pentru bolnavul critic cu candidiază invazivă (preluare după Ostrosky, Pappas 2006)



cronică, hemodializa etc. Este vorba, de regulă de germeni de tip *Candida*, predomină speciile albicans, dar există o tendință persistentă de creștere a incidenței funguriei cu specii nonalbicans (*glabrata*, *tropicalis*, *krusei* etc.).

### **Definirea funguriei și a infecției de tract urinar inferior**

Prezența fungilor în urină poate să însemne contaminare, colonizare de cateter sau infecție; este greu de diferențiat colonizarea de cateter de infecție. Vom încerca să adaptăm pentru diferențiere criteriile CDC (Center for Disease Control, Atlanta, SUA), după cum urmează:

Bacteriuria asimptomatică este definită de CDC după unul din criteriile:

1. Bolnavul are un cateter urinar de șapte zile înaintea prelevării, are o urocultură pozitivă și  $> 10^5$  microorganisme/cm<sup>3</sup> de urină, nu prezintă  $> 2$  tulpini de germeni în urină, nu este febril, nu are disurie, polakiurie, tensiune la palpate suprapubiană

2. Bolnavul nu a avut cateter urinar în cele 7 zile care au precedat prima urocultură pozitivă și are cel puțin două uroculturi pozitive,  $> 10^5$  germeni/cm<sup>3</sup>, nu are  $> 2$  tulpini de germeni izolate în urină, nu are febră, disurie, polakiurie sau tensiune suprapubiană.

Conform normelor CDC infecția asimptomatică de tract urinar inferior se caracterizează prin cel puțin unul din criteriile de mai jos:

1. Bolnavul are o urocultură pozitivă, adică  $> 10^5$  germeni/cm<sup>3</sup> de urină, nu mai mult de două tulpini de germeni în urocultură și are cel puțin unul din următoarele semne sau simptome, care nu pot fi atribuite altei cauze: febră ( $>38^\circ\text{C}$ ), disurie, polakiurie, tensiune suprapubiană.

2. Bolnavul are cel puțin două din următoarele semne sau simptome care nu pot fi atribuite unei alte cauze: febră ( $>38^\circ\text{C}$ ), polakiurie, disurie sau tensiune suprapubiană și cel puțin unul din următoarele criterii: test calitativ pozitiv pentru esterase leucocitare și/sau nitrați, piurie (urină cu  $> 10$  leucocite/mm<sup>3</sup>), germeni vizibili la examinarea microscopică a frotiului colorat Gram și cel puțin două uroculturi pozitive, cu izolarea repetată a aceluiași germene cu  $10^2$  colonii/ml în urina spontană.

Studiul recent al lui Tambyah și Maki a arătat că cca. 90% din bolnavii diagnosticați cu infecții de cateter urinar ( $< 10^3$  microorganisme/ml) sunt, de regulă, asimptomatici și că numai cca. 52% din așa numitele infecții urinare au avut diagnosticul validat de un medic. Practic criteriile CDC pentru diagnosticul bacteriuriei și infecțiilor urinare au fost extrapolate și pentru fungi; astfel, funguria este definită prin prezența a  $> 10^2$  cfu (colonii formatoare de unități sau microorganisme/ml) într-o probă de urină corect colectată, iar bolnavul este asimptomatic. Infecția urinară cu fungi este definită ca  $> 10^2$  cfu fungi/ml în două probe de urină corect colectate, iar bolnavul este clinic simptomatic.

Semnificația clinică a candiduriei poate rămâne imprecisă. De cele mai multe ori este vorba de colonizarea căilor urinare. Candiduria asimptomatică rareori are nevoie de terapie, dar candiduria poate fi uneori singura documentare microbiologică a candidozei diseminate. Managementul funguriei asociate cateterului urinar rămâne neclar. Funguria asimptomatică sau însoțită de simptomatologie minimă va fi tratat prin corectarea factorilor de risc și schimbarea cateterului urinar. Funguria se poate remite fără terapie în cca. o lună. Schimbarea cateterului urinar duce la eradicarea funguriei la cca. 20% din bolnavi, în timp ce renunțarea la cateter va duce la remisia funguriei la peste 40% din bolnavi.

Având în vedere că, la unii din bolnavii critici, candiduria poate fi sursa unei diseminări hematogene, candiduria va fi tratată la toți bolnavii simptomatici, cu neutropenie, cei care vor suferi instrumentări urologice etc. Durata recomandată a terapiei antifungice este de 7-14 zile. Se recomandă de asemenea renunțarea la dispozitivele de pe traiectul căilor urinare, iar acolo unde nu este posibil se recomandă înlocuirea lor cu dispozitive noi. Persistența candiduriei impune investigații imagistice (CT de aparat urinar). Pentru candiduria persistentă după îndepărtarea cateterului urinar se recomandă fluconazole (voriconazole și caspofungin nu ating concentrații eficiente în urină și nu se recomandă în candidozele urinare necomplicate); se apreciază că la bolnavul cu febră persistentă și fungurie, terapia antifungică se poate adresa de fapt unei candidoze oculte diseminate.

Strategia antifungică prezentată în ghiduri americane sau europene este limitată în cazul nostru de absența din România a amfotericinei B în formă clasică sau lipozomală (folosită în irigații endovezicale). Tratamentul cu fluconazole per os (200 mg per os timp de 14 zile) rămâne o alternativă valabilă care asigură o rată bună de eradicare. Nu se recomandă adaptarea dozelor la clearance-ul de creatinină pentru că reducerea dozelor poate favoriza expunerea germenului la concentrații subinhibitorii de antifungic, cu riscul reducerii eficienței terapeutice și creșterea nivelului de rezistență. Se apreciază prin analize de risc/beneficiu că menținerea dozei de fluconazole se justifică la bolnavii cu disfuncție renală și fungurie.

Nu trebuie să pierdem din vedere și faptul că expunerea la fluconazole crește presiunea de selecție de tulpini rezistente și crește circulația tulpinilor de *Candida nonalbicans*. Dacă ar fi să sistematizăm **abordarea funguriei** la bolnavul critic, putem sublinia următoarele aspecte:

- funguria asimptomatică impune schimbarea cateterului urinar sau renunțarea la acesta și controlul factorilor de risc de tip: diabet zaharat, neutropenie, corticoterapie, imunosupresie, insuficiență renală etc.

- confirmarea prezenței fungilor pe două uroculturi pozitive, bolnavul are factori de risc din categoriile mai sus enumerate și/sau febră persistentă în prezența funguriei și fără alt focar infecțios cunoscut - fluconazole per os 200 mg/zi timp de 14 zile, cu controlul eradicării infecției la o lună și fungigramă la bolnavul cu expunere anterioară la azoli, spitalizări multiple, antibioterapie cu spectru larg în cure repetate în ultimul an etc.

- funguria simptomatică a bolnavului imunocompromis impune evaluare imagistică de urgență (echografie și/sau CT renal).

## **Candidoza cu alte localizări**

### **Candidoza pulmonară**

Pneumonia candidozică pare să existe în două forme: **pneumonia candidozică primară** apare rar, prin microaspirații repetate a secrețiilor faringiene care sunt colonizate cu tulpini de *Candida*, dar cel mai frecvent apare prin **diseminare hematogenă**, ca o manifestare de mare gravitate a candidozei invazive, în care,

atingerea pulmonară este una din atingerile de organ. Diagnosticul de certitudine necesită susținere histopatologică, iar diagnosticul pus exclusiv pe seama determinărilor microbiologice nu este corect. De cele mai multe ori *Candida* este prezentă la nivelul tractului aerian ca germene de colonizare și rareori ca germene infectant.

Atunci când **pneumonia** este o **manifestare de candidoză sistemică, terapia este aceeași ca și în cazul formelor diseminate hematogen**. La bolnavul critic, instabil se recomandă terapie empirică agresivă, cu deescaladare către agenții antifungici cu spectru mai restrâns după determinarea sensibilității tulpinii pe fungigramă. Recent (Wong, 2005) a fost demonstrată eficiența administrării de **casprofungin sub formă de aerosoli în soluție de NaCl 0,9%** pentru a preveni apariția aspergilozei invazive la bolnavul cu imunodepresie severă. Cum administrarea de antibiotice nebulizate pare să fie o promisiune pentru bolnavul cu pneumonie asociată ventilației mecanice, este posibil ca terapia cu antifungice - aerosoli, inclusiv casprofungin să își găsească un loc în terapia micozelor pulmonare la bolnavul critic.

### **Candidoza laringiană**

Laringoscopia și explorarea endoscopică rapidă permit vizualizarea leziunii, prelevarea de probe pentru determinări de laborator, evaluarea patenței căilor aeriene și permite inițierea terapiei antifungice, pentru a preveni și/sau trata stridorul laringian, menține permeabilitatea căilor aeriene și preveni aspirația germenilor în plămân. Riscul obstrucției de căi aeriene face din această localizare o urgență de diagnostic și tratament. Pentru cazurile de gravitate ușoară sau moderată putem recurge la fluconazole per os, în timp ce în cazurile grave se impune terapia antifungică cu spectru larg, până la identificarea tulpinii și determinarea sensibilității pe fungigramă.

### **Endoftalmita candidozică**

Endoftalmita fungică va fi diagnosticată de oftalmolog (cu determinări făcute în vitros). Este indicată terapia agresivă precoce, orice întârziere putând duce la pierderea vederii! Toți bolnavii cu candidemie vor beneficia de cel puțin o examinare retiniană efectuată de un medic specialist oftalmolog. Nu există date din

categoria medicinei bazate pe dovezi care să susțină cu argumente solide o terapie sau alta. Studii mai vechi recomandă amfotericina B singură sau asociată cu flucitozină. Terapia cu fluconazole (disponibilă și la noi în țară) este recomandată mai ales ca terapie de menținere, durata terapiei fiind de 6-12 săptămâni, terapia inițială fiind una cu spectru larg. Diagnosticul este susținut prin determinări din aspiratul vitreal (mai ales când bolnavul are endoftalmită de cauză necunoscută). Unii oftalmologi preferă să instileze local o diluție de amfotericină B atunci când au diagnostic de endoftalmită candidozică. Vitrectomia și instilarea locală de amfotericină sunt propuse de alte echipe oftalmologice pentru bolnavii cu afectare semnificativă a vederii. Pentru bolnavii cu candidoze invazive la care nu am evaluat posibila determinare oculară, există riscul ca aceasta să fie cauza lipsei de răspuns terapeutic sau de recădere infecțioasă. Prognosticul local poate fi, de asemenea catastrofal.

#### **Esofagita cu Candida**

Pentru esofagita cu Candida este omologată indicația de terapie cu caspofungin (dovedită ca având eficacitate similară amfotericinei B) este mai frecvent întâlnită la bolnavul neutropenic. La bolnavul critic nonneutropenic va fi monitorizată ca sit de colonizare și posibilă sursă de translocare, odată cu agravarea stării pacientului.

Alte infecții cu fungi (Aspergillus, Fusarium, Scedosporium etc.) sunt întâlnite extrem de rar la bolnavul dintr-o secție obișnuită de terapie intensivă. Avem însă datoria să urmărim cu atenție bolnavii cu infecții fungice și să nu excludem la nici unul din bolnavii noștri ipoteza unei infecții fungice cu alte tulpini decât Candida.

### **EXPERIENȚA CLINICII ATI A SPITALULUI UNIVERSITAR DE URGENȚĂ BUCUREȘTI ÎN TRATAMENTUL INFECȚIILOR FUNGICE SEVERE LA BOLNAVUL CRITIC**

Date fiind dificultățile de diagnostic și monitorizare a infecțiilor fungice, cât și posibilitățile reduse de intervenție terapeutică au

făcut ca până nu demult să facem profilaxie sau terapie empirică antifungică, respectiv fluconazole iv, la bolnavi critici cu factori de risc majori sau minori din categoria celor enumerați mai sus. Apariția voriconazole pe piața medicamentelor din România nu a putut modifica semnificativ deciziile noastre terapeutice, pentru că greu puteam progresa cu diagnosticul de certitudine.

În februarie 2005 Societatea Română de Anestezie Terapie Intensivă, cu sprijinul companiei Merck Sharp and Dohme, a demarat un program de monitorizare a sensibilității tulpinilor de fungi izolate de la bolnavi internați în 8 centre de terapie intensivă din toată țara, inclusiv, Clinica ATI a Spitalului Universitar de Urgență București (SUUB). Datele preliminare ale acestui studiu au fost prezentate cu ocazia Simpozionului Anual al SRATI 2005, urmând ca în 2006 să se prezinte datele definitive. Studiul a avut ca rațiune determinarea posibilei rezistenței la antifungice a tulpinilor de candida izolate la bolnavul critic în cele 8 centre.

În mai 2005, cele 84 de tulpini recoltate de la bolnavii din cele 8 centre de studiu și izolate pe medii de cultură de tip Sabourraud au fost testate cu trusele Api - candida pentru CMI la amfotericina B, 5 flucitozină, fluconazole și itraconazole. Pentru caspofungin determinarea CMI s-a făcut cu ajutorul E-testelor.

Datele preliminare au arătat la nivelul celor 8 centre (84 de tulpini) o proporție de 58% tulpini de Candida albicans și cca. 41,6% C. nonalbicans; la tulpinile de Candida albicans nivelul de rezistență la azoli a fost de cca 37%, iar la cele nonalbicans de cca. 67%. Pentru bolnavii din Clinica ATI a SUUB, cca. 77% au fost tulpini de C. albicans și 23% nonalbicans. Rezistența la azoli a tulpinilor de C. albicans a fost de 42%, iar a tulpinilor nonalbicans de 96%! (vezi Fig. 5 și 6) Cum numărul de bolnavi nu este foarte mare, iar din aceste determinări numai câteva sunt hemoculturi pozitive, nu putem vorbi de o interpretare statistică a datelor. Surprinde nivelul relativ ridicat de tulpini de C. nonalbicans. Dacă rezistența la azoli devine o problemă semnificativă vom vedea după prelucrarea definitivă a datelor, dar semnalul de alarmă este tras! Prezentăm în continuare câteva cazuri clinice din cazuistica personală, cazuri la care, posibilitatea

Fig. 5. Proportia de specii de candida albicans/nonalbicans izolate la bolnavii din Clinica ATI SUUB

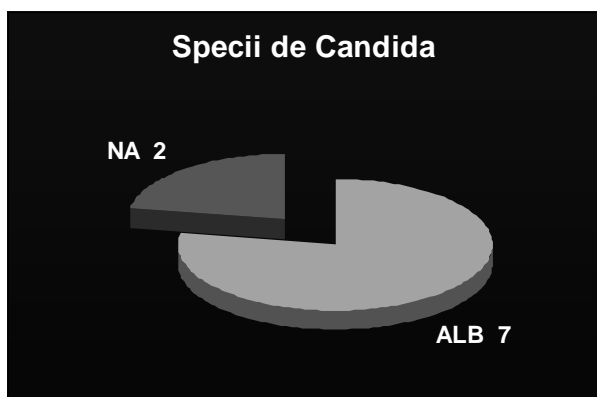
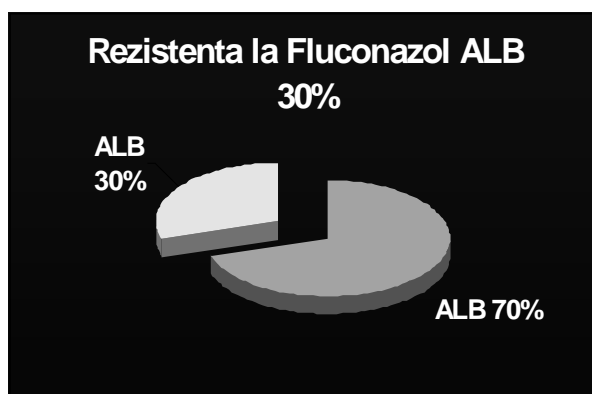


Fig. 6. Incidența rezistenței la flucoazole a speciilor de Candida albicans și nonalbicans izolate la bolnavii din Clinica ATI SUUB



completării investigațiilor prin identificarea tulpinii de candida și a sensibilității acesteia a permis o terapie țintită și o abordare corectă și la timp a patologiei fungice asociate evoluției bolii grave de bază pentru care bolnavul a fost internat în STI.

#### Caz clinic 1 - candidurie asimptomatică – Candida tropicalis - la gravidă cu TCC sever

Am avut surpriza ca prima determinare cu trusele din studiu să fie la o bolnavă de 26 de ani, gravidă 20 de săptămâni, cu traumatism craniocerebral sever după un accident casnic și la care examenul sumar de urină efectuat de rutină la internare a arătat prezența de levuri. S-a

început terapia cu fluconazole iv 400 mg/zi. După două zile, repetând examenul sumar de urină sunt descrise levuri înmugurite. Se identifică prin intermediul trusei API Candida o tulpină de Candida tropicalis rezistentă la azoli (Fig. 7) Nu am avut timp să inițiem o terapie cu caspofungin pentru că starea neurologică a pacientei s-a degradat rapid cu moarte cerebrală. Nu am identificat factori de risc în anamneza luată de la familie pentru candiduria cu o tulpină rezistentă la azoli. Aspectul neobișnuit pentru clinician l-a constituit candiduria la internare la o gravidă venită de acasă, fără internări și terapie antibiotică în antecedente, aspect care poate semnala circulația de tulpini multirezistente de Candida în populația generală.

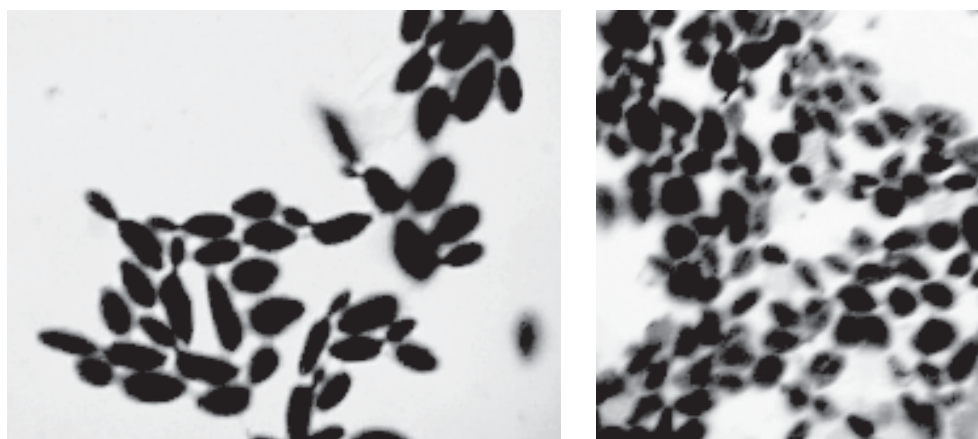
Fig. 7. Tulpina de candida tropicalis izolată cu trusa API Candida la cazul clinic nr. 1



#### Caz clinic 2 - candidoză faringo-laringiană

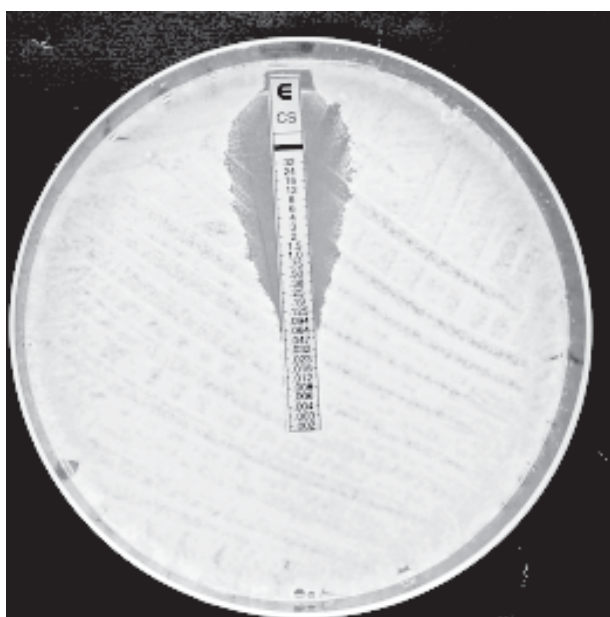
Bolnav de 37 de ani, victima unui accident rutier cu traumatism craniocerebral sever, fracturi multiple, contuzie pulmonară și hepatică, șoc hemoragic și coagulare intravasculară diseminată la internare. După o spitalizare de 45 de zile, timp în care a primit antibioterapie cu spectru larg, transfuzii multiple, nutriție parenterală și enterală, bolnavul se transferă într-un serviciu de Recuperare neuromotorie. La plecare s-a efectuat un screening microbial care a fost negativ pentru bacterii și fungi. Se reinternează la 10 zile, febril, instabil hemodinamic. La screeningul efectuat la admisie se izolează din esofag și faringe o tulpină de C. famata (Fig. 8A) rezistentă la azoli, dar sensibilă la caspofungin

**Fig. 8. Candida famata (imagine de microscopie optică - A) cu caractere morfologice modificate sub terapie cu caspofungin (B - imagine de microscopie optică; se remarcă aporpierea morfologică de C. albicans). Se pare că am surprins o dovadă a morfogenezei tulpinilor de fungi de care vorbeam în materialul precedent**



(Fig. 9); sub tratament am surprins un aspect interesant - modificarea morfologiei microscopice a C. famata către caracterele morfologice de C. Albicans (Fig. 8B). Focarul s-a sterilizat după 8 zile de terapie parenterală. Evoluția ulterioară a bolnavului a fost favorabilă, fără recăderi la peste un an de la acest episod. Particularitatea acestui caz o constituie surprinderea pe imaginea de microscopie optică a transformării morfologice a tulpinii de Candida (ne-am convins că transformarea morfogenetică a candidelor nu este o noțiune livrească!), cu trecerea către caractere morfologice de C. albicans forma

**Fig. 9. Determinarea CMI la caspofungin cu ajutorul unui E-test pentru tulpina de C. famata din fig. 8**



saprofită. Focarul a fost însă sterilizat clinic și micologic, nu a trecut în starea de purtător.

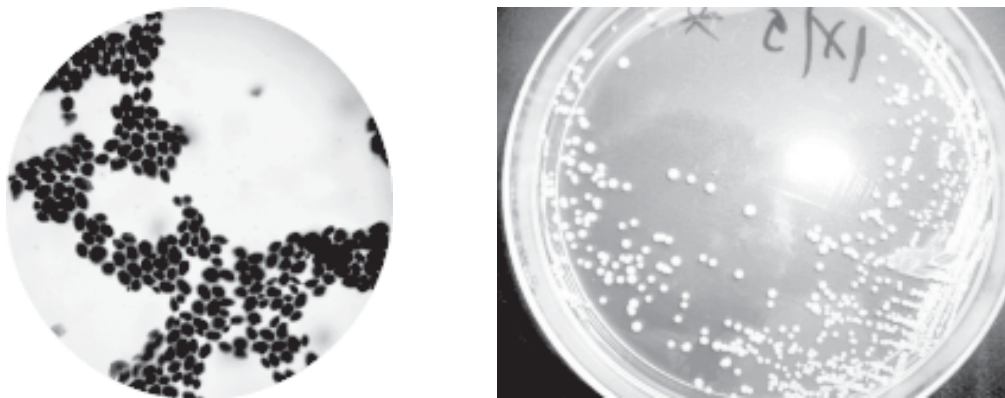
### **Caz clinic 3 - abces cerebral cu Candida albicans rezistentă la azoli**

Bolnav în vârstă de 56 de ani, cu TCC sever după accident rutier vechi de 2 luni este internat în clinica noastră pentru deteriorare neurologică bruscă. Se diagnostichează prin examinare CT cerebrală un abces în patul leziunilor posttraumatice de dilacerare frontoparietală. Se intervine neurochirurgical și se evacuează abcesul, iar din secreția trimisă pentru analiză Laboratorului Microbiologie se izolează C. albicans, rezistentă la azoli (Fig. 10). Sub terapie cu caspofungin se reușește sterilizarea focarului, dar deteriorarea neurologică s-a dovedit ireversibilă; bolnavul s-a transferat cu sechele mari invalidante într-un serviciu de recuperare neuromotorie, dar a decedat la două luni prin infecții repetate pe fond de imuno-depresie severă.

### **Caz clinic 4 - candidoza pulmonară la bolnavă cu suferință neurologică ireversibilă**

Bolnava de 19 ani, victima unui accident rutier, cu leziuni traumatice cerebrale extrem de severe, leziuni axonale difuze, cauză de evoluție neurologică nefavorabilă. Practic la cca. 45 de zile de la admisia în STI bolnava a prezentat pierdere masivă de masă neuronală, cu hidrocefalie și atrofie corticală (Fig. 11). Pe fondul

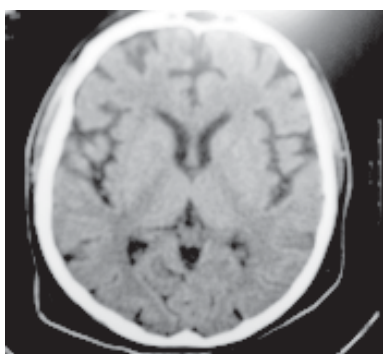
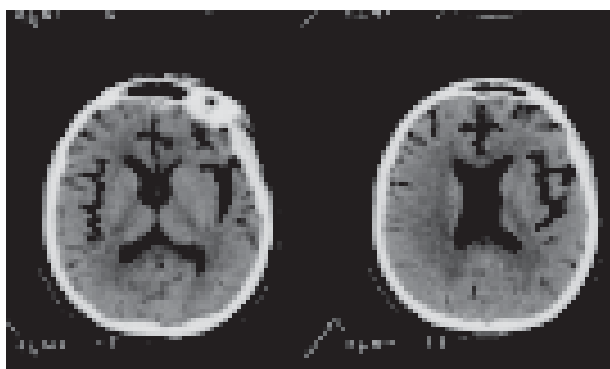
Fig. 10. Tulpina de *Candida albicans* (imagine de microscopie optică - A și colonii pe mediu de cultură - B)



evoluției neurologice constant nefavorabile, bolnava a făcut infecții repetate pentru care a primit antibioterapie cu spectru larg, a fost multiplu cateterizată, ventilată mecanic etc. A primit profilaxie antifungică (fluconazole 400 mg/zi) începând cu ziua 22 de internare. Face sub ventilație mecanică o candidoză pulmonară cu *C. albicans* rezistentă la azoli (Fig. 12). Focarul pulmonar a răspuns favorabil la terapia cu caspofungin, dar a continuat să facă infecții

bacteriene care au condus la deces la 3 luni de la admisie în STI. Apreciem că prognosticul nefavorabil al acestei bolnave a fost dictat de la internare de gravitatea leziunilor axonale difuze cerebrale posttraumatice. Faptul că nu a putut fi transferată într-o clinică de recuperare neuromotorie a forțat prelungirea staționării sale în STI, fapt care a favorizat inițial colonizarea apoi infecția cu germeni rezistenți de spital. Infecția fungică pulmonară a fost doar un nou episod infecțios pe fondul unei evoluții constant nefavorabile.

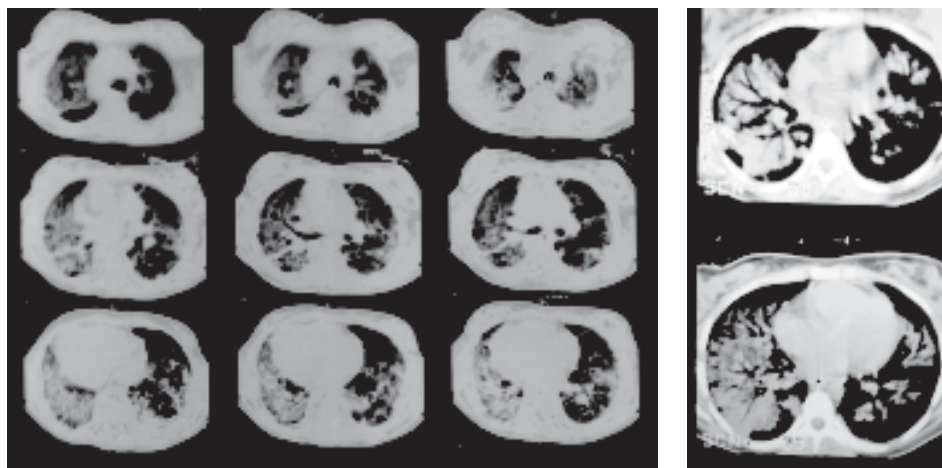
Fig. 11. Aspect CT cerebral - suferință cerebrală severă post TCC sever cu leziuni axonale difuze și pierdere masivă de masă neuronală la cca. 2 luni postimpact (bolnava de 19 ani)



#### Caz clinic 5 - candidurie simptomatică la bolnav critic

Bolnavă de 19 ani, cu politraumatism sever prin accident rutier, traumatism craniocerebral sever, traumatism toracopulmonar sever, care a impus ventilație mecanică peste 60 de zile, leziune traumatică de coloană vertebrală lombară cu interesare mielică și paraplegie, a prezentat la cca. 40 de zile de la admisie și de antibioterapie cu spectru larg, febră, cu sindrom de disfuncție organică multiplă nou instalată. S-a identificat în urocultură *Candida albicans*, care a persistat după schimbarea catererului urinar pe care se formase biofilm. Ca element suplimentar de rezistență, se poate observa și pe secțiunile microscopice tendința germenilor la filamentare (element asociat rezistenței crescute la terapia antifungică - Fig. 13). A necesitat 21 de zile de terapie antifungică - fluconazole iv, apoi per os. În acest caz, determinarea urinară (fungurie + biofilm) a fost simptomatică și însoțită de manifestări sistemice de tip disfuncție organică multiplă, elemente de gravitate deosebită.

**Fig. 12. Aspect CT toraco-pulmonar la bolnava de mai sus; candidoză pulmonară cu *C. albicans* rezistentă la azoli**



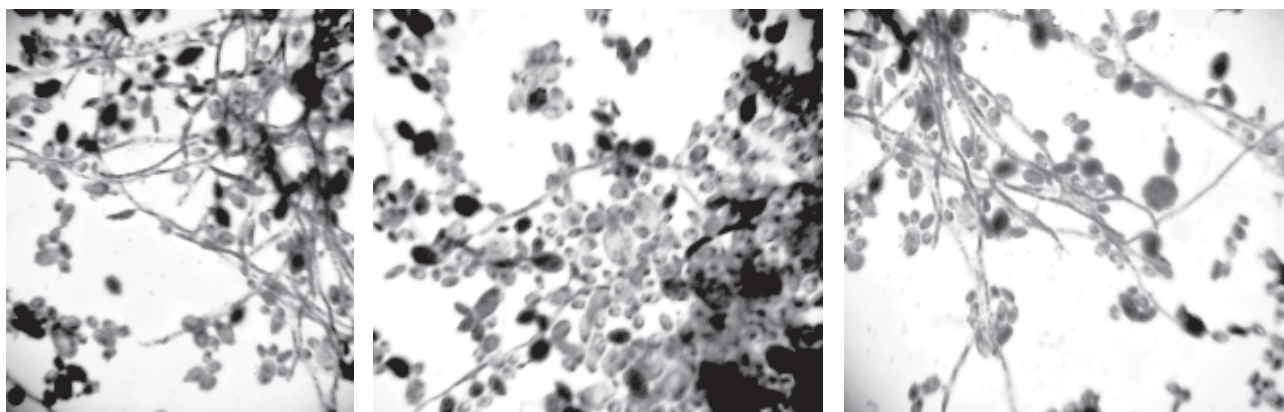
**Caz clinic 6 - peritonită candidozică postperforație de ulcer gastric**

Bolnav în vârstă de 54 de ani se internează și este operat de urgență pentru ulcer gastric perforat cu peritonită generalizată veche de cca. 48 de ore. Din păcate nu s-au prelevat intraoperator probe de lichid peritoneal. La 48 de ore postoperator starea pacientului se degradează brusc, este readmis în STI cu sindrom de disfuncție organică multiplă: disfuncție respiratorie (Acute Lung Injury), dar și componentă de edem cardiogen prin disfuncție miocardică severă, cu cardiomegalie și necesar de suport inotrop. În următoarele 24 de ore se reintervine chirurgical și se evacuează o colecție restantă între ansele intestinale. Starea bolnavului nu s-a ameliorat postreintervenție. A necesitat suport

ventilator. Prelevarea de lichid peritoneal intraoperator a permis izolarea unei tulpini de *Candida albicans*, cu sensibilitate bună. Determinări concomitente de exudat faringian și secreție traheală au permis izolarea unei tulpini de *Candida albicans* cu același pattern de sensibilitate ca și tulpina din lichidul peritoneal. Postoperator bolnavul a prezentat și o colecție la plaga operatorie din care s-a izolat tot *Candida albicans*. Am apreciat că este vorba de o însămânțare a peritoneului cu tulpina de *Candida albicans* care coloniza tractul digestiv și căile aeriene ale bolnavului, cu ocazia perforației ulcerului. Este o cauză rară de peritonită, dar citată în toate tratatele de specialitate.

S-a instituit terapie cu fluconazole intravenos, apoi per os. Starea pacientului s-a

**Fig. 13. Imagini de microscopie optică la cazul clinic nr. 9 - candidurie asimptomatică la bolnavă cu politraumatism sever, paraplegie. Biofilm de candida la nivelul sondei vezicale. Candiduria s-a menținut după schimbarea cateterului urinar. Filamentarea extensivă a fost apreciată ca formă de rezistență crescută la antifungic**



ameliorat relativ rapid. A fost sevrat de ventilația mecanică în 48 de ore și de suportul inotrop la 4 zile. Echocardiografia a sugerat o cardiomiopatie dilatativă posibil preexistentă episodului actual. Bolnavul s-a externat după 10 zile de la reintervenție, iar terapia antifungică a fost continuată până la 21 zile sub supravegherea medicului specialist de boli infecțioase. A prezentat o ascensiune moderată a testelor hepatice după instituirea terapiei cu fluconazole care nu a impus însă înlocuirea sa.

### **Caz clinic 7 - candidemie cu *Candida albicans* rezistentă la azoli la lăuză cu pancreatită acută severă**

Bolnavă de 24 de ani, cu lăuzie de 21 de zile, se internează în clinica ATI a Spitalului Elias București cu pancreatită acută necrotico-hemoragică. După o staționare de cca. 2 luni în terapie intensivă și mai multe episoade de sepsis local cu răsunet sistemic, care au impus mai multe intervenții chirurgicale de asanare și antibioterapie prelungită cu spectru larg a prezentat o

infecție a locului de inserție a cateterului venos central de unde s-a izolat o tulpină de *Candida albicans* la care nu s-a făcut fungigramă. La cca. 10 zile de la această prelevare bolnava a prezentat o deteriorare bruscă a stării generale, cu disfuncție organică multiplă, deteriorare hemodinamică, febră, disfuncție respiratorie. S-a adăugat la schema de antibioterapie caspofungin, obținându-se ameliorarea stării generale în cca. 24 de ore, cu afebrilitate, stabilizarea hemodinamicii. Hemocultura a identificat o tulpină de *Candida albicans* rezistentă la fluconazole. S-a continuat terapia antifungică cca. 14 zile. Evoluția imediată și la distanță a fost bună. Acest caz este reprezentativ pentru terapia empirică adecvată la bolnav cu factori de risc multipli, disfuncții de organ, imunitate deprimată (lăuzie, sepsis, staționare prelungită în reanimare etc.), înainte de obținerea determinărilor de laborator. Nu a fost posibilă dezescaladarea și trecerea la terapia per os datorită rezistenței la azoli și imposibilității (la acel moment) de determinare a sensibilității la voriconazole.

**Tabel 1. Caracteristicile de bază pentru principalele antifungice utilizate la noi în țară în acest moment**  
(modificat după Ostrosky, Pappas, 2006)

<b>Medicament</b>	<b>Doze uzuale în candidemia invazivă</b>	<b>Comentarii</b>
<i>Fluconazole</i>	6-12 mg/kgcorp/zi iv sau per os 400 – 800 mg/zi	Bioechivalența iv/per os > 90% chiar și la bolnavii postchirurgie digestivă. Posibile interacțiuni medicamentoase. Ascensiune moderată a testelor de citoliză hepatică.
<i>Caspofungin</i>	70 mg doză de încărcare, apoi 50 mg iv zilnic*	Creșteri ușoare ale testelor de funcție hepatică. De evitat în insuficiența hepatică- scor Child Pugh B sau C. Interacțiuni medicamentoase cu rifampicina și ciclosporina A.
<i>Voriconazole</i>	6 mg/kg iv la 2 ore – doza de încărcare, apoi 3 mg/kg iv la 12 ore sau 400 mg doza de încărcare per os (ziua 1), urmată de 200 mg per os la 12 ore.	Interacțiuni medicamentoase multiple care necesită revizuirea medicației concomitente. Reacții adverse la nivel hepatic, tulburări de vedere etc. Avantaje incerte comparativ cu polienele și fluconazole, cu excepția activității superioare pe tulpini de <i>Candida glabrata</i> și <i>krusei</i> . Formularea iv nu poate fi folosită în insuficiența renală. Posibil avantaj față de echinocandine în infecțiile cu <i>Candida parapsilosis</i> .

\* se află în derulare inclusiv în țara noastră un studiu clinic multicentric de faza a treia, care studiază posibilitatea creșterii dozei de încărcare în candidioza invazivă la bolnavul critic.

N.B. – echinocandine noi, de tip anidulanfungin sau micafungin, sunt în curs de validare pentru România. În acest moment ambele molecule nu sunt aprobate de FDA pentru candidozele invazive, dar există pentru fiecare cel puțin un studiu statistic semnificativ comparativ cu amfotericina B sau fluconazole pentru această indicație

Putem spune în final, că pentru un număr redus, dar semnificativ de bolnavi internați în STI, diagnosticul și tratamentul infecțiilor fungice continuă să rămână o mare provocare pentru clinician. Monitorizarea atentă a evoluției clinice a bolnavului, legătura permanentă cu laboratorul de microbiologie și specialiștii în boli infecțioase trebuie să rămână o constantă a activității în clinicile de Terapie Intensivă. Apreciem că este de dorit continuarea monitorizării tendinței epidemiologice a infecțiilor fungice la bolnavul critic pentru a putea elabora în viitor ghiduri sau recomandări naționale de terapie antifungică la bolnavul nonneuropenic din secțiile de Terapie Intensivă.

## BIBLIOGRAFIE

1. MORGAN, J.; ALEXANDER, B.; WANNEMUEHLER, K.; et al : *Quantification of risk for invasive fungal infections (IFI) among transplant (TX) recipients reporting to TRANSNET*. Program and abstracts of the 44th Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy; October 30-November 2, 2004; Washington, DC. Abstract M-1058.
2. ANAÏSSIE, E.J.; STRATTON, S.L.; DIGNANI, M.C.; et al: *Pathogenic Aspergillus species recovered from a hospital water system: a 3-year prospective study*. Clin Infect Dis. 2002;34:780-789.
3. KLONT, R.; RIJS, A.; WARRIS, A. ; et al : *Bacterial and fungal contamination of commercial bottled mineral water from 16 Countries*. Program and abstracts of the Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; October 30-November 2, 2004; Washington, DC. K-1603.
4. PAVIE, J.; BOUAKLINE, A.; FEUILHADE, M.; et al. *Fungal contamination of hospital healthcare workers' overalls*. Program and abstracts of the Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; October 30-November 2, 2004; Washington, DC. M-1031.
5. VANDEWOUDE, K.; COLARDYN, F.; VERSCHRAEGEN, G.; et al: *Clinical relevance of positive aspergillus cultures in respiratory tract secretions in ICU patients*. Program and abstracts of the Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; October 30-November 2, 2004; Washington, DC. K-1440.
6. BASSETTI, M.; RIGHI, E.; REBESCO, B.; et al: *Epidemiological trends in nosocomial candidemia in*

*ICU: a five-year Italian perspective*. Program and abstracts of the Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; October 30-November 2, 2004; Washington, DC. M-1048.

7. BAILLIE, G. S.; AND L, J. DOUGLAS; 2000. *Matrix polymers of Candida biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents*. J. Antimicrob. Chemother. **46**:397-403.

8. RAMAGE, G.; K. VANDEWALLE; J. L. LOPEZ-RIBOT; AND B. L. WICKES. 2002. *The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in Candida albicans*. FEMS Microbiol. Lett. **214**:95-100

9. Ramage G si col- *Candida* biofilms- an update. Minireview. Eukaryotic Cell, April 2005, p. 633-638, Vol. 4, No. 4 1535-9778/05

10. PAPPAS, P.G.; REX, J.H.; SOBEL, J.D.; FILLER, SG, DISMUKES WE, WALSH TJ, EDWARDS JE. *Guidelines for treatment of candidiasis*. Clin Infect Dis 2004 Jan 15;38(2):161-89.

11. WALSH, T.J.; TEPLER, H.; DONOWITZ, G.R.; MAERTENSJA, BADEN LR, DMOSZYNSKAA.; CORNELLY, O.A.; BOURQUE, M.R.; LUPINACCI, R.J.; SABLE, C.A.; DE-PAUW, B.E.: *Caspofungin versus liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with persistent fever and neutropenia*. N Engl J Med 2004; 351: 1391-402.

12. V. KULLEMAN, et al: *Safety and potential of drug interactions of caspofungin and voriconazole in the multimorbid patient*. Pharmacology 2005; 75:165-178

13. MORA-DUARTE, J.; BETTS, R.; ROTSTEIN, C.; et al: *Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis*. N Engl J Med 2002;347:2020-2029.

14. PFALLER, M.A.; JONES, R.N.; MESSER, S.A.; EDMOND, M.B.; WENZEL, R.P.; *National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of Candida other than Candida albicans: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program*. Diagn Microbiol Infect Dis 1998;30:121-129.

15. A. WONG: *Behringer et al- Suitability of caspofungin for aerosol delivery: physicochemical profiling and nebuliser choice*. Chest, 2005; vol.128, iss 5, pg.3711- 3717.

16. Y.GOLAN; M.WOLF: *Empirical anti-candida therapy among selected patients in the intensive care unit*. Ann Int Med 2005, 143, 12.

17. S. BACHMANN; K.VANDEWALLE: *In vitro activity of caspofungin against candida albicans biofilms*. Antimicrob Ag and Chemotheray, 2002, vol.46, p. 3591-3596