

PAULA CRISTHINA NIZ XAVIER

**ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DE CANDIDEMIA EM
PACIENTES INTERNADOS NO NHU-UFMS, 1998 – 2006.**

CAMPO GRANDE-MS

2008

PAULA CRISTHINA NIZ XAVIER

**ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DE CANDIDEMIA EM
PACIENTES INTERNADOS NO NHU-UFMS, 1998 – 2006.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

ORIENTADORA: PROF^a DR^a MARILENE RODRIGUES CHANG

COORDENADOR: PROF^o DR^o RICARDO DUTRA AYDOS

CAMPO GRANDE-MS

2008

PAULA CRISTHINA NIZ XAVIER

**ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DE CANDIDEMIA EM
PACIENTES INTERNADOS NO NHU-UFMS, 1998 – 2006.**

Aprovada em: 09 / 05 / 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª Marilene Rodrigues Chang

Universidade Federal do Mato Grosso do Sul-MS

Prof^ª. Dr^ª Anamaria Mello Miranda Paniago

Universidade Federal do Mato Grosso do Sul-MS

Prof^ª. Dr^º Renato Andreotti e Silva

Embrapa Gado de Corte do Mato Grosso do Sul-MS

Prof^ª. Dr^ª Maria de Fátima Cepa Matos (Suplente)

Universidade Federal do Mato Grosso do Sul-MS

Dedico este trabalho

A Deus que é o Ser maior

*A meus pais
que sempre me incentivaram e me
deram a vida para que eu pudesse realizar
todos os meus sonhos.*

*A meus avós, João e Maria, pelo incentivo e
apoio que sempre me deram em toda a minha vida.*

*A minha família:
Jary, que por muitos momentos teve que ser Pai e Mãe.
Ao Felipe e Ana Carolina que por muito tempo foram, privados da atenção materna.*

Agradecimento Especial:

À querida Mestra Profa. Dra. Marilene Rodrigues Chang

Agradecer a Mestra talvez seria pouco por tudo que fez, e que vem fazendo ainda por todos nós.

Durante todos esses anos de convivência não foi só uma orientadora, mas também mãe e amiga que sempre procurou me ajudar e aconselhar sempre que possível.

Pela excepcional dedicação, abdicando-se de férias em companhia da família para conclusão deste trabalho.

Pela atenção em todos os finais de semanas que excederam.

Aprendi que nós podemos e devemos ser os melhores, mas sempre com humildade, “orando e vigiando”.

Sou eternamente grata a você.

Muito obrigado de coração

AGRADECIMENTOS

- *Aos técnicos e auxiliares do Laboratório de Micologia do NHU-MS (Elizabeth Sanches, Floriano Camoçano e Petronílla S. dos Santos), pelo apoio na preparação de meios de cultura).*
- *Ao Pesquisador Dr^a Renato Andreotti e Silva (Embrapa) e a técnica Jackeline Cavalcante Barros pelo apoio e oportunidade prestada.*
- *À professora Dr^a Marise Dutra Asensi do IOC/Fiocruz, pela ajuda na confecção dos dendrogramas.*
- *À Prof^a Dr^a Maria de Fátima Cepa Matos pelo incentivo, apoio e colaboração.*
- *Especial agradecimento à minha mãe, por não medir esforços em deixar a sua casa, viajando constantemente para cuidar dos netos na tentativa de suprir a minha ausência.*
- *As acadêmicas do curso de Farmácia e Bioquímica e amigas Vanessa M. Escobar (FESCG) e Deborah L. Taira (UFMS) pela colaboração.*
- *Aos colegas de equipe: Maína O. Nunes, Gisele Facholi Bomfim, Jary Novaes Isambraide e Lucas Xavier Bonfieti, pela dedicação e ajuda.*
- *A Dr^a Claudete Rodrigues Paula e Dr^a Flávia Emy Matsumoto (ICBS-USP), pela colaboração, co-orientação e treinamento oferecido, resultando em amizade.*
- *A toda a família Chang (Dr^o Chang, Dr^a Marilene, Mei Lin, Eric e Changuinho), pela acolhida, sempre que precisei permanecer em vossa residência. Ao Adolfo Cesar R. Chang (Changuinho), ainda em especial pela assistência técnica em informática.*
- *A Dr^a Anamaria Paniago pelo direcionamento e auxílio inicial.*
- *A professora Regina Célia Vieira, pelo incentivo, ajuda técnica, amizade e compreensão.*

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

Resumos apresentados em Jornadas e Congressos

BONFIM, G.F.; CHANG, M.R.; NUNES, M. O.; XAVIER, P. C. N.; MACHADO, V. E.; SANTIAGO, K. L. & CAMPOÇANO, F. Estudo da ocorrência de infecções na corrente sanguínea causada por fungos em hospital universitário de Mato Grosso do Sul. In: 57ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 07, 2005, Fortaleza – CE. **Resumos ...** Fortaleza - CE: Sociedade Brasileira para o progresso da ciência, 2005, p. 111, Ref. 234.

NUNES, M. O.; CHANG, M.R.; NUNES; BONFIM, G.F.; CAMPOÇANO, F; INSAMBALDE, J. N.; XAVIER, P. C. N. & MACHADO, V. E. Perfil epidemiológico das candidemias ocorridas em pacientes internados no CTI adulto do Hospital Universitário do Mato Grosso do Sul (HU-UFMS In: CONGRESSO REGIONAL DE ANÁLISES CLÍNICAS DO CENTRO OESTE, 11, 2005, Campo Grande – MS. **Resumos ...** Sociedade Brasileira de Análises Clínicas.

BONFIM, G.F.; CHANG, M.R.; NUNES, M. O.; XAVIER, P. C. N.; TAIRA, D.; MACHADO, V. E. & CAMPOÇANO, F. Septicemia por *Candida* spp em pacientes da UTI – neonatal. In: CONGRESSO REGIONAL DE ANÁLISES CLÍNICAS DO CENTRO OESTE, 11, 2005, Campo Grande – MS. **Resumos ...** Sociedade Brasileira de Análises Clínicas.

MACHADO, V. E; CHANG, M.R.; XAVIER, P. C. N.; INSAMBRALDE, J. N.; TAIRA, D. & CAMPOÇANO, F. Comparação do Agar Chromogênico e do método clássico na identificação de espécies de *Candida*. In: 58ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 07/2006, Florianópolis – SC. Sociedade Brasileira para o progresso da ciência.

NUNES, M. O.; XAVIER, P. C. N.; CHANG, M.R.; TAIRA, D.; PALHARES, D. B.; MATSUMOTO, F. E. Perfil molecular e susceptibilidade de *Candida* spp isoladas de hemocultura de pacientes internados na UTI neonatal do hospital universitário – UFMS. In: 1º CONGRESSO DO CENTRO (DIERN), 2007, Campo Grande – MS, MISSÃO SAÚDE, 2007, p. 03, **Anais ...** Campo Grande, MS, 2007.

TRABALHO PUBLICADO EM BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO HOSPITALAR

CHANG, M.R.; XAVIER, P. C. N.; PALHARES, D. B.; ANDREOTTI, R.; NUNES, M. O.; BONFIM, G.F.; ALMEIDA JR, N. F. Análise epidemiológica e tipagem molecular de *Candida* spp, agente de candidemia neonatal, em hospital público do Mato Grosso do Sul. In: **Boletim de epidemiologia do Hospital Unviersitário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul**. v. 2, n. 3, outubro 2007.

Trabalho enviado para publicação:

XAVIER, P.C.N.; CHANG, M.R.; NUNES, M. O.; PALHARES, D.B.; ANDREOTTI, R.; BONFIM, G.F.; ALMEIDA JR, N.F. **Candidemia neonatal, em hospital público do Mato Grosso do Sul, Brasil.** Rev Soc Bras Med Trop. Submetido e aceito para análise em 19/12/2007 sob o registro nº 2910.

CHANG, M.R.; CORREIA, F.P.; COSTA, L.C.; XAVIER, P.C.N.; PALHARES, D.B.; TAIRA, D.L.; PANIAGO, A.M.M.; PONTES, E.R.J.C.; ESCOBAR, V.M. **Candida Bloodstream infection: data of a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil.** Rev Inst Med Trop. São Paulo. Submetido e aceito para análise em 23/01/2008 sob o registro nº 03/08 (22/01/2008).

Manuscrito em preparação:

XAVIER, P.C.N.; CHANG, M.R.; MATOS, M.F.; ANDREOTTI, R. Caracterização molecular de fungos do gênero *Candida* isolados de pacientes com infecção na corrente sanguínea. Rev. Iberoam Micol.

XAVIER, P.C.N.; CHANG, M.R.; PALHARES, D.B.; Frequência e perfil genético de espécies de *Candida* em pacientes internados no setor de pediatria do hospital universitário de Campo Grande-MS, Brasil. Pediatrics.

RESUMO

A incidência de infecções na corrente sanguínea (ICS) causada por *Candida* spp tem aumentado nos últimos anos. Estudos realizados em diferentes países têm mostrado diferença na epidemiologia das infecções invasivas por essas leveduras. Na região Centro-Oeste do Brasil, dados sobre candidemia são escassos. Essa doença está associada à alta taxa de mortalidade (30% a 60%) e a prolongada permanência hospitalar. Nós realizamos uma análise retrospectiva de casos de ICS por *Candida* em um hospital terciário de ensino do Mato Grosso do Sul, Brasil, para estudar os aspectos clínicos e epidemiológicos da doença, assim como para determinar a similaridade genética das leveduras isoladas por meio da técnica de PCR-RAPD. Noventa e seis casos de ICS por *Candida* spp, registrados entre janeiro de 1998 e dezembro de 2006, foram incluídos no estudo. A idade dos pacientes variou de 3 dias a 85 anos, sendo 53 (55,2%) adultos e 43 (44,8%) pediátricos. Eles estiveram internados por um período que variou de 01 a 124 dias com média de 30 dias. Os episódios de candidemia foram registrados em maior número no CTI adulto (n= 29; 30,1%) e UTI neonatal (n= 25; 26,0%). Entre os pacientes pediátricos, 23 eram pré-termos. Dezesete neonatos (68%) tinham peso inferior à 1500g ao nascimento. Cinquenta e oito pacientes (60,4 %) foram a óbito durante a hospitalização. As principais condições associadas foram: permanência hospitalar por mais de 15 dias (n=66; 68,8%), cateter em posição central (61; 63,5 %) e uso de cefalosporina de 3ª geração (n=55; 57,3%). Entre os pacientes pediátricos, cinco (11,6%) apresentavam má formação congênita e doze (27,9%), infecção perinatal. As doenças de base mais relatadas foram: Diabetes Mellitus (10,4%), tumor sólido (9,4%) e doenças hematológicas (12,5 %). Os agentes mais frequentes foram: *Candida albicans* (45,8%), *Candida parapsilosis* (34,4%), *Candida tropicalis* (14,6%) e *Candida glabrata* (5,2%). A amplificação do DNA genômico das leveduras isoladas gerou uma grande variedade de perfis genéticos entre as diferentes espécies de *Candida* e entre as cepas de uma mesma espécie, comprovando o alto poder discriminatório da técnica. Esta é a primeira descrição de infecção na corrente sanguínea por espécies de *Candida* no Mato Grosso do Sul, Brasil, e confirma a importância da suspeita clínica de infecções invasivas por *Candida* spp na evolução do paciente, principalmente quando idosos e neonatos estão envolvidos.

PALAVRAS CHAVES: Candidemia; Fatores de Risco; PCR; *Candida* spp.

ABSTRACT

The incidence of bloodstream (BSI) *Candida* infections has increased in the last years. Studies carried out in several countries have shown differences in the epidemiology of the invasive infections caused by this yeast. In the Center-West region of Brazil, data about candidemia are still scarce. This pathology is associated with high mortality (30% to 60%) and with longer hospital stay. We have carried out a retrospective analysis of cases of *Candida* BSI in a tertiary teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil, to study the clinical and epidemiological aspects of the disease and to determine the genetic similarity of the yeasts isolated through PCR-RAPD assay. Ninety-six cases of *Candida* spp BSI, reported between January 1998 and December 2006, were included in the study. The patients' age ranged from 3 days to 85 years; 53 (55,2%) adults and 43 (44,8%) children. They have been in hospital for a period ranging from 01 to 124 days, with an average of 30 days. Candidemia episodes were recorded most at adult ICU (n= 29; 30,1%) and newborn ICU (n= 25; 26,0). Among the pediatrics, 23 were newborns. Seventeen neonates (68%) had birth weight lower than 1500g. Fifty-eight patients (60,4 %) died during hospital stay. The main associated conditions were: hospital stay longer than 15 days (n=66; 68,8%), catheter in central position (61; 63,5 %) and use of third-generation cephalosporins (n=55; 57,3%). Among the pediatric patients, five (11,6%) presented with congenital malformation and twelve (27,9%) with perinatal infection. The most frequently reported base illnesses were: Diabetes Mellitus (10,4%), solid tumor (9,4%) and hematological diseases (12,5 %). The most common agents were: *Candida albicans* (45,8%), *Candida parapsilosis* (34,4%), *Candida tropicalis* (14,6%) and *Candida glabrata* (5,2%). The amplification of genomic DNA of the isolated yeasts gave origin to a large variety of genetic profiles among the different species of *Candida* and among the strains of the same species, proving the high discriminatory power of the technique. This is the first description of bloodstream infection caused by *Candida* species in Mato Grosso do Sul, Brazil, and confirms the importance of the clinical suspicion of invasive *Candida* spp infections in the patients' evolution, especially when elderly patients and neonates are involved.

KEYWORDS: Candidemia; Risk factors; PCR; *Candida* spp.

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Pacientes com candidemia conforme a faixa etária. HU-UFMS.....	32
Tabela 2. Características demográficas, clínicas e evolução de 25 recém-nascidos com candidemia internados no HU-UFMS.....	33
Tabela 3. Pacientes com candidemia conforme comorbidades e doenças de base. HU-UFMS.....	34
Tabela 4. Condições associadas para o desenvolvimento de candidemia. HU-UFMS.....	35
Tabela 5. Pacientes com candidemia conforme a faixa etária e evolução. HU-UFMS.....	36

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Página

- Figura 1. Distribuição por espécies de *Candida*, isoladas de hemocultura de pacientes adultos e pediátricos, internado no Hospital Universitário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) - Brasil, 1998 a 2006.....37
- Figura 2. Distribuição das espécies de *Candida* segundo o ano de isolamento. Hospital Universitário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) - Brasil, 1998 a 2006.....38
- Figura 3A. Eletroforese em gel de agarose após RAPD-PCR ilustrando diferentes padrões genéticos de *Candida tropicalis*, agentes de infecção em corrente sanguínea, utilizando o *Primer* 5´d[ACGACCGACA]- 3´. Linhas: Y= marcador de peso molecular, L1-ATCC 760; L2-1023H1/00; L3-660H11/05 L4-840H2/02; L5-379H2/01; L6-79H11/00; L7-106H6/03; L8-173H3/00; L9-514H/99; L10-36H7/99; L11-401H9/03; L12-520H10/05; L13-171H4/02; L14-155H11/98.....39
- Figura 3B. Dendrograma ilustrando diferentes perfis de cepas de *Candida tropicalis* isoladas de hemoculturas de pacientes internados em diversos setores do HU-UFMS durante o período de Janeiro de 1998 a Dezembro de 2006.....40
- Figura 4A. Eletroforese em gel de agarose após RAPD-PCR ilustrando diferentes padrões genéticos de *Candida tropicalis*, agentes de infecção em corrente sanguínea de neonatos, utilizando o *Primer* 5´d[ACGACCGACA]- 3´. Linhas: Y= marcador de peso molecular, L1-ATCC 760; L2-62H8/98; L3-1222H3/00; L4-226H8/01.....41
- Figura 4B. Dendrograma ilustrando diferentes perfis de cepas de *Candida tropicalis* isoladas hemocultura de pacientes internados na UTI neonatal do HU-UFMS durante o período de Janeiro de 1998 a Dezembro de 2006.....42

Figura 5A. Eletroforese em gel de agarose após RAPD-PCR ilustrando diferentes padrões genéticos de *Candida glabrata*, agentes de infecção em corrente sanguínea, utilizando o *Primer* 5´d[ACGACCGACA]- 3´. Linhas: Y= marcador de peso molecular, L1-560H7/06; L2-500H2/03 (UTIneo); L3-196H5/98; L4-428H6/06; L5-64H10/02.....43

Figura 5B. Dendrograma ilustrando diferentes perfis de cepas de *Candida glabrata* isoladas de hemocultura de pacientes internados em diversos setores do HU-UFMS durante o período de Janeiro de 1998 a Dezembro de 2006.....44

Figura 6A. Eletroforese em gel de agarose após RAPD-PCR ilustrando diferentes padrões genéticos de *Candida parapsilosis*, agentes de infecção em corrente sanguínea, utilizando o *Primer* 5´d[ACGACCGACA]- 3´. Linhas: Y= marcador de peso molecular, L1-ATCC 22019; L2-229H4/02; L3-891H2/02; L4-874H2/02; L5-851H2/02; L6-288H12/06.....45

Figura 6B. Dendrograma ilustrando diferentes perfis de cepas de *Candida parapsilosis* isoladas de hemoculturas de pacientes internados em diversos setores do HU-UFMS durante o período de Janeiro de 1998 a Dezembro de 2006.....46

Figura 7A. Eletroforese em gel de agarose após RAPD-PCR ilustrando diferentes padrões genéticos de *Candida parapsilosis*, agentes de infecção em corrente sanguínea, utilizando o *Primer* 5´d[ACGACCGACA]- 3´. Linhas: Y= marcador de peso molecular, L1-ATCC 22019; L2-698H3/99; L3-66H8/99; L4-262H12/00; L5-639H8/00; L6-62H10/06; L7-887H9/06; L8-126H10/02; L9-60H1/04; L10-1000H1/04; L11-790H6/04; L12-194H2/04; L13-614H11/05; L14-667H/04; L15-863H4/05; L16-989H5/05; L17-910H2/06; L18-25H3/00; L19-154H1/99; L20-530H11/01; L21-988H10/00.....47

Figura 7B. Dendrograma ilustrando diferentes perfis de cepas de *Candida parapsilosis* isoladas de hemoculturas de pacientes internados em diversos setores do HU-UFMS durante o período de Janeiro de 1998 a Dezembro de 2006.....48

Figura 8A. Eletroforese em ge71 de agarose após RAPD-PCR ilustrando diferentes padrões genéticos de *Candida parapsilosis*, agentes de infecção em corrente sanguínea de neonatos, utilizando o *Primer* 5´d[ACGACCGACA]- 3´. Linhas: Y= marcador de peso molecular, L1- ATCC 22019; L2 -005H10/00; L3- 990H10/00; L4-709H8/06; L5-264H1/98; L6- 434 H2/99; L7- 120H6/05; L8 – 118H3/98; L9- 703H4/03; L10- 736H4/03.....49

Figura 8B. Dendrograma ilustrando diferentes perfis de cepas de *Candida parapsilosis* isoladas de hemoculturas de pacientes internados em UTI neonatal do HU-UFMS durante o período de Janeiro de 1998 a Dezembro de 2006.....50

Figura 9A. Eletroforese em gel de agarose após RAPD-PCR ilustrando diferentes padrões genéticos de *Candida albicans* , agentes de infecção em corrente sanguínea de neonatos, utilizando o *Primer* 5´d[ACGACCGACA]- 3´. Linhas: Y= marcador de peso molecular, L1-253H12/06; L2-530H2/99; L3-713H/01; L4-007H/03; L5-486H2/03; L6-727H4/03; L7- 82H8/04; L8-003H/06; L9-982H3/06; L10-340H5/06; L11-175H4/00.....51

Figura 9B. Dendrograma ilustrando diferentes perfis de cepas de *Candida albicans* isoladas de hemoculturas de pacientes internados na UTI neonatal do HU-UFMS durante o período de Janeiro de 1998 a Dezembro de 2006.....52

Figura 10A. Eletroforese em gel de agarose após RAPD-PCR ilustrando diferentes padrões genéticos de *Candida albicans*, agentes de infecção em corrente sanguínea, utilizando o *Primer* 5´d[ACGACCGACA]- 3´. Linhas: Y= marcador de peso molecular L1-ATCC 10231; L2-133H3/98; L3-10H10/00; L4-78H7/01; L5-422H8/05; L6-591H11/01; L7- 716H4/01; L8-852H2/02; L9-735H10/03; L10-85H8/04; L11-817H6/04; L12-714H12/05; L13-788H4/05; L14-559H06/02; L15-44H10/98; L16-34H6/01; L17-56H5/99; L18- 832H5/03; L19-992H5/03; L20-284H3/04; L21-509H2/05; L22-314H5/06; L23-814H1/06; L24-245H8/01; L25-68H5/99; L26-808H8/06; L27-521H2/98.....53

Figura 10B. Dendrograma ilustrando diferentes perfis de cepas de *Candida albicans* isoladas de hemoculturas de pacientes internados em diversos setores do HU-UFMS durante o período de Janeiro de 1998 a Dezembro de 2006´.....54

Figura 11A. Eletroforese em gel de agarose após RAPD-PCR ilustrando diferentes padrões genéticos de *Candida albicans*, agentes de infecção em corrente sanguínea, utilizando o *Primer* 5´d[ACGACCGACA]- 3´. Linhas: Y= marcador de peso molecular; L1- ATCC 10231; L2-227H8/01; L3-69H12/98; L4-814H1/06; L5- 147H01/98; L6- 332H9/01; L7- 253H4/06; L8-66H11/99; L9-304H8/03; L10-972H10/06.....55

Figura 11B. Dendrograma ilustrando diferentes perfis de cepas de *Candida albicans* isoladas de hemoculturas de pacientes internados em diversos setores do HU-UFMS durante o período de Janeiro de 1998 a Dezembro de 2006.....56

LISTAS DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ATCC	American type culture collection
B	Berçário
BHI	Brain Infusion Heart
CC	Clínica cirúrgica
CM	Clínica Médica
CP	Clinica Pediátrica
CTI	Centro de Terapia Intensiva
DIP	Enfermaria de Doenças infecta parasitárias
DNTP	desoxynucleotide triphosphate
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
H	Setor de Hematologia
HU-UFMS	Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
ICS	Infecção de corrente sanguínea
IG	Idade gestacional
IH	Infecção hospitalar
LLA	Leucemia linfocítica aguda
LMA	Leucemia mielóide aguda
Mm	Milimolar

NHU	Núcleo do Hospital Universitário
NNISS	National Nosocomial Infections Surveillance System
ONC	Setor de Oncologia
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação de polimerase em cadeia)
<i>Pellet</i>	Sedimento
pH	Potencial hidrogênio iônico
<i>Primer</i>	Iniciador
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RN	Recém nascido
RNA	Ácido ribonucléico
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SET	Tris + EDTA + NaCl
Spp	Espécie
TE	Tris-(hidroximetil)-aminometano + EDTA
TGI	Trato gastrointestinal
TRI	Trato respiratório inferior
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
UR	Unidade Renal
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
YPD	Yeast peptone dextrose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Amostragem	19
3.2 Cultura e identificação de leveduras isoladas	19
3.3 Extração do DNA genômico	20
3.4 Amplificação de DNA	22
3.5 Eletroforese em gel de Agarose	23
3.6 Análise dos Perfis de DNA cromossomal das leveduras	23
3.7 Controle de qualidade	23
3.8 Considerações éticas	24
3.9 Conceitos e definições	24
3.10 Critérios de Relações entre cepas	24
4. RESULTADOS	26
5. DISCUSSÃO	57
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXOS	79
APÊNDICE	83

1. INTRODUÇÃO

A doença causada por fungos denominada micose, pode ter vários agentes etiológicos. A causada por *Candida* spp pode-se manifestar de forma aguda ou crônica, superficial ou profunda, localizada ou disseminada (MACDONALD et al., 1997; COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; MESTRONI et al., 2003).

Diversas são as apresentações clínicas observadas entre os pacientes. As mais comuns são: candidíase oral, candidíase vaginal, intertrigo, paroníquia e onicomicose. O problema se agrava quando, em função das doenças de base e de outros fatores, tais fungos tornam-se oportunistas e causam infecções sistêmicas, representando um grave problema em ambiente hospitalar (MURRAY et al, 1998; CHANG, 2003a).

Essas infecções têm emergido como responsáveis por elevados índices de morbidade e mortalidade (40% a 60%), representando um grande desafio para clínicos que trabalham em hospitais terciários em diferentes países (BRODIE et al., 2000; BLUMBERG et al., 2001; MONCADA et al., 2001; LUPETTI et al., 2002; PEMÁN et al., 2002; COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; ABELSON et al., 2005; AQUINO et al., 2005; MEDRANO et al., 2006).

A maioria das infecções causada por *Candida albicans* é de origem endógena, decorrente da proliferação ou da mudança de sítio da levedura, induzida por algum fator predisponente do hospedeiro ou do parasita (COLOMBO et al., 1999; COLOM et al., 2006). Diversas características biológicas contribuem para a habilidade de leveduras como *Candida albicans*, de colonizar e infectar tecidos e órgãos. Fatores de virulência normalmente são determinados geneticamente e são expressos pelos microrganismos apenas quando existem certas condições ambientais favoráveis, tais como, fonte nutricional de ferro, condições atmosféricas, temperatura e pH (MENEZES et al., 2004).

Outra forma de aquisição da doença pode ser por meio de fonte exógena, como por exemplo, leveduras veiculadas pelas mãos dos profissionais de saúde ou por dispositivos intravasculares e cateteres (KOJIC & DAROUCHE, 2004).

Candida albicans é a mais importante levedura patogênica ao homem, embora outras espécies, não albicans, também possam causar infecções (NUCCI *et al.*, 1998; GIUSIANO *et al.*, 2004).

1.1 Histórico sobre candidíase

Embora sem conhecer a etiologia, a primeira descrição de candidose oral foi feita por Hipócrates (460 a 337 a.C.), quando observou e relatou presença de placas esbranquiçadas presentes na cavidade bucal de recém-nascidos e pacientes debilitados. Essas mesmas lesões foram observadas por Galeno (200 a 130 a.C.). No século XVIII, relatos de candidíase bucal em recém nascidos já se faziam freqüentes na Europa. A postulação de transmissão de leveduras pela passagem vaginal do feto deu-se em 1835 por Verón. Onze anos depois, Berg demonstrou a presença de leveduras de *Candida* na boca de crianças sadias. Em 1842, Gruby apresentou o primeiro caso de candidíase frente à Academia de Ciências de Paris/França (ODDS, 1988).

Em 1861, na Alemanha, Zenker descreveu o primeiro caso de infecção cerebral por disseminação hematogênica associado a *Candida*. Quatorze anos depois, Hausmann notou vínculo entre candidíase vaginal da mãe e ocorrência bucal no recém-nascido. Por fim, os trabalhos de Robin (1853), Berkhout (1923) e Kregen Van Rij (1984) ratificaram o emprego da denominação *Candida* ao gênero desse fungo, aceito oficialmente no VIII Congresso Europeu de Botânica (ODDS, 1988).

1.2 Características das leveduras do gênero *Candida*

Essas leveduras fazem parte do reino Fungi; Divisão *Eumycota*; Filo *Deuteromycota*; Classe *Blastomyces*; Ordem *Cryptococales*; Família *Cryptococaceae*; Gênero *Candida*. Dentro desse gênero, cerca de 17 espécies estão atualmente inseridas, sendo as de maior interesse médico aquelas mais frequentemente envolvidas em processos infecciosos (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003) dentre elas: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosi* e outras (MURRAY et al., 1998; PAULA, 1998; LACAZ et al., 2002).

Esses fungos são microrganismos sapróbios que possuem distribuição mundial. Podem ser encontrados em homens (trato gastrointestinal e saliva), animais, solos, água, vegetais, alimentos e em diversos ambientes, inclusive hospitalares (ODDS, 1988; COLOMBO et al., 1996; COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

Em meio de cultivo sólido, como o ágar Sabouraud, as colônias das leveduras se apresentam cremosas, com coloração branca ou bege. Para observação de estruturas microscópicas utilizadas na identificação devem ser cultivadas em meios pobres, como o agar fubá e o agar batata (LARONE, 1995).

Ao microscópio, observam-se estruturas como blastoconídios com ou sem brotamentos, clamidoconídios e pseudo-hifas que se formam quando os blastoconídios que nascem se alongam e não se desprendem da célula que o originou. A formação de tubos germinativos se faz quando a cultura é colocada em meio contendo soro de animais a 37° C; trata-se de um teste de identificação específico que caracteriza a espécie *C. albicans* (LACAZ et al., 2002).

Em meio líquido, como caldo Sabouraud dextrose, há formação de sedimento. As provas de assimilação de fonte carbono (maltose, glicose, rafinose, celobiose, lactose, galactose e

sacarose) e de fermentação de açúcares (dextrose, maltose, sacarose e lactose) também permitem a identificação de espécies de *Candida* (MURRAY et al., 1998).

A produção de substâncias toxigênicas (toxicoglicoproteínas e candidoxina) ocorre durante processo infeccioso por espécies de *Candida*. Essas toxinas induzem, em determinadas doses, a morte de animais de laboratório, demonstrando a sua importância como elemento da infecção fúngica, atuando como importante mecanismo de patogenicidade (ODDS et al., 1988).

1.3 Importância da *Candida* spp como agente de infecção hospitalar

A aquisição de infecções hospitalares depende de uma complexa interação entre hospedeiro susceptível e agente infeccioso (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

Diversas síndromes clínicas estão associadas a infecções fúngicas, principalmente em pacientes gravemente enfermos, relacionadas com fatores como: alteração da imunidade, situação de estresse, AIDS e alterações metabólicas como diabetes mellitus (BARBERINO et al., 2006; NUCCI, & COLOMBO, 2006).

Os extremos do ciclo de vida humana, infância e velhice, constituem indubitavelmente as fases onde os relatos de ocorrência de candidíase são mais propícios, em decorrência do aprimoramento ou deficiência fisiológica do sistema imune (BRODIE et al., 2000). Nesse grupo de pacientes, os microrganismos oportunistas como *Candida* spp podem causar infecções mais graves.

Até a década de trinta, doenças humanas associadas às espécies de *Candida* eram bem mais raras e a candidíase sistêmica era praticamente desconhecida. A relevância das infecções causadas por *Candida* spp em ambiente hospitalar passou a ganhar importância a partir da década de 1980, interligada ao avanço da tecnologia científica médica e ao melhor

conhecimento dos mecanismos desencadeadores de doenças, propiciando uma sobrevivência maior do homem (RIBEIRO et al., 2004). Esse fato fez com que as intervenções de procedimentos clínico-laboratoriais expusessem os pacientes a uma pressão seletiva de microrganismos mais resistentes, favorecidos pelo uso abusivo e por tempo prolongado de antibióticos de amplo espectro (KOJIC & DAROUCHE, 2004).

Desse modo, os relatos de *Candida* envolvida em enfermidades humanas na condição de agente principal e/ou secundário tornaram-se mais freqüentes, fazendo desse fungo um dos mais relevantes e intimamente associados às infecções nosocomiais (ROILIDES et al., 2004; ALMIRANTE et al., 2005).

Vale ressaltar que *C. albicans* é a espécie mais freqüentemente isolada de amostras clínicas, por fazer parte da microbiota humana. Por isso, a maioria das infecções hospitalares por essa levedura é de origem endógena. Segundo Colombo & Guimarães (2003), a maior fonte de contaminação endógena é o trato gastrointestinal. O uso de antibióticos que desequilibram a microbiota normal ou lesam a mucosa gastrintestinal pode facilitar a translocação de *Candida* spp até os capilares mesentéricos, chegando à corrente sanguínea. Outros fatores como uso de drogas imunossupressoras, procedimento médico invasivo, doenças de base, entre outros podem contribuir para que esse fungo se prolifere, causando diferentes tipos de infecção (COLOMBO et al., 1999; VIUDES et al., 2002; COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; RESENDE, 2004).

Por outro lado, a microbiota da pele dos profissionais de saúde e os procedimentos invasivos utilizados em unidades de terapia intensiva (UTI), como, dispositivos intravasculares, cateter venoso central, ventilação mecânica, dreno e outros, têm sido também responsabilizados pela indução de candidíase (COLOMBO et al., 1999; COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; BRODIE et al 2000; MEDRANO et al., 2006).

Os pacientes hospitalizados, em especial aqueles internados em UTIs, freqüentemente estão colonizados por patógenos oportunistas. Nesse grupo de pacientes, uma das apresentações mais sérias é a infecção na corrente sanguínea.

Candidemia, ou candidíase hematogênica, engloba um espectro amplo de situações clínicas, sendo na maioria das vezes inespecíficas, onde a febre apresenta-se como o dado clínico mais comum (ABI-SAID et al., 1997; COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; BASSETE et al. 2006). Em alguns casos, porém, 20% dos pacientes não apresentam febre e 50% não apresentam leucocitose, o que torna o diagnóstico da candidíase um grande desafio (GODOY et al., 2003; WHITE et al., 2003).

Ainda que conhecida a importância clínica dessas leveduras, a história natural de pacientes com candidemia mostra que parte dos episódios de fungemia tem caráter transitório e autolimitado, particularmente em hospedeiros neutropênicos. Entretanto, não há dados clínicos ou laboratoriais que permitam ao clínico identificar com segurança o momento em que há o diagnóstico de fungemia; quais episódios serão apenas transitórios e quais acarretarão quadros de candidíase hematogênica disseminada com invasão tecidual em vísceras e sepse (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

1.4 Fatores de risco para as infecções sistêmicas

Dentre os fatores que favorecem o desenvolvimento de infecções, especificamente de candidemias, pode-se citar: alterações dos mecanismos de defesa do hospedeiro decorrentes de mudanças fisiológicas características da infância (prematuridade associada a baixo peso) e do envelhecimento ou, mais freqüentemente, associadas a doenças de base degenerativas, neoplasias, quimioterapia, hemodiálise, corticoterapia, pacientes com cirurgias prévias, imunodeficiências congênitas ou adquiridas, imunodepressão induzida por atos médicos e

neutropenia (GAYTAN et al., 2000; DIEKEMA et al., 2002; PEMÁN et al., 2002; COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; CHENG et al., 2005; GIRMENIA, C. et al., 2006; MEDRANO et al., 2006; NUCCI & COLOMBO, 2006).

Qualquer variável que provoque desequilíbrio ou quebra da barreira anatômica pode facilitar o desenvolvimento de infecções hospitalares.

Sob esse aspecto, vários estudos relatam a associação de infecções fúngicas com diversos tipos de procedimentos invasivos e terapias. A utilização de cateter venoso central, prótese contaminada, sonda vesical, dreno, traqueotomia, hemodiálise, imunossupressores e/ou procedimento cirúrgico pode favorecer a colonização e o desenvolvimento de infecções hematogênicas. Em adição, o uso de antibióticos de amplo espectro aumenta a pressão seletiva frente a microbiota normal e favorece também o crescimento de microrganismos oportunistas (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

Nas últimas décadas, o acesso vascular é considerado um dos importantes fatores de risco para o desenvolvimento de candidemias, que pode ser potencializado quando for usado para administração de nutrição parenteral. Corroborando com essa afirmativa, há relatos que leveduras como *C. parapsilosis* costumam proliferar-se nessas soluções e freqüentemente colonizar a pele do paciente (BLUMBERG et al., 2001; GIUSIANO et al., 2004).

Segundo Cheng et al., (2005), de 5% a 15 % dos pacientes já estão colonizados quando são internados; e de 50% a 90% dos pacientes com situação crítica colonizam-se durante longos períodos de internação ou permanência em UTIs e outras áreas críticas; destes 20% desenvolvem quadros de candidíase gravíssima.

1.5 Epidemiologia das infecções hospitalares por *Candida*

Estudos epidemiológicos têm revelado que leveduras do gênero *Candida* são responsáveis por cerca de 80% das infecções fúngicas no ambiente hospitalar e constitui causa relevante de infecções de corrente sanguínea, em função da habilidade de colonização, do oportunismo evidente e dos desafios terapêuticos (MESTRONI et al., 1996; SILVA, 1999; ELLIS et al., 2003; WHITE et al., 2003; HAJJEH et al., 2004; MOREIRA, 2005). Tais estudos, segundo Colombo et al., 2003, são indicadores de identificação de uma possível fonte de surto.

Dados de vigilância em hospitais terciários nos EUA revelam que espécies de *Candida* foram o quarto grupo de organismos mais comumente isolados, sendo a quarta causa mais comum de infecção de corrente sanguínea, respondendo por cerca de 8% dos casos de infecções documentados nesse sítio (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; MEDRANO et al., 2006).

Estudo feito por Colombo *et al.* (2003), aqui no Brasil no período de março de 2002 a fevereiro de 2003, avaliou um total de 7.038 episódios de bacteremias e fungemias, revelando que fungos do gênero *Candida* foram responsáveis por 4,3% do total das infecções de corrente sanguínea.

Estudos recentes feitos por Colombo et al. (2007) reforçam a importância da espécie de *Candida* como agente de candidemia hospitalar, sendo a espécie *C. albicans* a mais freqüente.

Aproximadamente 95% das infecções sanguíneas causadas por *Candida* são devidas a quatro espécies, divididas em dois grupos: *Candida albicans* e as consideradas não albicans: *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* (MASON, et al., 1987; PFALLER, 1996; SILVA et al., 2003).

No Brasil, Sugizaki et al., (1998) avaliaram a prevalência de espécies de *Candida* no hospital das Clínicas de Botucatu, São Paulo, e observaram que de 222 isolados, 42,2 % foram identificados como *Candida* não-*albicans*.

Sandven et al., (2000) estudaram a epidemiologia das infecções da corrente sanguínea por *Candida* comparando dados de diversos hospitais, observando tendência de queda na frequência de *C. albicans* e taxas elevadas na proporção de espécies não *albicans* em todo o mundo. Espécies não *albicans* respondem hoje por pelo menos 50% das infecções por *Candida* spp, e apresentam peculiaridades de história natural e sensibilidade a antifúngicos (SILVA & RODRIGUES, 2006).

Para avaliar a epidemiologia da candidemia, Colombo *et al.*, (2003) realizaram um estudo em seis hospitais de São Paulo e Rio de Janeiro e constataram que, dos 200 episódios de infecção, 63% foram causados por espécies não-*albicans*.

O aumento de espécies não *albicans* como agente de candidemia hospitalar também foi encontrado em estudos feitos por outros autores (BARBERINO et al., 2006; GIRMENIA et al., 2006).

Em se tratando de infecção na corrente sanguínea, *Candida glabrata* surge como a segunda espécie mais comum na maioria das séries de candidemias relatadas principalmente na Europa e nos EUA. Normalmente acometem pacientes idosos ou expostos a anfotericina B (SUGIZAKI et al., 1998; KLEMPP-SELB et al., 2000; PFALLER & DIEKEMA, 2002; COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; BARBERINO et al., 2006).

Desde os anos 80, *Candida parapsilosis* também vem ganhando importância como um patógeno hospitalar de fungemias, sendo responsável por 7% a 15% das infecções hospitalares ocorridas nos Estados Unidos e na Europa (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

Sua ocorrência é visivelmente maior em recém-nascidos prematuros internados em UTI neonatal, onde sua relevância como causa de candidemia varia de 17% a 50 % dos casos (SAIMAN et al., 1998).

C. parapsilosis frequentemente coloniza a pele e tem como característica particular a capacidade de proliferar-se em soluções de glicose e de formar biofilme, associando-se à utilização de cateter venoso em posição central (COLOMBO et al., 2003; KOJIC & DAROUICHE, 2004; MEDRANO et al., 2006).

Juntamente com *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* soma 62% dos isolados considerados mais importantes espécies dentre as não albicans, causadoras de candidemias (LUPETTI, et al., 2002; CLARK, et al. 2004; ALMIRANTE et al. 2005)

Candida tropicalis, por sua vez, é referida como agente oportunista quando o hospedeiro encontra-se neutropênico, ou quando há supressão da microbiota bacteriana pelo uso prolongado de antimicrobianos de largo espectro e conseqüente danos da mucosa gastrintestinal. Essa espécie também é relatada como o segundo agente etiológico mais comum de candidemia em pacientes com neoplasias, sendo sua freqüência maior em leucemias (AL-JASSER & ELKHIZZI, 2004; ALMIRANTE et al. 2005; NUCCI & COLOMBO, 2006). Em países da América Latina, particularmente no Brasil, essa espécie é bastante freqüente, mesmo entre pacientes não portadores de câncer (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

Para fins epidemiológicos, a identificação de leveduras com relação a espécie é etapa fundamental para a monitoração das taxas de infecções hospitalar, bem como para a identificação precoce dos surtos de infecção por *Candida* spp. (ALEXANDER, 2002; COLOMBO & GUIMARÃES, 2003). Outro aspecto relevante e que deve ser considerado em relação aos índices de infecções por espécies de *Candida* é o alto custo decorrente do

atendimento ao paciente, compreendendo diagnóstico, tempo de internação e tratamento (KOJIC & DAROUICHE, 2004).

Dessa maneira, o reconhecimento precoce das candidemias é cada vez mais necessário, uma vez que o paciente envolvido geralmente apresenta o sistema imunológico comprometido (PÉMAN et al., 2002).

Infelizmente, com muita frequência, pacientes com candidemia são diagnosticados apenas tardiamente, ocasião em que os resultados das medidas terapêuticas são insatisfatórios, não somente pelo avançado estado da infecção fúngica, mas também pela gravidade da doença de base dos pacientes. Sendo assim, pacientes com fatores de risco para candidemia que apresentam síndrome infecciosa com má resposta à terapêutica antibiótica devem sempre ser avaliados cuidadosamente pelo clínico, para que a infecção fúngica seja diagnosticada o mais precocemente possível (COLOMBO et al., 1999).

A rápida identificação do agente etiológico da infecção em questão pode facilitar a iniciação da terapia antifúngica que se mostra como fator muito importante na redução da alta taxa de mortalidade associada a fungemias (WHITE et al., 2003). Outro aspecto relevante e que deve ser considerado em relação aos índices de infecções por espécies de *Candida* é o alto custo decorrente do atendimento ao paciente, compreendendo diagnóstico, tempo de internação e tratamento (KOJIC & DAROUICHE, 2004).

1.6 Identificação das leveduras do gênero *Candida*

O papel do laboratório de microbiologia (micologia) é de suma importância para complementar o diagnóstico clínico. A informação de que o agente causal da infecção de corrente sanguínea é uma levedura e não uma bactéria muda totalmente o tratamento.

Procedimentos laboratoriais para identificação fúngica, embora simples, requerem pessoal técnico habilitado.

A identificação de leveduras pode ser feita por métodos clássicos como: pesquisa do tubo germinativo, microcultivo em ágar-fubá – tween 80, auxanograma e crescimento a temperatura de 42°C (LACAZ et al, 2002).

No diagnóstico de ICS a hemocultura automatizada é considerada padrão ouro para detectar o agente etiológico, pois a técnica de identificação convencional costuma ser mais demorada (até dez dias), exigindo tempo e profissional habilitado, mostrando-se positiva em menos de 50% dos pacientes com candidíase disseminada crônica (WHITE et al., 2003; MOREIRA, 2005).

Novas opções de identificação, como utilização de métodos moleculares, têm sido descritas para superar as limitações dos métodos de identificação tradicionais, os quais utilizam longos períodos de identificação, inaceitáveis para a iniciação da terapêutica utilizada nas infecções invasivas (WHITE et al., 2003).

Devido às limitações dos métodos clássicos para a detecção de infecções fúngicas sistêmicas e à alta taxa de mortalidade associada a essas infecções, torna-se essencial o desenvolvimento de métodos específicos, sensíveis, rápidos e seguros.

Recentemente, diferentes métodos com aplicação de biologia molecular têm sido citados para suprir essas necessidades. A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido uma das mais executadas porque constitui técnica que permite uma rápida identificação de fungos patogênicos causadores de micoses sistêmicas. Esse ensaio utiliza uma seqüência pequena (9 a 10 pares de bases) de *primers* aleatórios para amplificar seqüências alvo de DNA através da PCR. Essa técnica também possibilita mostrar que, em uma coleção de culturas pertencentes à mesma espécie, as leveduras podem não estar relacionadas geneticamente (LEHMANN et al., 1992; JORDAN, 1994; TENOVER et al., 1997; HUI et al., 2000; KANBE et al., 2002).

O produto da amplificação forma bandas as quais são visualizadas em géis de agarose ou policrilamida. Em especial, a Técnica de “RAPD” – “Random amplified polymorphic DNA” é utilizado para distinguir ou comparar isolados obtidos de diferentes pacientes ou fontes inanimadas, sugerindo que tais métodos podem ser úteis para analisar surtos hospitalares (RESENDE, et al., 2004).

Várias pesquisas de genotipagem comprovam que espécies de *Candida* isoladas do local de infecção são as mesmas do local de colonização; assim, métodos de genotipagem mostram a similaridade entre cepas colonizantes e infectantes, comprovando a provável origem endógena da maioria das infecções por tais patógenos (JIANPING et al., 1999; KLEMP-SELB et al., 2000; COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

Usados na identificação de infecções sistêmicas, esses métodos têm demonstrado ser procedimentos rápidos e sensíveis, capazes de identificar a infecção sistêmica com o mínimo de conteúdo genético disponível (KANBE et al., 2002; SELVARANGAN et al., 2003; COLOM et al. 2006).

Nesta pesquisa, RAPD foi o método de escolha para correlacionar geneticamente os isolados de *Candida* spp obtidos de pacientes hospitalizados por possuir diversas vantagens sobre os métodos convencionais: pequena quantidade de DNA necessária para executar tais ensaios, sua utilidade para distinguir isolados de diferentes pacientes e fontes comuns (ROILIDES et al., 2004). E é bem mais rápido quando comparado às análises dos métodos convencionais (COLOM et al., 2006).

Além disso, o uso dos testes de diagnóstico molecular, tais como RAPD-PCR e outros métodos baseados em PCR, oferecem uma expectativa de segurança e fidelidade no entendimento das epidemiologias a que referem as infecções causadas por espécies de *Candida*, incluindo a caracterização do modo de transmissão e o auxílio no controle das

infecções invasivas ocasionadas por leveduras (TENOVER et al., 1997; MANNARELLI & KURTZMAN, 1998; RESENDE et al., 2004).

Segundo Resende et al. (2004), tais métodos também podem ser aplicados para identificar diretamente espécies de *Candida* com grande poder de discriminação entre isolados.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Realizar análise epidemiológica e molecular de candidemia em pacientes internados no NHU da UFMS, 1998 – 2006.

2.1 Objetivos específicos:

- Estimar a frequência de ocorrência de Candidemia em pacientes internados no HU-UFMS no período de janeiro de 1998 a dezembro de 2006.
- Estudar os aspectos clínicos e epidemiológicos dos pacientes com candidemia.
- Verificar a existência de condições associadas ao desenvolvimento de infecção de corrente sanguínea por *Candida* spp.
- Realizar análise genotípica (DNA cromossomal por RAPD-PCR) das cepas de *Candida* spp isoladas para investigação de ocorrência de cepas endêmicas e/ou epidêmicas.
- Contribuir com a Comissão de Controle Infecção Hospitalar do HU-UFMS, por meio de divulgação dos resultados obtidos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

A pesquisa conduziu um estudo retrospectivo onde foram incluídos 96 casos de candidemia em pacientes internados no Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande – MS, no período de janeiro de 1998 a dezembro de 2006.

Foi realizada busca de casos de candidemia a partir da coleção de culturas do Laboratório de Micologia do NHU, onde as leveduras foram isoladas de hemoculturas positivas de pacientes com manifestações clínicas de infecção.

Dados demográficos, clínicos e epidemiológicos foram obtidos de prontuários médicos e digitados em formulário apropriado (Anexo – 1).

Apenas foram consideradas, para análise, os perfis genético de cepas que possuíam dados clínicos completos.

3.2 Cultura e identificação de leveduras isoladas

As hemoculturas foram coletadas de sangue periférico e as leveduras detectadas pelo sistema automatizado Bactec® System 9120 (BBL, Becton Dickinson, Sparks, USA). A partir de hemoculturas positivas, foram feitas coloração de Gram e repique em ágar Sabouraud dextrose e ágar BHI (brain infusion heart-OXOID) que, em seguida, foram incubadas a 37° C e temperatura ambiente por 24h – 48h.

As leveduras foram identificadas por meio de técnicas convencionais, conforme recomendações de Lacaz et al., (2002), incluindo: pesquisa do tubo germinativo, microcultivo em ágar fubá, auxanograma e crescimento a 42° C. As análises foram realizadas no Serviço de

Micologia da Seção de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (HU/UFMS), como parte da rotina laboratorial.

As cepas foram estocadas em ASD (agar Sabouraud dextrose - Oxoid) em temperatura ambiente e Skim Milk (Difco) a -20 C° .

3.3 Extração do DNA genômico

O procedimento de extração do DNA (ácido desoxiribonucleico) descrito a seguir foi feito de acordo com o protocolo utilizado por Matsumoto (2006), com pequenas modificações.

Antes da extração, as leveduras foram repicadas em placas em agar Sabouraud dextrose a 37° C por 24 a 48h. Posteriormente, as leveduras foram inoculadas em 5 mL de caldo YPD (extrato de levedura 1%, glicose 2%, peptona 2% [Difco]) e incubadas sob agitação por 18h a fim de se obter células em fase exponencial de crescimento.

Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 4.100 rpm por 7 minutos e processadas como descrito a seguir. Cerca de 3,5mL do sobrenadante foi desprezado e o restante transferido para microtubos (2,0mL) que posteriormente foram centrifugados por 5 minutos a 3.000 rpm em microcentrífuga a 4° C . O sedimento foi então lavado três vezes com 1mL de tampão SET (NaCl 0,1 M; EDTA 20mM; Tris 50mM, [pH 8,0]).

Depois da terceira lavagem com o tampão SET, o *pellet* foi dissolvido em 200 μL de lisozima (Sigma) e aquecido a 37°C por duas horas em banho seco de modo a promover a desintegração da parede celular da levedura.

A seguir, foram adicionados 5 μL de RNase (10mg/mL; Sigma) e incubado em banho seco a 37°C por 30 minutos para a remoção da maioria do RNA celular. Na seqüência, foram adicionados 50 μL do detergente aniônico SDS [Sodium dodecyl sulphate (10%; USB)]

de modo a completar a lise celular. Posteriormente foi adicionado 10 μ L de proteinase K (10mg/mL; Sigma), e procedeu-se a incubação em banho seco a 37°C para digerir as proteínas celulares.

Após uma hora de incubação, foram adicionados 150 μ L de acetato de sódio 3 M [Merk] e a mistura foi mantida por 15 minutos em gelo seco.

A extração fenólica foi feita adicionando 500 μ L de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico [Invitrogen] na proporção 25:24:1, homogeneizado por inversão (50 vezes) e centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos 4°C.

A fase aquosa foi transferida para novos microtubos (1,5mL) previamente identificados.

A extração etanólica foi feita adicionando-se 500 μ L de clorofórmio-álcool isoamílico [Sigma] na proporção 24:1, homogeneizado por inversão (50 vezes) e centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos 4°C.

Novamente o sobrenadante foi transferido para novos microtubos (1,5mL) previamente identificados, ao qual foram misturados 500 μ L de álcool isoamílico [Synth] invertendo-se 3 a 4 vezes e centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos, desprezando-se o sobrenadante.

Ao sedimento foi acrescido etanol [Merk] 70% gelado e os tubos foram centrifugados a 9.000 rpm por 10 minutos. A centrifugação para a separação do DNA precipitado foi feita a 4°C para assegurar a integridade e recuperação do DNA das soluções. Após desprezar o sobrenadante, o *pellet* foi deixado em repouso por 18h.

O precipitado de DNA foi ressuscitado com 50 μ L tampão TE 1X (Tris 0,01M, EDTA 1 mM; [pH 7,5]).

Para a quantificação da amostra de DNA, foram feitas diluições 1:10 e 1:100, seguida da leitura no espectrofotômetro Gene Quant (Amersham-Pharmacia). As amostras com

relação de absorvância de 1.8 a 2.1, lidas a 260nm/280nm foram armazenadas a -20°C até o uso (WAHYUNINGSIH, et al., 2000; BAUTISTA-MUNOZ, et al., 2003; MATSUMOTO, 2006).

3.4 Amplificação de DNA

A técnica utilizada foi a de RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic PCR).

O perfil do RAPD foi obtido com o *primer* OPG-17 (5' ACGACCGACA 3') [Invitrogen] e, como marcador de peso molecular, o DNA Ladder 100 bp (105ng/μL – [Jena Bioscience] – M214).

Para a realização do PCR foi preparado um mix de 25μL, contendo 2,5μL de tampão para PCR 10X com 0,2μL de MgCl (25 mM) [Promega]; 1,8μL de MgCl (25 mM) [Promega]; 2,0μL dNTP's 25 mM (desoxynucleotide triphosphate: dATP, dTTP, dCTP, dGTP) [Biotools]; 5,0μL de *primer* 50,43 nmole (Invitrogen); 1,25U de Taq polimerase (500U- 5U/μL (Promega) e o restante do volume de água destilada estéril. A essa mistura adicionou-se 1 μL de DNA.

A reação de polimerase em cadeia foi desenvolvida no Laboratório de biologia molecular da Embrapa Gado de Corte-MS, por meio de termociclador (MasterCycler personal microtubes) com a seguinte seqüência: Ciclo 01 - 2 minutos a 98° C (desnaturação inicial); Ciclo 02 - 35 ciclos de 2,5 minutos a 72°C (desnaturação), 1 minuto e meio a 92°C (anelamento), 1 minuto a 35°C (extensão); Ciclo 03 - a extensão foi complementada com cinco minutos a 72°C, permanecendo refrigerada a 4° C até o uso.

3.5 Eletroforese em gel de Agarose

O DNA foi separado por eletroforese em gel de agarose a 1,2% para análise da amplificação dos fragmentos. Do produto final do PCR, 20 µL de cada amostra foram aplicados nos orifícios feitos no gel de agarose (1,2%) mergulhado em TBE 1x (500 mM. de Tris-base, 60 mM de ácido bórico e 0,5 mM de EDTA, [pH 8,0]). Para a corrida foram utilizados os seguintes parâmetros: *start* de 5 minutos a 100V e 2:30 minutos a 80V.

Após a corrida, o gel foi imerso em 0,5 µL/mL de brometo de etídeo [Sigma] por 20 a 30 minutos e descorado em água destilada a 21-25° C por 30 minutos.

As bandas de DNA foram visualizadas por meio do equipamento de Sistema Polaroid, GEL DOC 1000 sob luz ultravioleta, fotografadas e gravadas em computador.

3.6 Análise dos Perfis de DNA cromossomal das leveduras

Os padrões obtidos por RAPD-PCR foram comparados segundo critérios e interpretação de Tenover et al. (1995 e 1997). O dendrograma foi realizado pelo Sistema Gel Compar II (Applied Maths, Belgium) no Laboratório de Enterobactérias da Fiocruz - RJ. A relação de similaridade foi determinada utilizando-se o coeficiente de Pearson.

Para fins de análise epidemiológica, foram consideradas similares ou pertencentes a um mesmo clone as cepas que apresentavam similaridade ≥ 90 %, ou com dendrograma mostrando uma única inserção ou inclusão (PUJOL et al., 2002, RESENDE et al., 2004).

3.7 Controle de qualidade

As cepas padrão incluídas como controle de qualidade foram: ATCC 10231 (*C. albicans*), ATCC 22019 (*C. parapsilosis*) e ATCC 760 (*C. tropicalis*).

3.8 Considerações éticas

Este trabalho foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da UFMS sob o registro de nº 465 (Anexo 2).

3.9 Conceitos e definições

De acordo com o Center for Disease Control and Prevention (CDC) *Infecção Hospitalar* (IH) é uma doença causada por microrganismo que não estava presente e nem em incubação à admissão hospitalar, e que se desenvolve durante a hospitalização. A manifestação clínica dessa doença pode ocorrer durante a hospitalização, o que é mais comum, ou após a alta (até um ano), principalmente quando foi adquirida próxima a esta (BOUSSO et al., 1995).

Candidemia/Fungemia corresponde a uma infecção hematogênica, caracterizado pela invasão local ou sistêmica de leveduras, determinando manifestações clínicas variadas.

Enquanto colonização é presença de microrganismos que podem estar presentes na mucosa de pacientes saudáveis sem causar infecção, como por exemplo, aqueles adquiridos após o nascimento, por meio da microbiota vaginal materna ou secundariamente por agentes existentes no berçário.

3.10 Critérios de relações entre cepas

Para a análise epidemiológica molecular foram feitas as seguintes considerações:

1- Na interpretação do gel de eletroforese e dendrograma, foram consideradas leveduras pertencentes a um mesmo clone (geneticamente relacionadas) aquelas que apresentaram

diferença de uma deleção ou uma inserção no perfil do DNA cromossomal e ou com similaridade $\geq 90\%$ no dendrograma (PUJOL et al., 2002; RESENDE et al., 2004).

2- As leveduras com esse mesmo perfil genético, provenientes de hemoculturas de pacientes que estavam internados em uma mesma unidade hospitalar em curto espaço de tempo (≤ 3 meses), foram considerados epidemiologicamente relacionados.

3- Surto foi considerado um aumento na incidência de candidemia em um local específico durante um dado período.

4. RESULTADOS

De janeiro de 1998 a dezembro de 2006, 96 casos de infecção de corrente sanguínea causada por *Candida* spp foram estudados.

Episódios de candidemia foram registrados em pacientes internados nos seguintes setores do hospital: CTI adulto (n= 29; 30,1%); UTI neonatal (n= 25; 26,0%); CM (n= 15; 15,6%); CTI pediátrico (n= 7; 7,3%); CP (n= 7; 7,3%); CC (n= 6; 6,3%); H (n=1; 1,0%); ONCO (n= 1; 1,0%); DIP (n= 1; 1,0%); UR (n= 2; 2,1%), e B (n=2; 2,1%). Os pacientes estiveram internados por um período que variou de 01 a 124 dias, com média de 30 dias.

Quanto ao sexo, 46 (48,2%) eram do sexo feminino e 50 (52,8%) eram do sexo masculino.

A idade dos pacientes variou de 3 dias a 85 anos, com média de 35,9 anos, sendo 53 (55,2%) adultos (\geq 13 anos) e 43 (44,8%) pediátricos ($<$ 13 anos). Na **Tabela 1** observa-se a distribuição de casos de candidemia de acordo com a faixa etária do paciente.

Entre os pacientes pediátricos, 25 eram recém-nascidos, dos quais 23 eram pré-termos, um recém-nascido de termo e um com idade gestacional (IG) indeterminada. Dos 23 pré-termos, 52,2% tinham IG menor que trinta semanas.

Dezessete neonatos (68%) tinham peso inferior a 1500g ao nascimento e menos de um mês de vida (média de 16,76 dias) na ocasião do diagnóstico de candidemia. Entre os pacientes que foram a óbito 68,4% (13/19) tinham idade gestacional menor que 32 semanas e 78,9% (13/19) pesavam menos que 1500g. Outros dados demográficos e clínicos dos recém-nascidos estão demonstrados na **Tabela 2**.

As principais comorbidades e doenças de base apresentadas pelos pacientes com candidemia encontram-se elencadas na **Tabela 3**.

Entre comorbidades citam-se: pneumonia bacteriana (43,8%), distúrbios gastrintestinal (atresia duodenal, Obstrução intestinal – Colostomia, Dça diverticular de cólon direito e transversal, estase gástrica), (33,4%) e infecções bacterianas do trato urinário (22,9%). Dos

pacientes pediátricos, cinco (11,6%) apresentavam má formação congênita e doze (27,9%), infecção perinatal. Infecções do trato urinário ocorreram com maior frequência em adultos (19; 35,8%) do que em crianças (3; 7,0%).

As doenças de base mais encontradas foram: diabetes mellitus, com 9 casos (17,0%) entre pacientes adultos e 1 caso (2,3%) pediátrico; tumor sólido (n= 8; 15,1% em adultos e n=1; 2,3% em crianças); seguido das enfermidades hematológicas (LLA, LMA, Síndrome de Hodgkin, Síndrome HELLP), que se mostraram com números iguais para adultos e pediátricos n= 6; 11,3% e 14,0%, respectivamente.

Todos os pacientes fizeram uso de algum tipo de procedimento invasivo, como uso de cateter em posição central (61; 63,5 %), sonda nasogástrica (53; 55,2 %), nutrição parenteral (50; 52,1 %), dreno (32; 33,3 %), hemodiálise (14; 14,6 %), sonda vesical (27; 28,1 %), ventilação mecânica (52; 54,2 %), entre outros (**Tabela 4**).

Outros fatores predisponentes para candidemia incluem permanência hospitalar por mais de 15 dias (n=66; 68,8%) e uso de cefalosporina de 3ª geração (n=55; 57,3%).

As condições de risco mais prevalentes entre os recém nascidos com infecção na corrente sanguínea foram: uso de cateter venoso central (25; 100,0%); ventilação mecânica (21; 84,0%); tempo de internação superior a 15 dias (20; 80%); uso de nutrição parenteral (20; 80,0%); sonda nasogástrica (21; 84,0%); cefalosporinas de 3ª geração (19; 76%); dreno (04; 16,08%) e procedimento cirúrgico (08; 32,0%) - onde a maioria eram cirurgias do aparelho digestivo. Em quatro pacientes, a mesma levedura foi isolada em cultura de ponta de cateter e na hemocultura.

As espécies isoladas nos episódios de candidemia foram: *Candida albicans* (44; 45,8 %), seguida de *Candida parapsilosis* (33; 34,4 %), *Candida tropicalis* (14; 14,6 %) e *Candida glabrata* (5; 5,2 %).

Candida albicans foi a espécie mais frequentemente isolada tanto em pacientes adultos como em pediátricos, seguida de *C. parapsilosis* (**Figura 1**).

Em neonatos, a frequência de ocorrência foi 44,0% para *Candida albicans* (11), 40,0% *C. parapsilosis* (10), 12,0% *C. tropicalis* (3) e 4,0% *C. glabrata* (1).

De quinze pacientes pediátricos com infecção de corrente sanguínea por *Candida parapsilosis*, sete (46,6%) fizeram uso de nutrição parenteral.

De todos os 96 casos de candidemia, 14 foram causados por *C. tropicalis*; dentre esses, 50,0% eram neutropênicos (< 5.000 leucócitos/ mm^3).

Em se tratando de *Candida glabrata*, o isolamento foi maior entre os pacientes adultos.

A frequência de isolamento entre as *Candida* não *albicans* (54,16 %) mostrou-se maior que as espécies de *C. albicans* (45,84%).

De uma maneira geral, a frequência de óbitos foi de 60,4% (58/96), sendo *C. albicans* representada por 56,8% e *C. parapsilosis* associada a 48,5% dos casos. Dentre os neonatos, 76% evoluíram para óbito.

Na **Tabela 5** está demonstrada a evolução dos pacientes com candidemia, de acordo com a faixa etária, nela observamos 80,9% dos óbitos ocorrerem em idosos, seguido de 80,0% em pacientes da faixa etária $>2 - 13$ anos e 70,0% dos óbitos ocorrerem em recém-nascidos.

O número médio de casos de candidemia , com hemocultura positiva (com dados clínicos completos) encontrado foi 10,6 casos/ano.

A **Figura 2** mostra que *C. albicans* foram as espécies mais isoladas nos anos de 2001, 2003 e 2006.

A amplificação do DNA genômico das leveduras isoladas por meio da técnica de RAPD-PCR gerou uma grande variedade de perfis genéticos entre as diferentes espécies e entre cepas de uma mesma espécie (Figuras 3A a 11B).

A **Figura 3A** ilustra o gel de eletroforese com 14 cepas de *C. tropicalis*. O dendrograma da **Figura 3B** demonstra 5 perfis distintos, com predomínio do perfil “A”, proveniente de 10 isolados de leveduras com similaridade genética superior a 90%. Os padrões referentes a L13 e L9 foram desconsiderados da análise genética por não possuírem dados clínicos suficientes.

Entre três isolados de *C. tropicalis* provenientes de neonatos ilustrados nas **Figuras 4A e 4B**, dois (L2 e L3) apresentaram 98,8% de similaridade genética, sendo considerados também similares ao perfil “A” observado na Figura 2B.

As **Figuras 5A e 5B** ilustram o perfil genético de cinco cepas de *Candida glabrata*, onde observa-se que duas cepas, representadas por (L3 e L4) pertencem a um mesmo clone, porém sem relação epidemiológica.

O perfil eletroforético das 33 cepas de *Candida parapsilosis* está demonstrado nas **Figuras 6A, 7A e 8A**. Nessas ilustrações, observa-se o predomínio de um perfil “A” aparentemente representado por 27 isolados; porém, ao analisarmos as **Figuras 6B, 7B e 8B**, constatamos que apenas 24 isolados correspondem ao perfil “A”.

Na **Figura 6B**, observa-se que de 4 casos ocorridos no ano 2002 com cepas geneticamente idênticas um era proveniente do setor de oncologia e três do setor CTI de adultos.

Observando a **Figura 7B**, nota-se três casos que ocorreram no ano 2000 (dois de pacientes internados no CTI de adultos e um isolado de paciente internado na Clínica Médica).

C. parapsilosis (n=9) provindos de pacientes da UTI neonatal apresentaram 4 padrões genéticos distintos (**Figura 8B**). Cinco cepas foram consideradas pertencentes a um mesmo clone (padrão “A”).

A **Figura 9A** ilustra o gel eletroforético do DNA de *C. albicans* isoladas de pacientes internados na UTI neonatal.

A **Figura 9B** mostra que 80% das *C. albicans* isoladas de neonatos no HU-UFMS tinham similaridade genética superior a 95%.

Na análise molecular da **Figura 10A**, observou-se 27 cepas de *C. albicans* com predomínio do perfil “A”, enquanto que no dendrograma representado pela **Figura 10B** foi possível analisar mais claramente que o perfil “A” realmente predomina com 23 cepas, isoladas em diferentes períodos.

A **Figura 11A** ilustra 10 cepas isoladas de diversos setores. Essa figura pode ser melhor interpretada analisando a **Figura 11B**, onde pode-se constatar dois perfis genéticos distintos ao longo dos nove anos de estudos.

Tabela 1. Pacientes com candidemia conforme a faixa etária. HU-UFMS.

Faixa Etária *	Pacientes (n)	Pacientes (%)
0 – 30 days	20	20,8
31 days – 2 years old	18	18,8
>2 – 12 years old	5	5,2
>12 – 25 years old	7	7,3
>25 – 40 years old	9	9,4
>40 – 60 years old	16	16,7
>60 years old	21	21,9
Total (%)	96	100,0

* Idade no momento da coleta para hemocultura

Tabela 2. Características demográficas, clínicas e evolução de 25 recém-nascidos com candidemia internados no HU-UFMS.

<i>Caso</i>	<i>Data</i>	<i>Espécie</i>	<i>Idade</i> (dias)	<i>Idade gestacional</i>	<i>Peso</i> (gramas)	<i>Sexo</i>	<i>Diagnóstico clínico</i>	<i>Evolução</i>
01	12/10/97	<i>C.parapsilosis</i>	5	31 semanas	1500	F	Ma formação congênita/ PMT	Alta
02	27/03/98	<i>C.parapsilosis</i>	42	Indeterminada	3090	M	Sepse	Óbito
03	08/08/98	<i>C.tropicalis</i>	6	32 semanas	2800	M	Doença trato gastrointestinal	Óbito
04	13/02/99	<i>C.parapsilosis</i>	50	28 semanas	1030	M	PMT /Sepse	Óbito
05	14/02/99	<i>C.albicans</i>	45	30 semanas	1150	M	PMT /Pneumonia	Óbito
06	07/03/00	<i>C.tropicalis</i>	41	30 semanas	1030	M	PMT /Sepse	Óbito
07	27/03/00	<i>C.albicans</i>	30	32 semanas	1850	M	Sepse	Alta
08	11/10/00	<i>C.parapsilosis</i>	35	26 semanas	785	F	PMT /Sepse	Óbito
09	23/10/00	<i>C.parapsilosis</i>	16	26 semanas	1050	M	PMT /Pneumonia./Sepse	Óbito
10	14/08/01	<i>C.tropicalis</i>	13	34 semanas	1385	M	Pneumonia/Sepse	Óbito
11	26/12/01	<i>C.albicans</i>	28	29 semanas	1280	M	PMT	Óbito
12	01/02/03	<i>C.albicans</i>	18	28 semanas	1108	M	PMT /Sepse	Alta
13	27/02/03	<i>C.glabrata</i>	66	31 semanas	1185	M	PMT /Sepse	Óbito
14	03/04/03	<i>C.parapsilosis</i>	13	36 semanas	1740	M	Sepse	Óbito
15	05/04/03	<i>C.albicans</i>	21	40 semanas	3360	F	Sepse	Alta
16	09/04/03	<i>C.parapsilosis</i>	12	36 semanas	3190	M	Sepse	Óbito
17	30/05/03	<i>C.albicans</i>	13	27 semanas	1035	F	PMT /Sepse	Óbito
18	25/08/04	<i>C.albicans</i>	19	27 semanas	1090	F	PMT /Sepse	Óbito
19	13/06/05	<i>C.parapsilosis</i>	10	28 semanas	875	F	PMT /Sepse	Óbito
20	06/01/06	<i>C.parapsilosis</i>	15	26 semanas	810	F	PMT /Sepse	Óbito
21	22/02/06	<i>C.albicans</i>	29	31 semanas	1355	F	PMT /Sepse	Óbito
22	03/03/06	<i>C.albicans</i>	28	32 semanas	1500	F	PMT /Sepse	Alta
23	04/05/06	<i>C.albicans</i>	28	27 semanas	1035	F	PMT /Sepse	Óbito
24	09/08/06	<i>C.parapsilosis</i>	16	30 semanas	1405	F	Incompatibilidade Rh	Alta
25	04/12/06	<i>C.albicans</i>	16	26 semanas	1410	M	PMT/Infecção neonatal	Óbito

F = sexo feminino; M = sexo masculino.

Tabela 3. Pacientes com candidemia conforme comorbidades e doenças de base. HU-UFMS.

Doenças de base e comorbidades	Pediátricos * (n=43) n (%)	Adultos ** (n=53) n (%)	Total (n=96) n (%)
Mal formação congênita	5 (11,6)	-	5 (5,2)
Pneumonia	17 (39,5)	25 (47,2)	42 (43,8)
Infecção perinatal	12 (27,9)	-	12 (12,5)
Distúrbios gastrintestinais	14 (32,6)	19 (35,8)	33 (33,4)
Infecção do trato urinário	3 (7,0)	19 (35,8)	22 (22,9)
Doença neurológicas	-	4 (7,5)	4 (4,2)
Infecção ouvido/olho	5 (11,6)	4 (7,5)	9 (9,4)
Doença cardíaca	3 (7,0)	10 (18,9)	13 (13,5)
Doença hematológica	6 (14,0)	6 (11,3)	12 (12,5)
Diabetes Mellitus	1 (2,3)	9 (17,0)	10 (10,4)
Neoplasias (tumor sólido)	1 (2,3)	8 (15,1)	9 (9,4)

Nota: cada paciente apresenta uma ou mais características,* Idade <13 anos de idade ** Idade ≥ 13 anos de idade

Tabela 4. Condições associadas para o desenvolvimento de candidemia. HU-UFMS

Características	Pediátricos* (n=43) n (%)	Adultos ** (n=53) n (%)	Total (n=96) n (%)
Hospitalização > 15 dias	33 (73,7)	33 (62,3)	66 (68,8)
Muito-baixo-peso ao nascer (< 1500g)	18 (41,9)	-	8 (18,9)
Prematuridade***	21 (48,8)	-	21 (21,8)
Hemodiálise	2 (4,7)	12 (22,6)	14 (14,6)
Uso de sonda nosogástrica	27 (62,8)	26 (49,1)	53 (55,2)
Uso de ventilação mecânica	26 (60,5)	26 (49,1)	52 (54,2)
Uso de sonda vesical	6 (14,0)	21 (39,6)	27 (28,1)
Uso de cateter central venoso	36 (83,7)	25 (47,2)	61 (63,5)
Uso de dreno	6 (14,0)	26 (49,1)	32 (33,3)
Uso de nutrição parenteral	29 (67,4)	21 (39,6)	50 (52,1)
Quimioterapia	6 (14,0)	2 (3,8)	8 (8,3)
Procedimento cirúrgico	19 (44,2)	35 (66,0)	54 (56,3)
Traqueotomia	6 (14,0)	13 (24,5)	19 (19,8)
Uso de cefalosporina de 3ª geração	30 (69,8)	25 (47,2)	55 (57,3)

Nota: cada paciente apresenta uma ou mais características,* Idade <13 anos de idade ** Idade ≥ 13 anos de idade *** (Idade gestacional ≤ 37 semanas)

Tabela 5. Pacientes com candidemia conforme a faixa etária e evolução. HU-UFMS.

Faixa Etária *	Pacientes n (%)	Óbitos n (%)
0 – 30 dias	20 (20,8)	14 (70,0)
31 dias – 2 anos	18 (18,8)	8 (42,1)
>2 – 13 anos	5 (5,2)	4 (80,0)
>13 – 25 anos	7 (7,3)	4 (57,1)
>25 – 40 anos	9 (9,4)	3 (33,3)
>40 – 60 anos	16 (16,7)	8 (50,0)
>60 anos	21 (21,9)	17 (80,9)
Total (%)	96 (100,0)	58 (60,4)

* Idade no momento da coleta para hemocultura

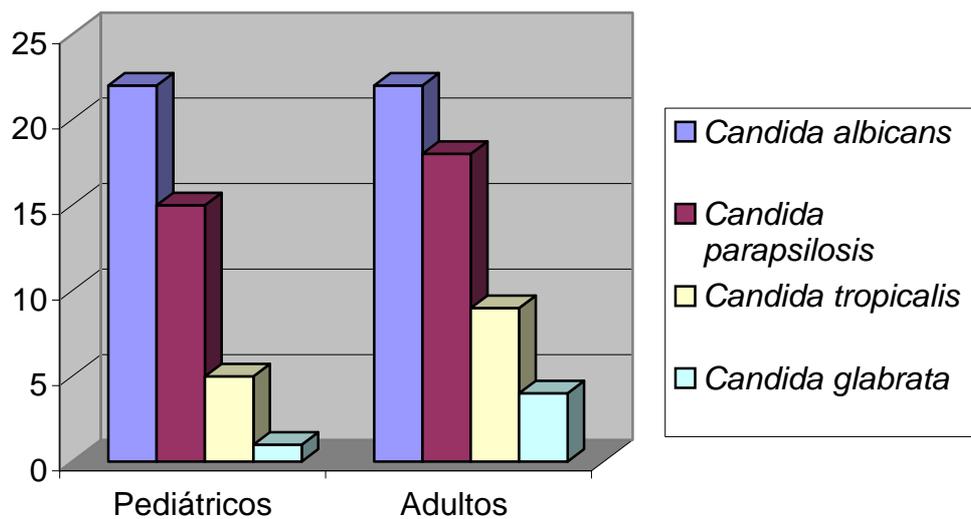


Figura 1. Distribuição por espécies de *Candida*, isoladas de hemocultura de pacientes adultos e pediátricos, internado no Hospital Universitário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) - Brasil, 1998 a 2006.

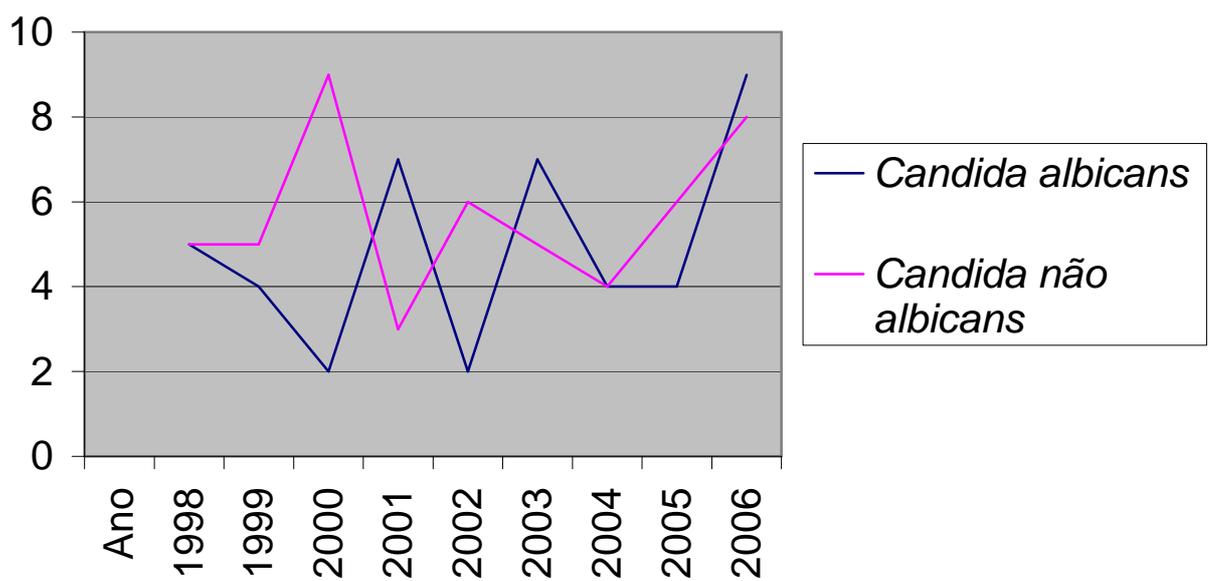


Figura 2. Distribuição das espécies de *Candida* segundo o ano de isolamento. Hospital Universitário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) - Brasil, 1998 a 2006.

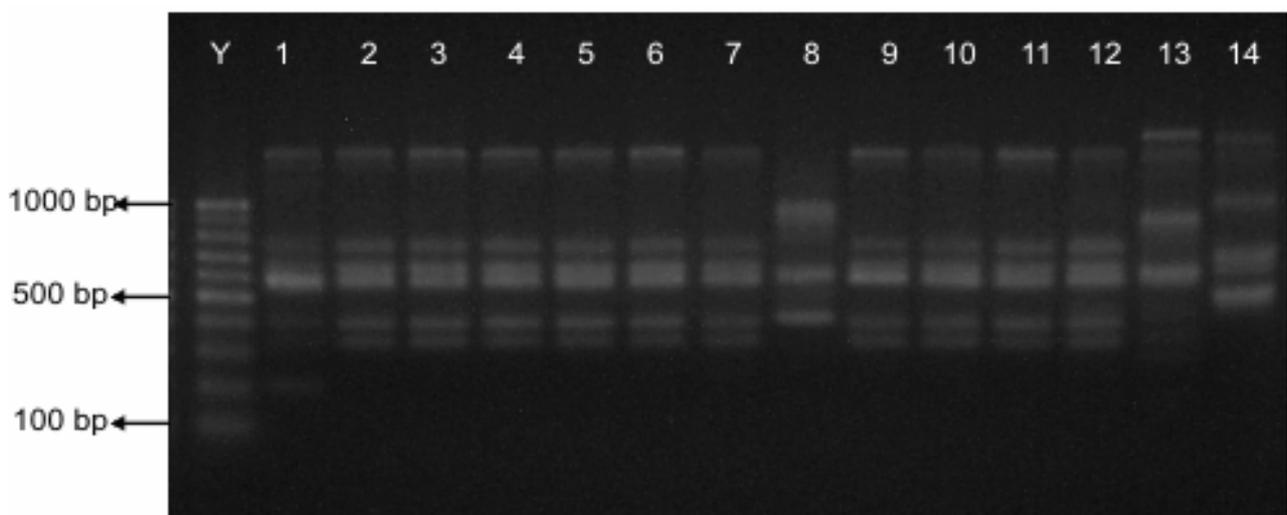


Figura 3A. Eletroforese em gel de agarose após RAPD-PCR ilustrando diferentes padrões genéticos de *Candida tropicalis*, agentes de infecção em corrente sanguínea, utilizando o *Primer* 5'd[ACGACCGACA]- 3'. Linhas: Y= marcador de peso molecular, L1-ATCC 760; L2-1023H1/00; L3-660H11/05 L4-840H2/02; L5-379H2/01; L6-79H11/00; L7-106H6/03; L8-173H3/00; L9-514H/99; L10-36H7/99; L11-401H9/03; L12-520H10/05; L13-171H4/02; L14-155H11/98.

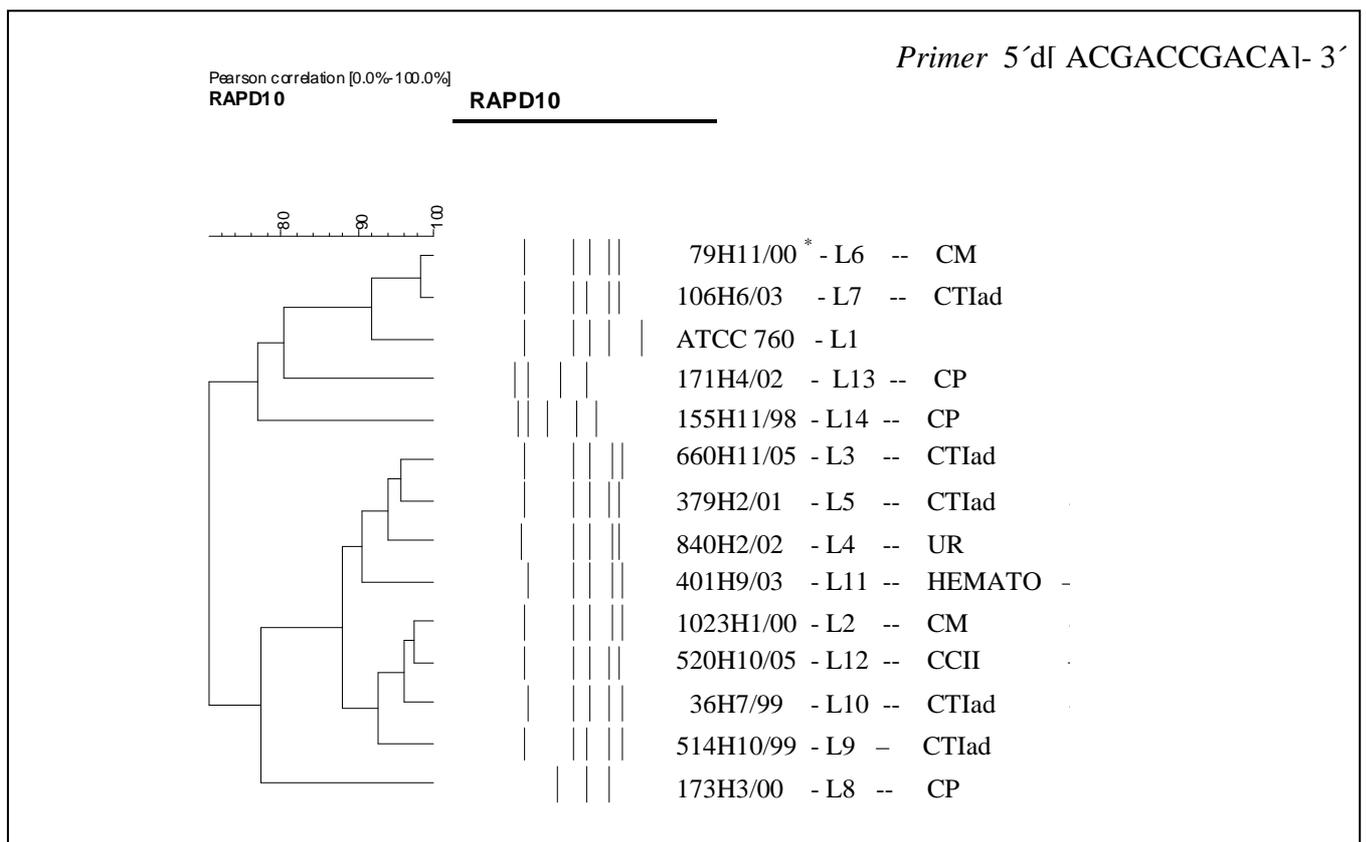


Figura 3B. Dendrograma ilustrando diferentes perfis de cepas de *Candida tropicalis* isoladas de hemoculturas de pacientes internados em diversos setores do HU-UFMS durante o período de Janeiro de 1998 a Dezembro de 2006. * NHm/a = N= n° de registro da cepa; H= hemocultura; m = mês de isolamento; a = ano de isolamento. L1-L14 = posição de corrida no gel de eletroforese; CM=clínica médica; CTIad=centro de terapia intensiva para adultos; CP=clínica pediátrica; UR=unidade renal; HEMATO=setor de hematologia; CCII=clínica cirúrgica II.

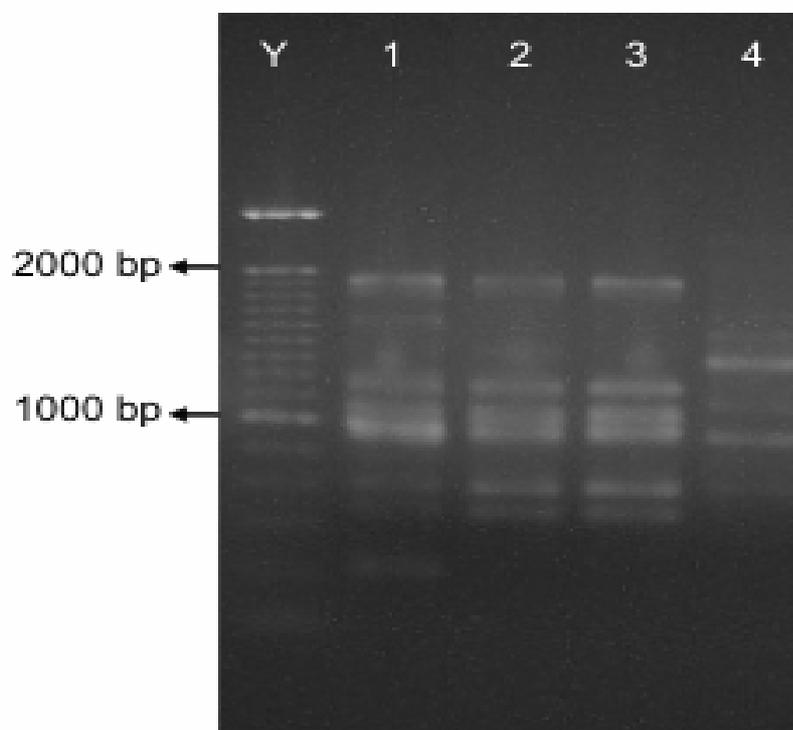


Figura 4A. Eletroforese em gel de agarose após RAPD-PCR ilustrando diferentes padrões genéticos de *Candida tropicalis*, agentes de infecção em corrente sanguínea de neonatos, utilizando o *Primer* 5´d[ACGACCGACA]- 3´. Linhas: Y= marcador de peso molecular, L1-ATCC 760; L2-62H8/98; L3-1222H3/00; L4-226H8/01

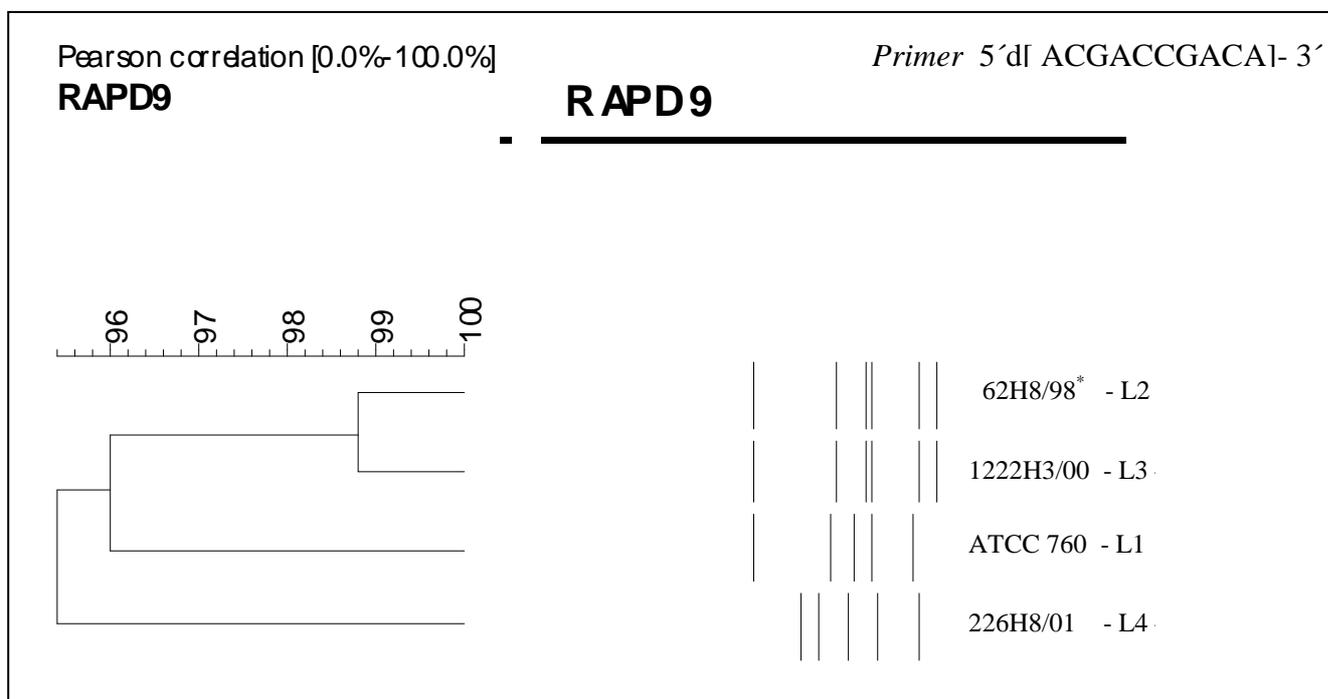


Figura 4B. Dendrograma ilustrando diferentes perfis de cepas de *Candida tropicalis* isoladas de hemocultura de pacientes internados na UTI neonatal do HU-UFMS durante o período de Janeiro de 1998 a Dezembro de 2006. * NHm/a = N= n° de registro da cepa; H= hemocultura; m = mês de isolamento; a = ano de isolamento. L1-L4 = posição de corrida no gel de eletroforese;

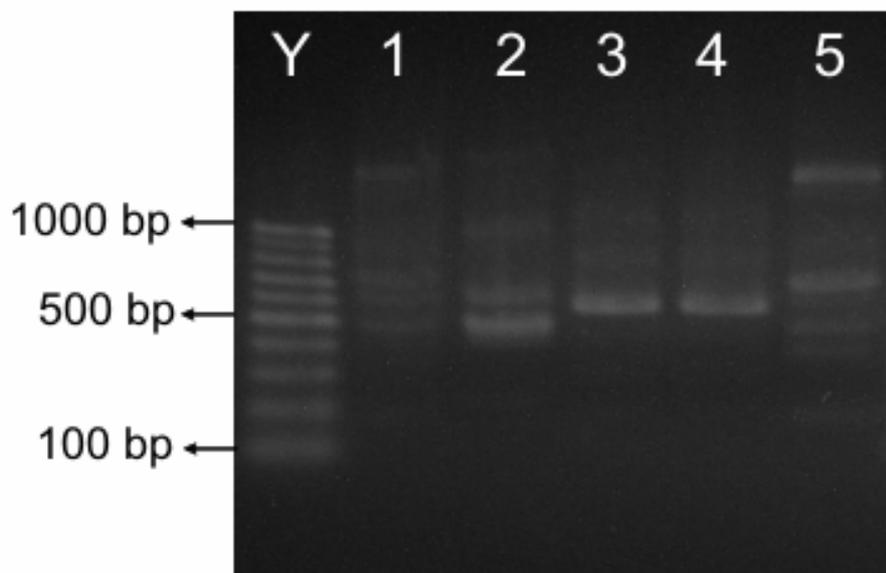


Figura 5A. Eletroforese em gel de agarose após RAPD-PCR ilustrando diferentes padrões genéticos de *Candida glabrata*, agentes de infecção em corrente sanguínea, utilizando o *Primer* 5´d[ACGACCGACA]- 3´. Linhas: Y= marcador de peso molecular, L1-560H7/06; L2-500H2/03 (UTIneo); L3-196H5/98; L4-428H6/06; L5-64H10/02.

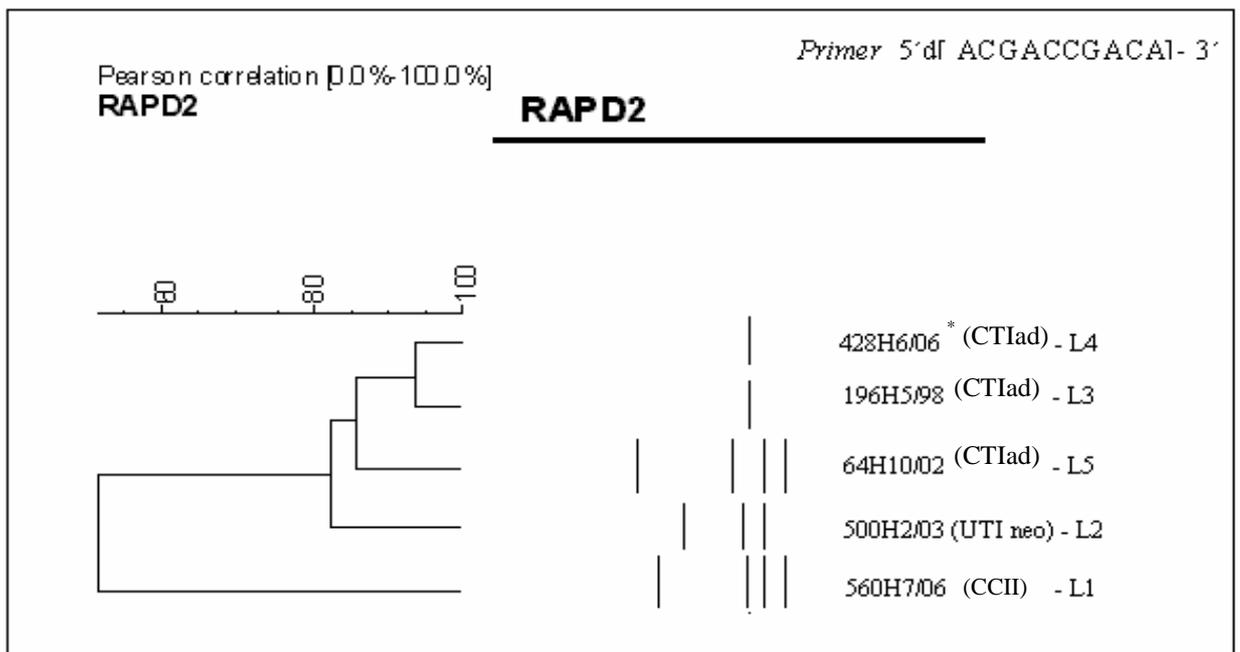


Figura 5B. Dendrograma ilustrando diferentes perfis de cepas de *Candida glabrata* isoladas de hemocultura de pacientes internados em diversos setores do HU-UFMS durante o período de Janeiro de 1998 a Dezembro de 2006. * NHm/a = N= n° de registro da cepa; H= hemocultura; m = mês de isolamento; a = ano de isolamento. L1-L5 = posição de corrida no gel de eletroforese; CTIad=centro de terapia intensiva para adultos; CCII=clínica cirúrgica II; UTIneo=unidade de terapia intensiva neonatal.

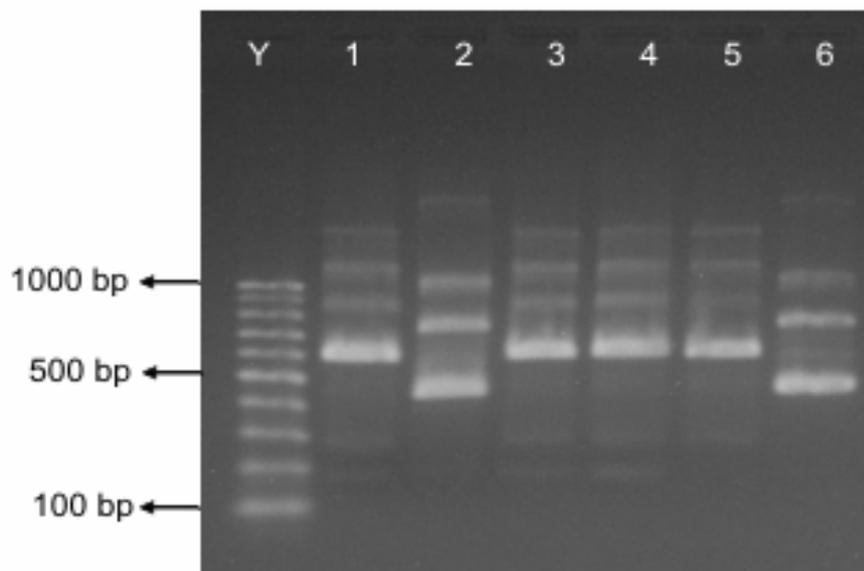


Figura 6A. Eletroforese em gel de agarose após RAPD-PCR ilustrando diferentes padrões genéticos de *Candida parapsilosis*, agentes de infecção em corrente sanguínea, utilizando o *Primer* 5´d[ACGACCGACA]- 3´. Linhas: Y= marcador de peso molecular, L1-ATCC 22019; L2-229H4/02; L3-891H2/02; L4-874H2/02; L5-851H2/02; L6-288H12/06.

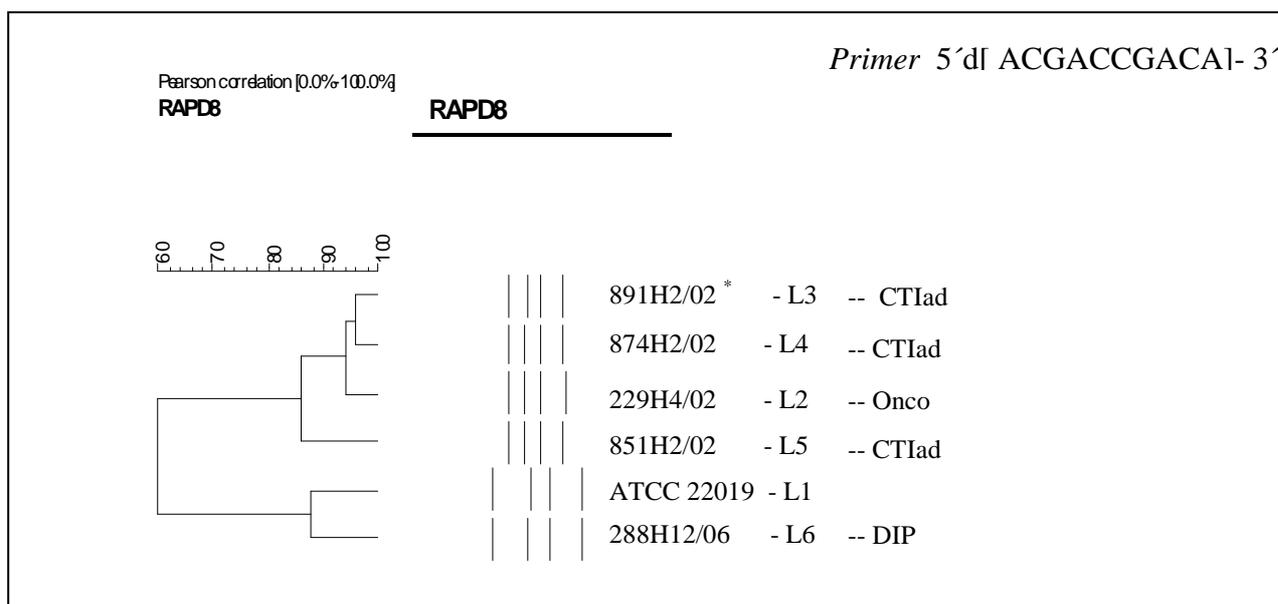


Figura 6B. Dendrograma ilustrando diferentes perfis de cepas de *Candida parapsilosis* isoladas de hemocultura de pacientes internados em diversos setores do HU-UFMS durante o período de Janeiro de 1998 a Dezembro de 2006. * NHm/a = N= n° de registro da cepa; H= hemocultura; m = mês de isolamento; a = ano de isolamento. L1-L6 = posição de corrida no gel de eletroforese; CTIad=centro de terapia intensiva para adultos; ONCO=csetor de concologia; DIP=enfermaria de doenças infecto parasitária.

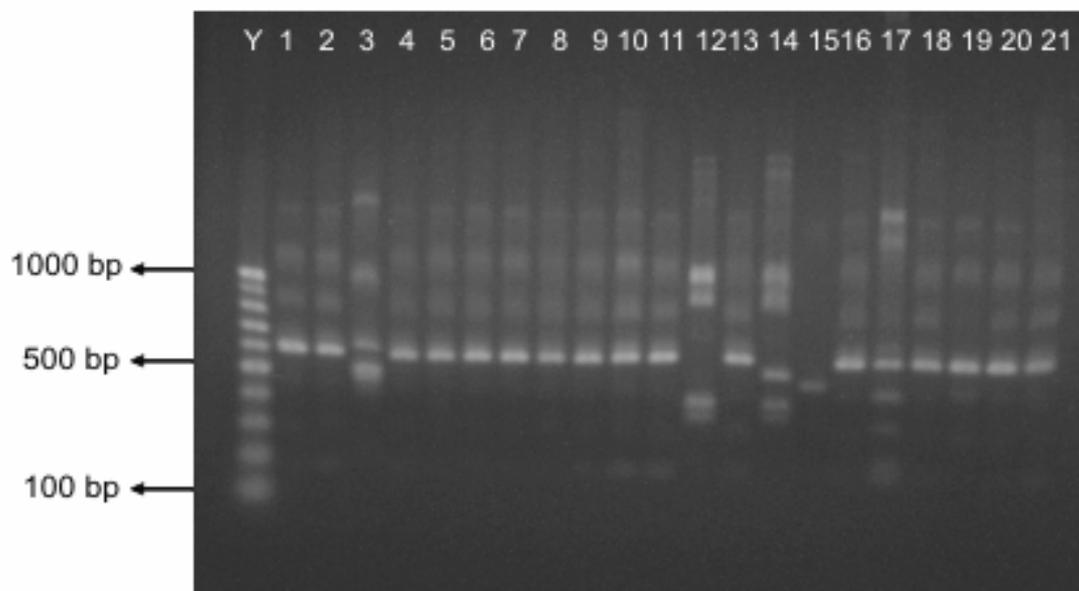


Figura 7A. Eletroforese em gel de agarose após RAPD-PCR ilustrando diferentes padrões genéticos de *Candida parapsilosis*, agentes de infecção em corrente sanguínea, utilizando o *Primer* 5´d[ACGACCGACA]- 3´. Linhas: Y= marcador de peso molecular, L1-ATCC 22019; L2-698H3/99; L3-66H8/99; L4-262H12/00; L5-639H8/00; L6-62H10/06; L7-887H9/06; L8-126H10/02; L9-60H1/04; L10-1000H1/04; L11-790H6/04; L12-194H2/04; L13-614H11/05; L14-667H/04; L15-863H4/05; L16-989H5/05; L17-910H2/06; L18-25H3/00; L19-154H1/99; L20-530H11/01; L21-988H10/00.

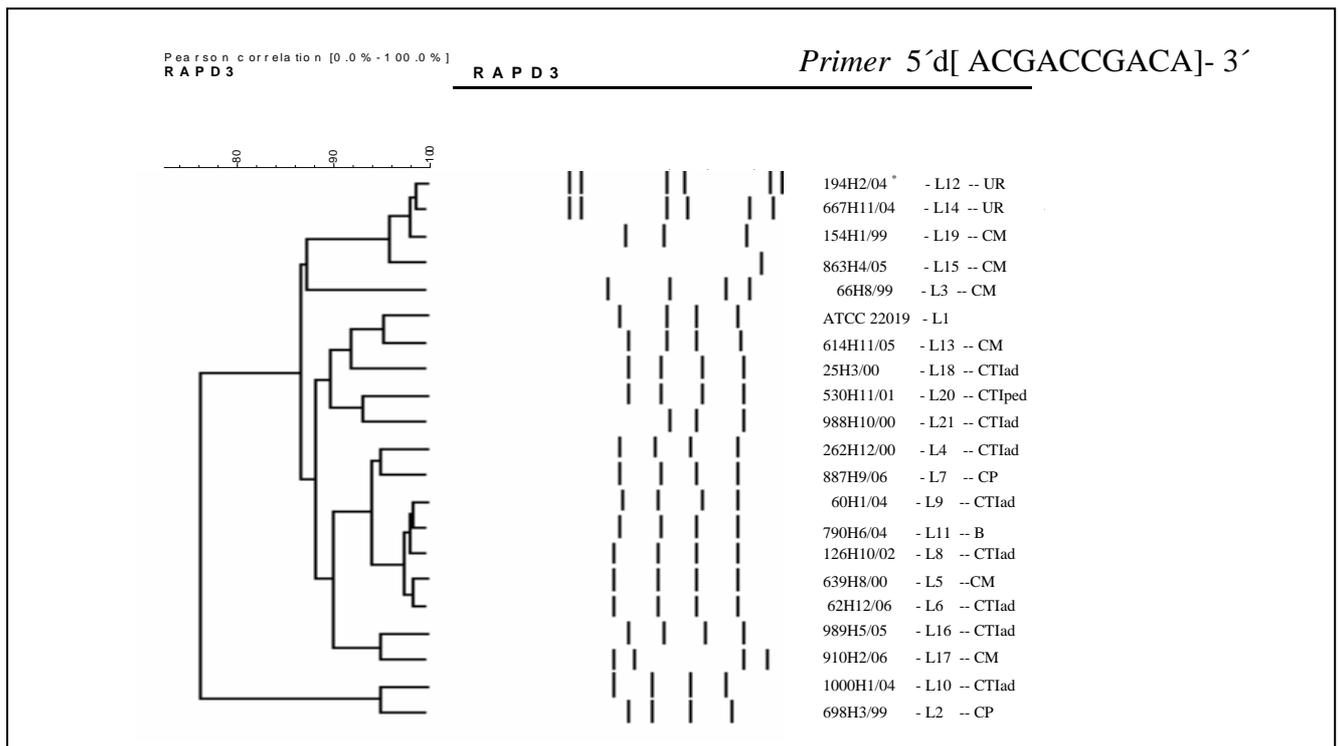


Figura 7B. Dendrograma ilustrando diferentes perfis de cepas de *Candida parapsilosis* isoladas de hemoculturas de pacientes internados em diversos setores do HU-UFMS durante o período de Janeiro de 1998 a Dezembro de 2006. * NHm/a = N= n° de registro da cepa; H= hemocultura; m = mês de isolamento; a = ano de isolamento. L1-L21 = posição de corrida no gel de eletroforese; CM=clínica médica; CTIad=centro de terapia intensiva para adultos; CP=clínica pediátrica; UR=unidade renal; CTIped= centro de terapia intensiva pediátrico; B=berçário.

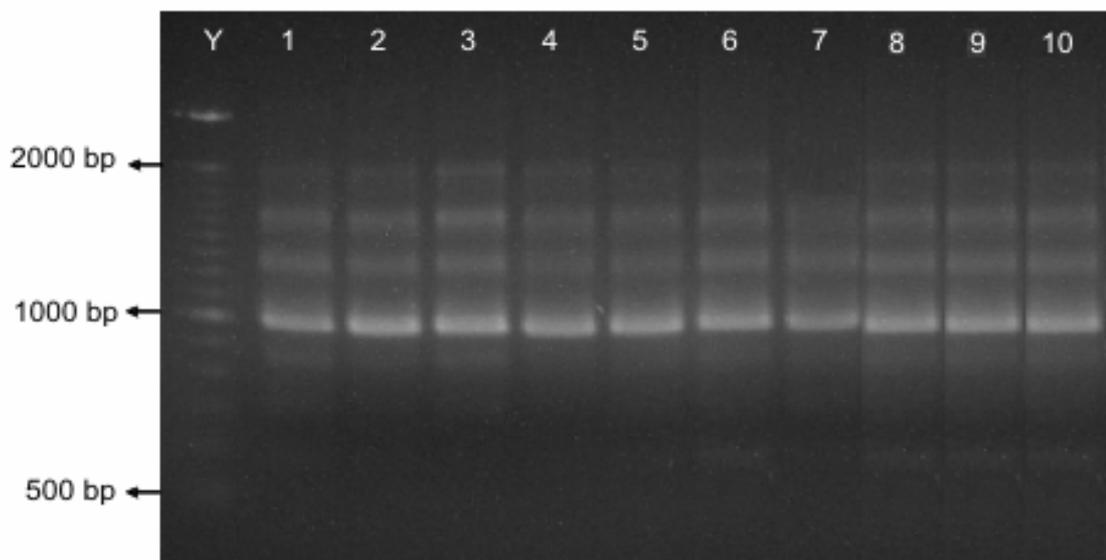


Figura 8A. Eletroforese em gel de agarose após RAPD-PCR ilustrando diferentes padrões genéticos de *Candida parapsilosis*, agentes de infecção em corrente sanguínea de neonatos, utilizando o *Primer* 5´d[ACGACCGACA]- 3´. Linhas: Y= marcador de peso molecular, L1- ATCC 22019; L2 -005H10/00; L3- 990H10/00; L4-709H8/06; L5-264H1/98; L6- 434 H2/99; L7- 120H6/05; L8 – 118H3/98; L9- 703H4/03; L10- 736H4/03.

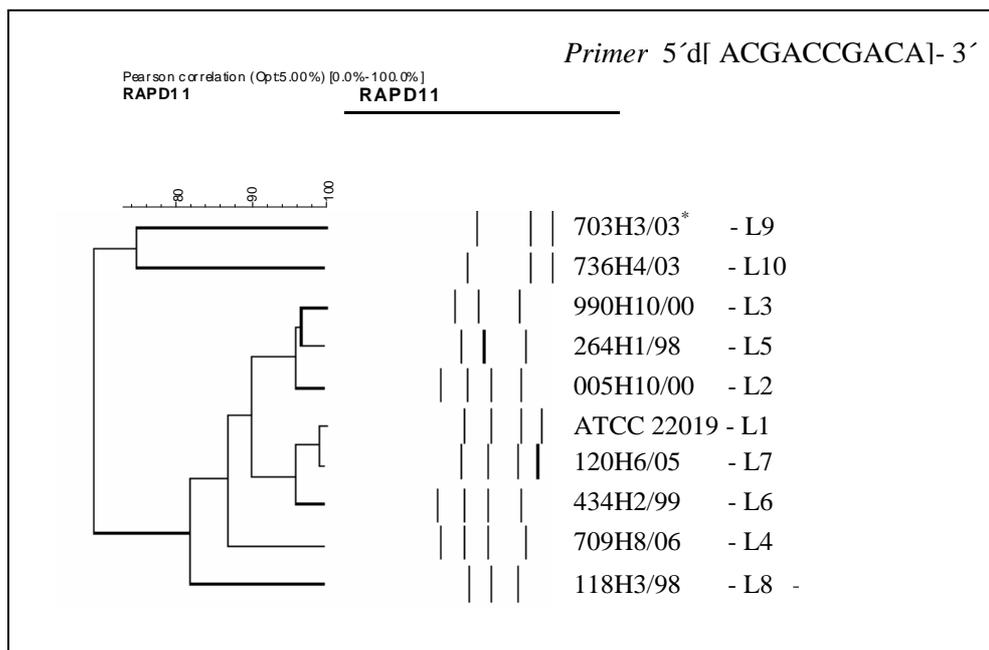


Figura 8B. Dendrograma ilustrando diferentes perfis de cepas de *Candida parapsilosis* isoladas de hemoculturas de pacientes internados em UTI neonatal do HU-UFMS durante o período de Janeiro de 1998 a Dezembro de 2006. * NHm/a = N= nº de registro da cepa; H= hemocultura; m = mês de isolamento; a = ano de isolamento. L1-L10 = posição de corrida no gel de eletroforese;

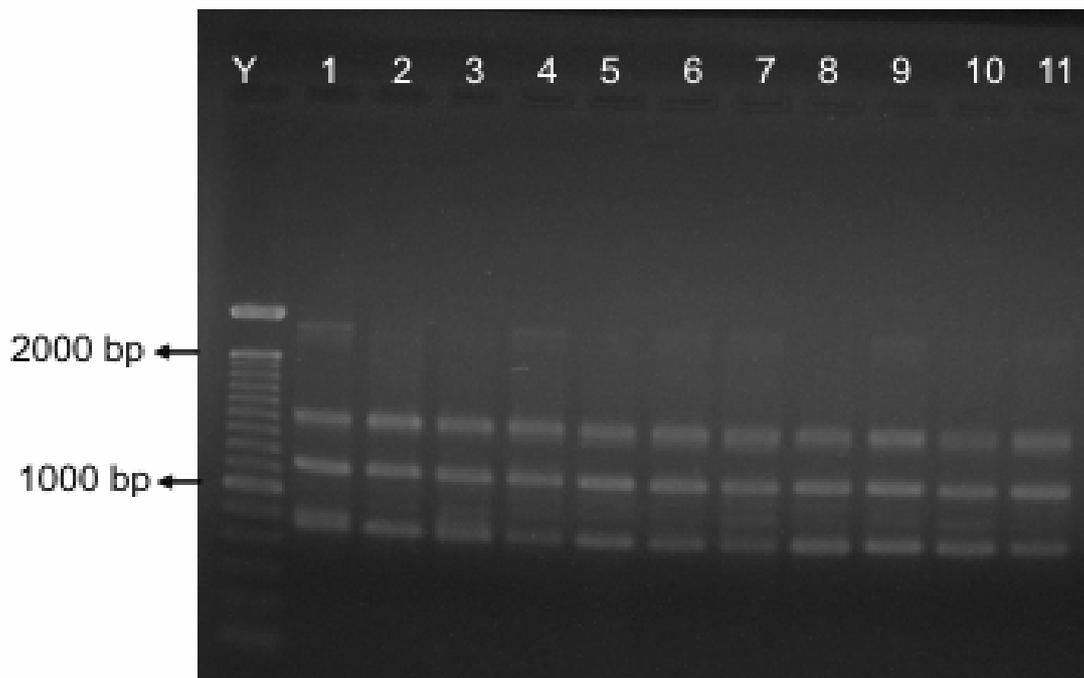


Figura 9A. Eletroforese em gel de agarose após RAPD-PCR ilustrando diferentes padrões genéticos de *Candida albicans*, agentes de infecção em corrente sanguínea de neonatos, utilizando o *Primer* 5'd[ACGACCGACA]- 3'. Linhas: Y= marcador de peso molecular, L1-253H12/06; L2-530H2/99; L3-713H/01; L4-007H/03; L5-486H2/03; L6-727H4/03; L7-82H8/04; L8-003H/06; L9-982H3/06; L10-340H5/06; L11-175H4/00.

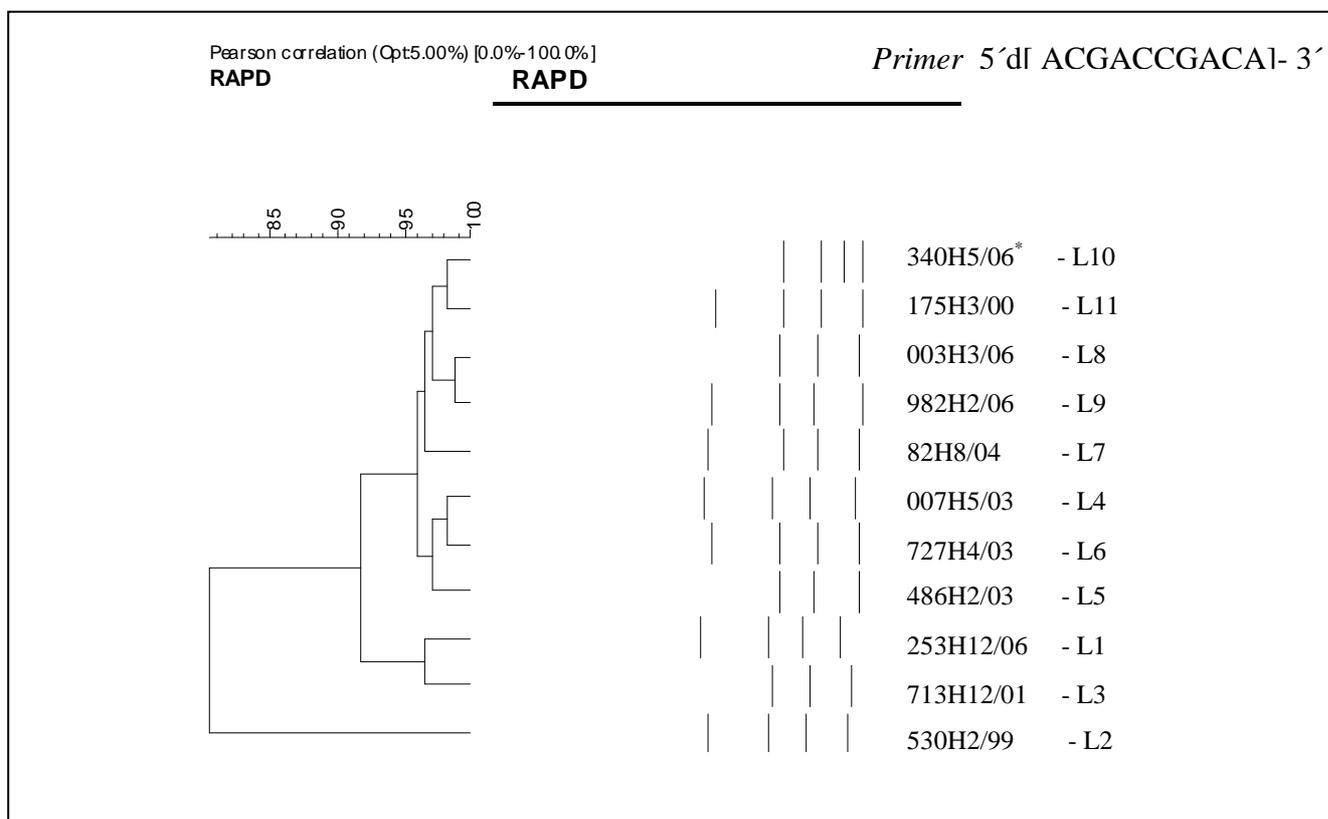


Figura 9B. Dendrograma ilustrando diferentes perfis de cepas de *Candida albicans* isoladas de hemoculturas de pacientes internados na UTI neonatal do HU-UFMS durante o período de Janeiro de 1998 a Dezembro de 2006. * NHm/a = N= n° de registro da cepa; H= hemocultura; m = mês de isolamento; a = ano de isolamento. L1-L11 = posição de corrida no gel de eletroforese.

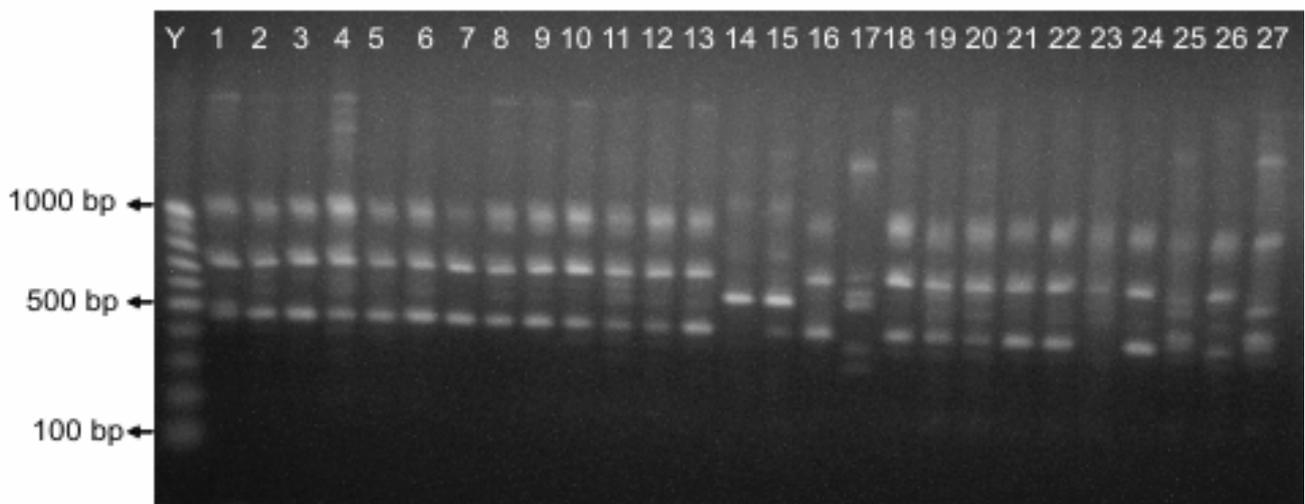


Figura 10A. Eletroforese em gel de agarose após RAPD-PCR ilustrando diferentes padrões genéticos de *Candida albicans*, agentes de infecção em corrente sanguínea, utilizando o *Primer* 5´d[ACGACCGACA]- 3´. Linhas: Y= marcador de peso molecular L1-ATCC 10231; L2-133H3/98; L3-10H10/00; L4-78H7/01; L5-422H8/05; L6-591H11/01; L7-716H4/01; L8-852H2/02; L9-735H10/03; L10-85H8/04; L11-817H6/04; L12-714H12/05; L13-788H4/05; L14-559H06/02; L15-44H10/98; L16-34H6/01; L17-56H5/99; L18-832H5/03; L19-992H5/03; L20-284H3/04; L21-509H2/05; L22-314H5/06; L23-814H1/06; L24-245H8/01; L25-68H5/99; L26-808H8/06; L27-521H2/98.

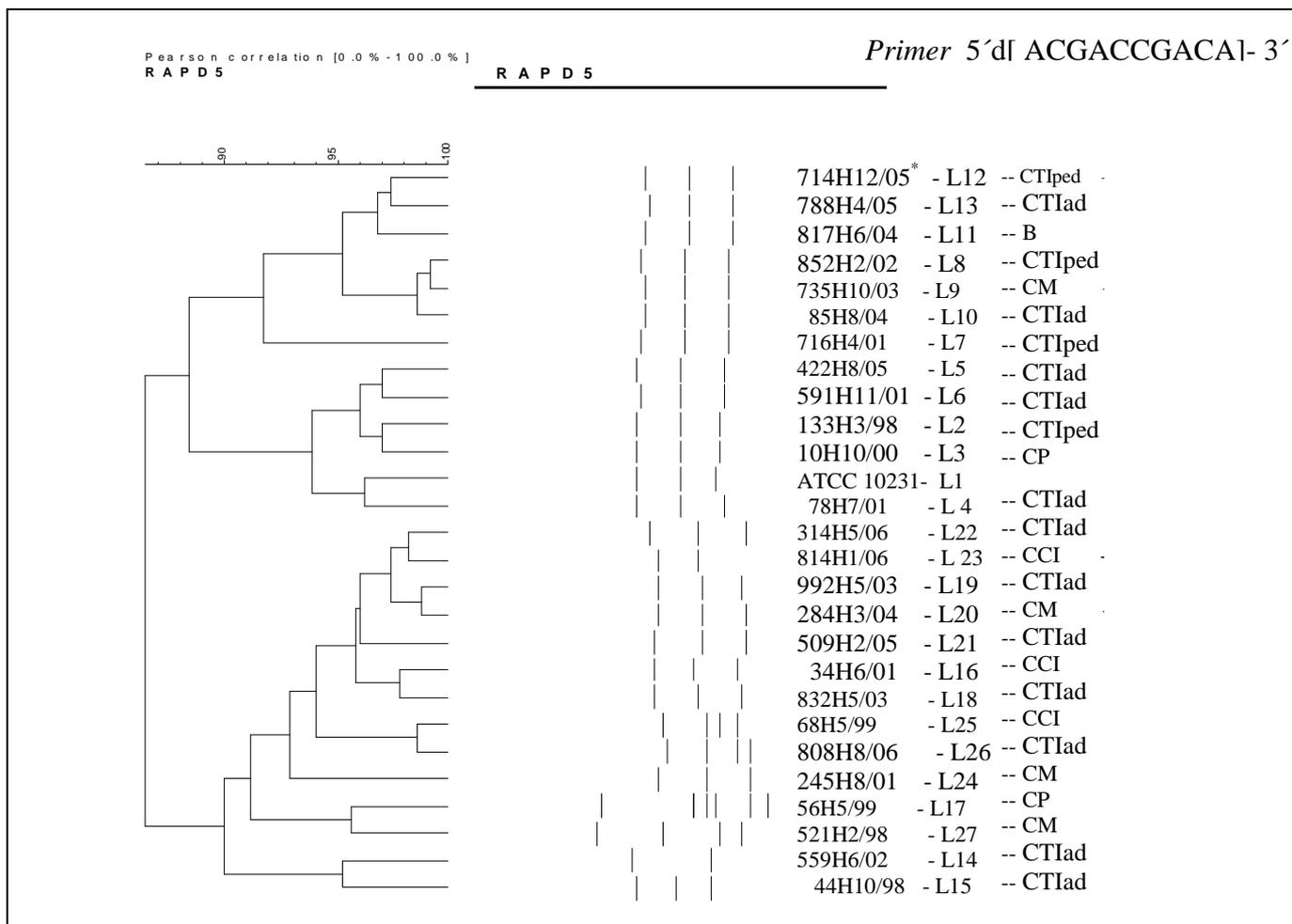


Figura 10B. Dendrograma ilustrando diferentes perfis de cepas de *Candida albicans* isoladas de hemoculturas de pacientes internados em diversos setores do HU-UFMS durante o período de Janeiro de 1998 a Dezembro de 2006. * NHm/a = N= n° de registro da cepa; H= hemocultura; m = mês de isolamento; a = ano de isolamento. L1-L27 = posição de corrida no gel de eletroforese; CTIad=centro de terapia intensiva para adultos; CTIped=centro de terapia intensiva pediátrico; CM=clínica médica; CP=clínica pediátrica; CCI=clínica cirúrgica I; B=berçário.

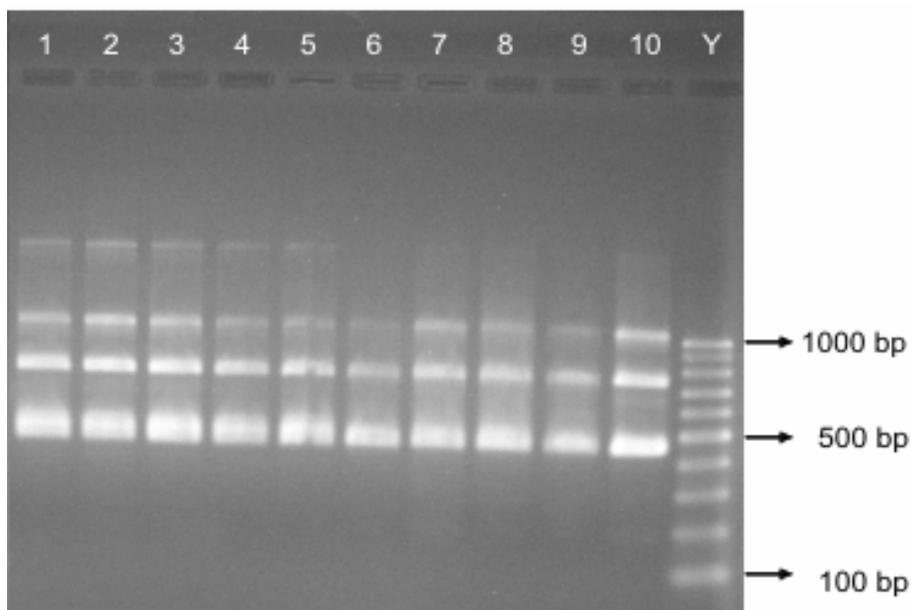


Figura 11A. Eletroforese em gel de agarose após RAPD-PCR ilustrando diferentes padrões genéticos de *Candida albicans*, agentes de infecção em corrente sanguínea, utilizando o *Primer* 5´d[ACGACCGACA]- 3´. Linhas: Y= marcador de peso molecular; L1- ATCC 10231; L2-227H8/01; L3-69H12/98; L4-814H1/06; L5-147H01/98; L6- 332H9/01; L7-253H4/06; L8-66H11/99; L9-304H8/03; L10-972H10/06.

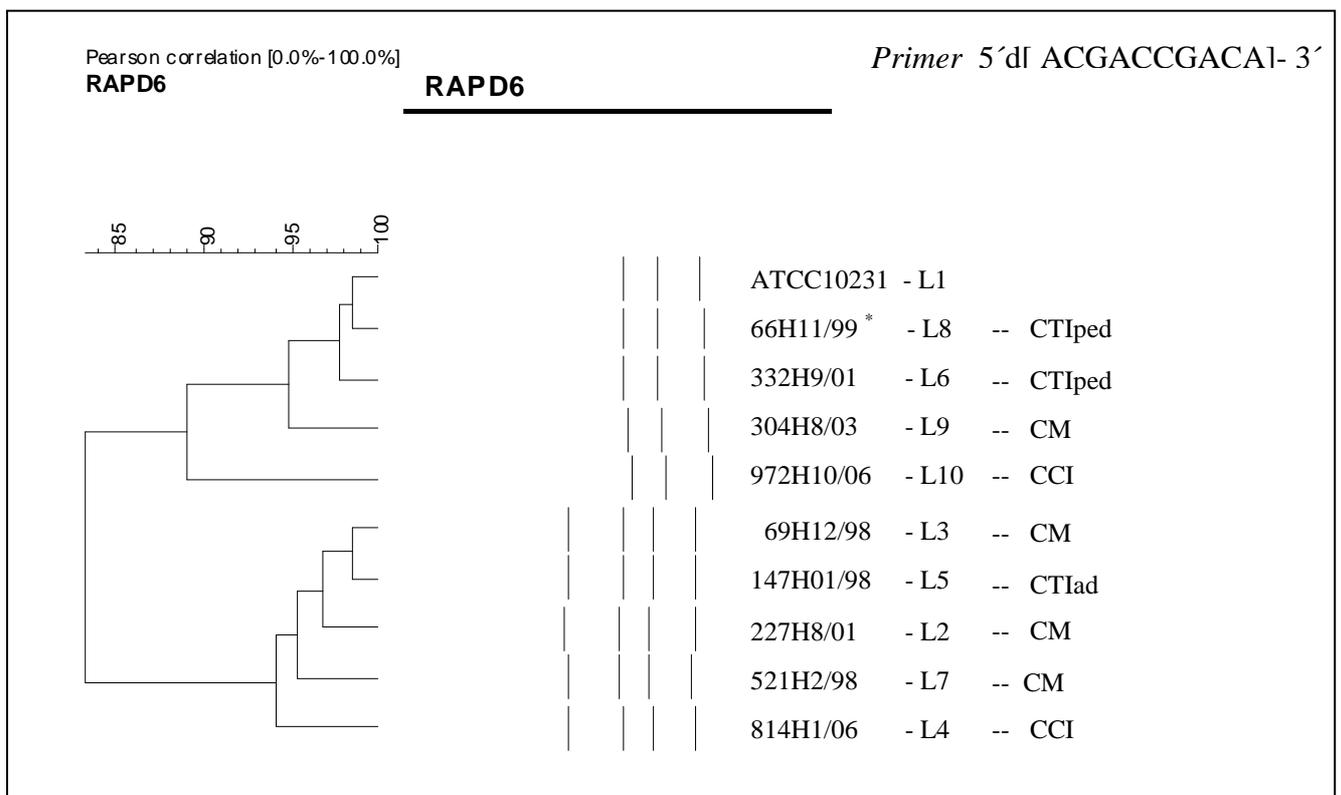


Figura 11B. Dendrograma ilustrando diferentes perfis de cepas de *Candida albicans* isoladas de hemoculturas de pacientes internados em diversos setores do HU-UFMS durante o período de Janeiro de 1998 a Dezembro de 2006. * NHm/a = N= n° de registro da cepa; H= hemocultura; m = mês de isolamento; a = ano de isolamento. L1-L10 = posição de corrida no gel de eletroforese; CM=clínica médica; CTIad=centro de terapia intensiva para adultos; CTIped=centro de terapia intensiva pediátrica; CCI=clínica cirúrgica I.

5. DISCUSSÃO

O maior número de casos de candidemia registrados no período de estudo foi em unidades de terapia intensiva, corroborando com dados da literatura que descrevem que a incidência de candidemia é cerca de 2 a 5 vezes mais alta nesses setores de internação (PÉMAN et al., 2002; ELLIS et al., 2003). Esse fato pode estar relacionado com a gravidade dos pacientes ali internados e com maior utilização de procedimentos médicos invasivos necessários para o tratamento desses pacientes.

Além disso, o prolongado período de internação, com média geral de 30 dias, também pode ter contribuído para a colonização dos pacientes por espécies do gênero *Candida*, patógeno de caráter classicamente oportunista.

Entre todos os pacientes estudados, 69% (n=66) estiveram internados por um período superior a 15 dias (**Tabela 3**), que pode ter favorecido o desenvolvimento de IH por *Candida*, assim, como também relatado por outros autores (COLOMBO et al., 2007; BARBERINO et al., 2006).

Estudo realizado por Bousso et al, (1995), descreve que as ICS causadas pelo gênero *Candida* aumentam de 12% a 20% quando o tempo de internação passa de 10 a 50 dias. Por outro lado, Villari et al., (1998), questionam se o prolongado período de internação predispõe a aquisição de IH, ou se a ocorrência de IH é devido ao prolongado período de internação.

No que diz respeito ao sexo, não foi observado diferença significativa entre os casos de candidemia. Outros estudos relatam uma prevalência maior entre pacientes do sexo masculino; entretanto, não existe uma explicação que justifique essa diferença entre eles (GAYTAN, 2000; RENNERT et al., 2000; DIEKEMA et al., 2002; PÉMAN, et al., 2002).

Conforme demonstrado na **Tabela 1**, os casos de candidemia foram mais frequentes em pacientes com idade inferior a 30 dias e superior a 60 anos, faixas etária essas onde deficiência fisiológica e sistema imunológico comprometido dos pacientes pode favorecer o

desenvolvimento dessa infecção (RIBEIRO et al., 2003; RIBEIRO et al., 2004; CHENG et al. 2005; FRIDIKIN et al., 2006).

No período neonatal, as ICS têm-se mostrado um grande e crescente problema na prática clínica, devido ao elevado risco dessa população com sistema imune imaturo e à alta letalidade atribuída nessa faixa etária. Por isso, a prevenção e a conduta assertiva nos casos de candidemia neonatal representam um grande desafio para os profissionais que trabalham com prematuros.

A frequência de distúrbios gastrintestinais observados no presente estudo foi maior que a descrita por outros autores (MEDRANO et al., 2006; ODDS et al., 2007). Sob este aspecto, vale lembrar, que lesões na mucosa gastrintestinal pode favorecer a translocação de *Candida* até os capilares mesentéricos, chegando a corrente sanguínea.

Infecções no trato urinário foram mais observadas entre pacientes adultos, sugerindo mais uso de sonda vesical. Este dispositivo é considerado condição de risco dessas infecções, especificamente em pacientes internados nos centros de terapias intensivas (BOUSSO et al., 1995; KAUFFAMAN et al., 2000).

De acordo com Colombo et al. (1999), o gênero *Candida* tem uma pequena parcela de contribuição no desenvolvimento de doenças respiratórias nosocomiais, especialmente pneumonia, e a redução do risco dessas infecções depende da rígida adesão do “staff” às normas gerais de controle. Muito dos pacientes estudado apresenta infecções no trato respiratório inferior (TRI), condição essa que leva o paciente crítico de CTI, necessitar procedimentos invasivos como a traqueotomia e a ventilação mecânica, que podem servir de veículo para a levedura do gênero *Candida* adentrar na corrente sanguínea (BLUMBERG et al., 2001).

Em se tratando de pacientes pediátricos, as principais comorbidades observadas foram pneumonia, infecção perinatal e distúrbios no TGI, condições essas bastante citadas na literatura (SAIMAN, 1998).

Com relação às doenças de base apresentadas pelos pacientes, muitos relatos têm documentado associação de casos de candidíase em pacientes com diabetes mellitus (HAJJEH et al., 2004; BARBERINO, 2006) e tumor sólido (PÉMAN et al., 2002; AQUINO et al., 2005; BASSETE et al., 2006).

Na presente casuística, essas doenças de base foram mais frequentes entre os pacientes adultos, mostrando-se superior ao número de casos de candidemias relatados por Odds et al. (2007).

Quanto às doenças hematológicas, a literatura relata que tais pacientes com doenças constituem um significativo grupo de risco para patógenos oportunistas como *Candida spp* (ALMIRANTE et al., 2005; AQUINO et al., 2005; BASSETE et al., 2006; MATTA et al., 2007).

Além das doenças de base acima citadas, o uso de procedimentos invasivos utilizados pelos pacientes pode ter contribuído para o desenvolvimento da ICS.

Pacientes com severas enfermidades requerem maiores cuidados quando, nas UTIs, estiverem sujeitos a dispositivos como ventilação mecânica, nutrição parenteral, cateter venoso em posição central e outros. As mãos de profissionais da saúde podem favorecer infecções cruzadas (CLARK, et al., 2004). Um mecanismo primário na redução de risco de transmissão de agentes infecciosos é, sem dúvida, a lavagem das mãos, que há décadas os profissionais que controlam as infecções nosocomiais advogam no ambiente hospitalar. Essa medida é fundamental para reduzir os riscos de infecção entre pacientes expostos a procedimentos médicos invasivos (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

O baixo peso ao nascimento também pode influenciar o desenvolvimento de candidemia neonatal, pois esses recém-nascidos necessitam frequentemente de internações prolongadas e de procedimentos invasivos cruciais para as suas sobrevivências (BOUSSO et al., 1995; FRIDKIN & JARVIS, 1996; SILVA, et al., 2001; ROILIDES et al., 2004; AGHAI et al. 2006).

Outro fator importante que predispõe a candidemia é o uso de antibiótico de largo espectro por tempo prolongado, em especial cefalosporinas de 3ª geração. Esses antimicrobianos, além de induzirem à emergência de bactérias multiresistentes, no ambiente hospitalar, predispõem ao crescimento de agentes oportunistas, em especial *Candida* spp de origem endógena (BLUMBERG et al., 2001; CHENG et al., 2005; BENJAMIN et al., 2006; BASSETE et al., 2006; GIRMENIA et al., 2006).

Em estudo recente realizado por Saiman *et al.* (2006), foi demonstrado que, entre 23 RNs com candidemia avaliados, 94% haviam recebido pelo menos dois antibióticos previamente. Esse dado reforça nossos achados, sugerindo que o uso de cefalosporinas de 3ª geração (19/25; 76%) pode estar associado às infecções causadas por *Candida* spp.

Além do uso de cefalosporinas de 3ª geração, a permanência em UTIs e as cirurgias podem também favorecer a ocorrência de infecções hospitalares, como descrito por outros pesquisadores (BLUMBERG et al., 2001; PÉMAN et al., 2002; AQUINO et al., 2005; BARBERINO et al., 2006; BASSETE et al., 2006; ODDS et al., 2007).

A fonte de infecção por *Candida* spp tem sido objeto de considerável debate; digno de nota, neste estudo, foram 4 casos em que a mesma levedura foi isolada da ponta de cateter e da hemocultura, sugerindo que o dispositivo intravascular foi a porta de entrada da levedura, conforme também documentado por outros autores (AQUINO et al., 2005; BASSETE et al., 2006).

Em nosso estudo, *C. albicans* foi a espécie mais frequentemente isolada (n = 44; 45,8%), prevalência similar à observada por Viudes et al., (2002), em que 45,9% dos isolados de hemocultura estudados na Espanha eram *C. albicans*.

De forma geral, nos estudos epidemiológicos de infecção de corrente sanguínea por leveduras, *C. albicans* é, sem dúvida, a espécie mais prevalente (COLOMBO et al., 2007; ODDS et al., 2007).

C. albicans também foi mais prevalente tanto em crianças (51,2%) quanto em adultos (41,2%), concordando com outros autores (CHANG et al. 2003a; ELLIS et al. 2003; PÉMAN et al, 2002). Dos 25 neonatos estudados, 11 (44,0%) desenvolveram candidemia por *Candida albicans*, seguido de *Candida parapsilosis* (n = 10; 40%), em concordância com resultados de outros estudos (AGHAI et al., 2006; SAIMAN et al. 2006).

Em estudos norte-americanos, *C. glabrata* é apontada como o 2º agente mais frequente (ODDS et al., 2007). Vale destacar, que diferente de estudos recentes, o número de *C. glabrata* isolada de hemocultura em nosso estudo foi bem inferior (KLEMPP-SELB et al., 2000; ALMIRANTE et al., 2005; ODDS et al., 2007).

No Brasil, essa espécie ainda não está entre as mais isoladas. Alguns autores relatam *C. parapsilosis* como o 2º agente mais prevalente em candidemia (AQUINO, et al., 2005). Outros referem *C. tropicalis* como a 2ª espécie *não albicans* mais isolada (CAMPOS et al., 2003; NUCCI & COLOMBO, 2006).

Muitos pesquisadores têm documentado que as espécies não albicans vêm superando *C. albicans* na etiologia das infecções de corrente sanguínea (MACDONALD et al., 1997; DIEKEMA et al., 2002; MATSUMOTO, 2002; PATEL M. et al., 2005; ABELSON et al., 2005; ALMIRANTE, et al., 2005; COLOMBO et al., 2006).

Sugere-se que a mudança observada se deve à redução da susceptibilidade antifúngica em espécies não albicans e à correlação com a rotina do uso de fluconazol (MEDRANO et al., 2006; MATTA et al., 2007).

Ainda dentre as espécies não albicans, vários autores citam a ocorrência de *C. parapsilosis* como sendo alta em crianças e prematuros que se encontram hospitalizados nas UTIs e CTIs; porém, com baixa mortalidade quando comparados com *Candida albicans*. A explicação para isso pode estar na baixa virulência de *Candida parapsilosis* observada em experimentos feitos com modelos experimentais, onde tais leveduras não possuem habilidade para aderir e penetrar no endotélio de células animais e humanas, ficando, assim, susceptíveis a fagocitose (AQUINO et al., 2005).

Nossos resultados permitiram observar que a frequência de infecções ocasionadas por *C. albicans* (44,8%) foi maior que aquelas causadas por *C. parapsilosis* (34,9%), corroborando resultados encontrados em outras casuísticas (COLOMBO et al., 2006; BASSETE et al., 2006; BENJAMIN et al., 2006). O papel de *C. parapsilosis* como agente de candidemia por contaminação exógena está associado à nutrição parenteral e cateter venoso em posição central, comumente usados em pacientes críticos. Além disso, *C. parapsilosis* é o fungo colonizador mais frequente da região subungueal dos trabalhadores da saúde, e é a levedura mais frequentemente isolada das mãos desses profissionais (CLARK et al., 2004; COLOMBO et al., 2006).

Ainda em relação às espécies não albicans, *C. tropicalis* tem tradicionalmente se tornado a segunda espécie mais isolada da corrente sanguínea, seguida da *C. glabrata* em estudo feito em hospital das forças armadas – Arábia Saudita (AL JASSER, & ELKHIZZI, 2004).

Na presente investigação, pacientes com candidemia devido a *C. tropicalis*, a letalidade foi menor em crianças (11,6 %) do que em adultos (17,0 %), corroborando com

dados encontrados na pesquisa feita por Nucci & Colombo (2006), que observaram uma letalidade de 27,6% para crianças, comparados com 46,2% em adultos.

Entre os RNs internados no HU-UFMS, 12% (n= 3/25) das ICS foram ocasionadas por *C. tropicalis*, concordando com dados encontrados por Nucci & Colombo (2006), que citam ter encontrado 12,3 % de candidemias em neonatos devido a *C. tropicalis*. Roilides, et al., (2004), relata que *Candida tropicalis* é um patógeno incomum entre neonatos, e a colonização pode ser feita por via cruzada, ou associada a intervenções terapêuticas, tais como uso de cateter venoso e nutrição parenteral.

Quanto à espécie *C. glabrata*, observou-se que, dentre as cinco cepas analisadas, somente uma foi isolada de recém-nascido. Esse dado corrobora com MacDonald et al., (1997), que cita um caso de infecção hematogênica por *C. glabrata* em recém-nascido. Por outro lado, índice bem maior tem sido divulgado nos Estados Unidos e na Europa (BLUMBERG et al., 2001; BASSETE et al., 2006). Quatro isolados foram de pacientes adultos com idade superior a 65 anos, similar ao observado em estudo de Diekema et al., (2002), que relata casuística feita em 17 centros médicos do estado de Iowa, onde se observou que 25% de todos os casos de candidemias associados a *C. glabrata* ocorreram em pacientes maiores de 65 anos.

Na Espanha, Almirante et al., (2005) encontraram frequência de óbitos de 44% entre 345 pacientes que desenvolveram candidemia.

A pesquisa demonstrou 60,4% de letalidade entre os pacientes com infecção de corrente sanguínea por *Candida* spp. Esses valores mostraram-se menores que estudo realizado por Almirante et al., (2005) que relataram 44% de óbito entre 345 pacientes com ICS por *Candida*. Por outro lado, nossos resultados são similares a de outro estudo nacional (COLOMBO et al., 2007), que descreveram frequência de óbitos de 61% em pesquisa feita com quatro hospitais terciários em São Paulo, Brasil.

Estudos realizados por Barberino et al., (2006), sugerem que, em alguns casos, a alta letalidade encontrada em quadros de candidemias pode estar relacionada com a severidade da doença de base desenvolvida pelos pacientes, e não propriamente com as candidemias.

Em prematuros, a sensibilidade das hemoculturas costuma ser baixa, constituindo um dos fatores que pode influenciar no aumento da taxa de óbitos entre os neonatos, pois o volume de sangue é relativamente pequeno. A probabilidade de se detectar o microrganismo em 1 mL de sangue é de 65 % ou menos, o que dificulta a identificação do desenvolvimento de candidemia e, conseqüentemente, retarda o início da terapêutica específica, acarretando óbitos (MOREIRA, 2005).

O alto índice de óbitos observados nos pacientes internados na UTI neonatal do HU-UFMS (19/25; 76%) e maior que o relatado por Procianoy et al., (2006), segundo o qual 61% dos neonatos foram a óbito devido a infecção por *Candida* spp. Além disso, o número de óbitos ocorrido entre os neonatos foi inversamente proporcional idade gestacional dos pacientes, concordando com Fridkin & Jarvis (1996) e Fanaroff et al., (1998).

Apesar de serem conhecidos os fatores predisponentes, de infecções oportunistas por *Candida*, estreitas medidas de precaução tornam-se imprescindíveis, juntamente com severa vigilância do enfermo, especialmente aquele hospitalizado em áreas críticas, mais precisamente nas UTIs, por longos períodos. Para tanto, um controle adequado de uso de antibiótico; a utilização de métodos como os moleculares, que agilizam a identificação dos agentes e emergência de surtos; a administração de tratamento precoce com o uso adequado de antifúngicos pode reduzir a instalação de resistência a essas drogas (GAYTAN et al., 2000; SAN MIGUEL et al., 2004).

No que diz respeito à análise genotípica realizada, a técnica de PCR-RAPD foi útil na diferenciação entre espécies, comprovando o alto poder discriminatório da técnica reforçando

estudos anteriores de outros pesquisadores (MANNARELLI & KURTZMAN, 1998; BAUTISTA-MUNHOZ et al., 2003; RESENDE et al., 2004; VALÉRIO et al., 2006).

Ao analisarmos os perfis genéticos de *C. tropicalis*, constatou-se que o perfil “A” predominou entre os pacientes adultos. Esse tipo de padrão foi incomum entre pacientes pediátricos, onde, de sete isolados, apenas dois pacientes da UTI neonatal tinham perfis similares ao padrão “A” encontrado em adultos, demonstrando que existe um mesmo clone entre pacientes adultos e pediátricos.

A similaridade genética de 98,8% entre duas das *Candida tropicalis*, provenientes da UTI neonatal, sugere mesma origem clonal, porém sem relação epidemiológica. Esse dado tem aspecto positivo porque Roilides et al., (2004) destacaram que essas espécies costumam ser mais virulentas e a infecção em pacientes de alto risco como RNs, pode ser catastrófica.

Ainda nessa mesma linha de considerações, duas das cinco cepas de *C. glabrata* apresentaram 94% de similaridade genética (L3 e L4), mas não foram epidemiologicamente relacionadas, por serem isoladas em períodos distintos, o que nos leva a crer que essas são cepas endêmicas presentes no setor (CTI de adultos) e que eventualmente surge como agente de infecção.

Conforme observado nas **Figuras 6B, 7B e 8B**, o perfil “A” predominante (24 isolados) era, na sua maioria, proveniente de *C. parapsilosis*, isoladas de pacientes internados no CTI de adultos, sugerindo fonte comum.

Ao analisarmos o período de isolamento nesse setor, foram constatados dois surtos de IH por *C. parapsilosis*, incluindo 3 casos ocorridos de agosto a dezembro de 2000 e três casos ocorridos no mês de fevereiro de 2002.

Dois casos ocorridos no ano de 2000 foram considerados pertencentes a um pequeno surto.

Apesar de estar predominando no CTI de adultos, esse perfil também foi observado em diferentes setores hospitalares, inclusive unidades de internação de pacientes pediátricos, sugerindo que se trata de uma cepa endêmica presente nessa instituição de saúde.

Apesar dos perfis dos isolados representados pelas linhas de L1 a L8 da Figura 8A parecerem ser idênticos, na representação observada no dendrograma da Figura 8B, fica claro que na verdade são 4 padrões distintos.

Isolados de *C. parapsilosis* provenientes da UTI neonatal, em sua maioria, não demonstraram relação epidemiológica, apenas relação genética, por serem isolados de períodos muito distantes. No entanto, L9 e L10 são epidemiologicamente relacionados e foram isolados do mesmo setor de internação em curto espaço de tempo, sugerindo fonte comum de infecção. Importante ressaltar que, por se tratar de um setor que atende pacientes de alto risco, esse surto foi prontamente controlado pelo *staff* clínico, o que nem sempre é possível (SAIMAN, 1998).

Analisando o gráfico ilustrado no dendrograma da Figura 9B, supõe-se que todas as cepas da UTI neonatal pertençam a um mesmo clone (similaridade > 90%) (PUJOL, et al., 2002). As poucas diferenças encontradas na representação esquemática do dendrograma podem ser devido a eventos genéticos que podem ocorrer durante longos períodos de tempo (ROILIDES et al., 2004). Acredita-se ainda que, dado o curto espaço de tempo entre os isolamentos, as cepas representadas nas linhas L4 a L6 (isoladas em 2003) e L8 a L10 (isoladas em 2006) são epidemiologicamente relacionadas.

Ainda nessa linha de pensamento, a análise do dendrograma da Figura 10B nos leva a crer que há um clone de cepa endêmica presente em diferentes setores do HU-UFMS com predomínio do perfil “A”, que representa 23 cepas isoladas em diferentes períodos do ano.

A Figura 9B mostra que *C. albicans*, representadas por L18 e L19, foram isoladas no CTI de adultos no mesmo período (maio/2003), sugerindo uma fonte de infecção e caracterizando um pequeno surto que foi prontamente controlado.

Na Figura 11B, observa-se dois perfis distintos de *C. albicans*, onde o DNA cromossomal dos isolados representados por L5 e L7 sugerem a possibilidade de infecção cruzada, pois foram coletados em períodos próximos, porém de diferentes setores.

Quando diferentes pacientes de setores distintos apresentam o mesmo perfil genético, tem-se indício de infecção cruzada ou aquisição devido à mesma fonte (BRANCHINI et al., 1995; RESENDE et al., 2004).

Considerando tudo que foi anteriormente exposto, os resultados obtidos com a técnica de PCR-RAPD foram úteis na diferenciação das espécies de *Candida* isoladas de hemocultura de pacientes hospitalizados, corroborando com outros pesquisadores que tem recomendado a técnica para distinguir ou comparar isolados de diferentes pacientes e fontes inanimadas (LEHMANN et al., 1992; NIERTERS et al., 1993; WAHYUNINGSIH et al., 2000; CHANG et al. 2001; SANSINFORIANO et al., 2001; VRIONI et al., 2001; GRAF et al., 2004; MAAROUFI et al., 2004; PINTO et al., 2004; MIRHENDI et al., 2006; VALÉRIO et al., 2006).

Com a presente investigação, foi possível observar uma grande variedade genética entre as *Candidas* spp estudadas. Em suma, foi observado que existem clones de determinadas espécies que aparecem e desaparecem em diferentes espaços de tempo, sem, entretanto causar nenhum surto.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerações Finais

- ✓ A frequência estimada de ocorrência de candidemia por hemocultura positiva foi de 10,6 casos por ano.
- ✓ Os pacientes mais acometidos foram aqueles com faixa etária < 30d e > 60 a considerada crítica, internados em setores de alto risco para infecção.
- ✓ Espécies de *Candida* não albicans foram responsáveis por mais da metade de todos os casos.
- ✓ Além de candidemias, os pacientes apresentavam outras comorbidades, na maioria de etiologia bacteriana, em especial pneumonia, doença do trato gastrointestinal e infecção do trato urinário.
- ✓ As principais condições de risco que podem ter favorecido candidemia foram hospitalização por mais de 15 dias, uso de cateter venoso central e uso de cefalosporina de 3ª geração.
- ✓ A análise genotípica realizada com a técnica de PCR-RAPD mostrou alto poder discriminatório, pois possibilitou a diferenciação entre as diferentes espécies de *Candida* e permitiu a diferenciação entre leveduras de uma mesma espécie.
- ✓ Resultados parciais obtidos nesta pesquisa foram divulgados para o CCIH do HU_UFMS, por meio do Boletim epidemiológico do NHU e as informações obtidas certamente serão úteis na tomada de medidas de prevenção e controle de infecção na corrente sanguínea por espécies de *Candida*.
- ✓ A experiência adquirida foi importante para o crescimento científico nessa área, além de abrir novos horizontes com parceiros importantes, como o ICB da USP e Laboratório de biologia molecular da Embrapa Gado de Corte, instituições imprescindíveis para a concretização deste trabalho.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABELSON, J. A. *et al.* Frequency of fungemia in hospitalized pediatric inpatients over 11 years at a tertiary care institution. **Pediatrics**. v.116, p. 61-67, 2005.
- ABI-SAID, D. *et al.* The epidemiology of hematogenous candidiasis by different candida species. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 24, p.1122-1128, 1997.
- AGHAI, Z.H. *et al.* Fluconazole prophylaxis in extremely low birth weight infants: association with cholestasis. **J. Perinatol.**, v. 26, p. 550-555, 2006.
- ALEXANDER, B. D. Diagnosis of fungal infection. New technologies for mycology laboratory. **Transpl. Infect. Dis.**, v. 4, s.3, p.32-32, 2002.
- AL-JASSER, A. M. & ELKHIZZI, N. A. Distribution of *Candida* species among bloodstream isolates. **Saud. Med. J.**, v. 25, n. 5, p. 566-569, 2004.
- ALMIRANTE, B. *et al.*, Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **J. Clin. Microbiol.**,v. 43, n. 4, p. 1829-1835, 2005.
- AQUINO, V .R.; *et al.* Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 9, p. 411-4128, 2005.
- BARBERINO, M. G. *et al.* Evaluation of blood stream infections by *Candida* in three tertiary hospital in Salvador, Brazil: a case-control study. **Braz. J. Infec. Dis.**, v.10, n.1, p. 36-40, 2006.
- BASSETTE, M. *et al.*, Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **BMC Infect. Dis.** v. 6, n. 21, p. 1-6, 2006.
- BAUTISTA-MUNOZ, C., *et al.* Identification of *Candida* spp. by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis and Differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by Direct PCR Methods. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 414-420, 2003.
- BENJAMIN JR, D. K. *et al.* Neonatal candidiasis among extremely low birth weight infants: risk factors, mortality rates, and neurodevelopmental outcomes at 18 to 22 months. **Pediatrics**, v. 117, p. 84-92, 2006.
- BLUMBERG, H. M. *et al.* Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. **Clin. Infec. Dis.**, v. 33, p. 177-186, 2001.
- BOUSSO, A. *et al.* Infecção hospitalar em recém-nascido. **Pediatria** v. 17, n. 1, p. 10-37, 1995.
- BRANCHINI, M. L. M. *et al.* Molecular typing of *Candida albicans* strains isolated from nosocomial candidemia. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, v. 37, n. 6, p. 483-487, 1995.

- BRODIE, S. B. *et al.* Occurrence of nosocomial bloodstream infectious in six neonatal intensive care units. **Pediatrics Infect. Dis. J.**, v. 19, p. 56 – 57, 2000.
- CAMPOS, M. *et al.* Espécies de *Candida* em el hospital nacional de niños 1995-2001. **Rev. Med. Hosp. Nac. Niños.** v. 38, n. 1, p. 1-4, 2003.
- CHANG, C. C. *et al.* Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 10, p. 3466-3471, 2001.
- CHANG, R. M. **Rastreamento de Microorganismos envolvidos em infecção hospitalar na pediatria do Hospital Universitário de Mato Grosso do Sul.** 2003, 300 f. Tese (doutorado em Ciências na área de Bacteriologia). Fundação Oswaldo Cruz, Campo Grande, 2003a.
- CHANG, R. M. *et al.* Surveillance of pediatric infections in a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.** v. 9, n. 2, p. 149-160, 2003b.
- CHENG MING-FANG *et al.* Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-albicans *Candida*. **BMC Infect. Dis.**, v. 5, p. 1-5, 2005.
- CLARK, T.A. *et al.* Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 4468-4472, 2004.
- COLOM, M. F. *et al.* Biología molecular em el diagnóstico de la candidiasis profunda em el paciente crítico no neutropénico. **Rev. Iberoam. Micol.**, n. 23, p. 26-28, 2006.
- COLOMBO, A. L. *et al.* Gastrointestinal translocation as a possible source of candidemia in an AIDS patients. **Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 38, n. 3, p. 197-200, 1996.
- COLOMBO, A. L. *et al.* High Rate of non-albicans: Candidemia in Brazilian Tertiary Care Hospitals. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 34, p. 281 – 286, 1999.
- COLOMBO, A. L. & GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 36, p. 599-607, 2003.
- COLOMBO, A. L. *et al.* Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J. Clin. Microbiol.** v. 44, n. 8, p. 2816-2823, 2006.
- COLOMBO, A. L. *et al.* Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 28, p. 570-576, 2007.
- DIEKEMA, D. J. *et al.* Epidemiology of candidemia: 3-Year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. **J. Clin. Microbiol.** v. 40, n. 4, p. 1298-1302, 2002.
- ELLIS, M. *et al.* Epidemiology, presentation, management and outcome of candidemia in a tertiary care teaching hospital in the United Arab Emirates, 1995-2001. **Med. Mycol.**, n.41, p.521-528, 2003.

- FANAROFF, A. A. *et al.* Incidence, presenting features, risk factors and significance of late onset septicemia in very low birth weight infants. **Pediatr. Infect. Dis.**, v.17, n. 7, p.593-598, 1998.
- FRIDKIN, S.K. & JARVIS, W.R. Epidemiology of nosocomial fungal infections. **Clin. Microbiol.**, v. 9, p. 499-511, 1996.
- GAYTAN, J.J.A. *et al.* Factores de riesgo en el paciente con candidemia. **Med. Int. Mex.**, v. 16, n. 2, p. 69-73, 2000.
- GIRMENIA, C. *et al.* *Candida guilliermondii* fungemia in patients with hematologic malignancies. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 7, p. 2458-2464, 2006.
- GIUSIANO, G.E. *et al.* Yeasts species distribution in neonatal intensive care units in northeast Argentina. **Mycoses**, n. 47, p. 300-303, 2004.
- GODOY, P. *et al.* Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin America hospitals. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 401-405, 2003.
- GRAF, B. *et al.* Rapid and simple differentiation of *C. dubliniensis* from *C. albicans*. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.** v. 48, p. 149-151. 2004.
- HAJJEH, R. A. *et al.* Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population- Based Active Surveillance program. **J. Clin. Microbiol.**, p.1519-1527, jan., 2004.
- HUI, M.; IP, M. *et al.* Rapid identification of medically important *Candida* to species level by polymerase chain reaction and single-strand conformational polymorphism. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 38, p. 95-99, 2000.
- JIANPING X. *et al.* Species and Genotypic Diversities and Similarities of pathogenic yeasts Colonizing women. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n.12, p. 3835-3843, dec. 1999.
- JORDAN, J. A. PCR identification of four medically important *Candida* species by using a single primer pair. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 12, p. 2962-2967, 1994.
- KANBE, T. *et al.* PCR-based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes. **Yeast**. V. 19, p. 973-989, 2002.
- KAUFFAMAN, C.A. *et al.* Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. **Clin. Infect. Dis.** v. 30, p. 14-18, 2000.
- KLEMPPEL, B. *et al.* Karyotyping of *Candida albicans* and *Candida glabrata* from patients with *Candida* sepsis. **Mycoses**, 43: 59 – 163, 2000.
- KOJIC, E.M & DAROUICHE, R.O. *Candida* infections of medical devices. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 17, n.2, p.255-267. 2004

- LACAZ, C.S. *et al.* **Tratado de Micologia Médica**. 9 Ed. São Paulo: Sarvier; 2002.
- LARONE, D. H. Laboratory Procedures. **Medically Important Fungi. Guide to Identification**, Whashington: ASM Press. Cap. 7, p. 215 – 219, 1995.
- LEHMANN, P. F. *et al.* Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, n. 12, p. 3249-3254, 1992.
- LUPETTI, A. *et al.* Horizontal transmisson of *Candida parapsilosis* Candidemia in a neonatal intensive care unit. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 2363-2369, 2002.
- MAAROUFI, Y. *et al.* Early detection and identification of commonly encountered *Candida* species from simulated blood cultures by using a real-time PCR-based assay. **J. Molecular Diag.** v. 6. n.2, p. 108-114, 2004.
- MACDONALD, L. *et al.* Factors for candidemia in a children´s hospital. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.26, p.642-645, 1997.
- MANNARELLI, B. M. & KURTZMAN, C. P. Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotidess in a PCR. **J. Clin. Microbiol.** v. 36, p. 1634-1641, 1998.
- MASON, M. M. *et al.* Molecular probe for identification of medically important *Candida* species and *Torulopsis glabrata*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, n. 3, p. 563-566, 1987.
- MATTA, D.A. *et al.* Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. **Diag. Microbiol. Infec. Dis.** v. 57, n. 4, p. 399-404, 2007.
- MATSUMOTO, F. E. *et al.* Yeasts isolated from blood and catheter in children from a public hospital of São Paulo, Brazil. **Mycopatologia**, p. 63-69, 2002.
- MATSUMOTO, F. E. **Candidemia em hospital público infantil de São Paulo: caracterização genotípica das leveduras em associação e sensibilidade aos antifúngicos**. Tese (Doutorado) Universidade Federal de São Paulo, SP, 2006.
- MEDRANO, D.J.A. *et al.* Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, **48**: 17-20, 2006.
- MENEZES, E.A. *et al.* Isolamento de *Candida* spp. no mamilo de lactantes do banco de leite humano da universidade federal do Ceará e teste de susceptibilidade a antiúngicos. **Bras. Patol. Med. Lab.**, n.5,v.40,p.299-305.2004.
- MESTRONI, S. C. *et al.* Agentes etiológicos de fungemia en el Hospital San Martins de La Plata. **Rev. Argent. Microbiol**, vol. 35, p.106-109, jun. 2003.

MIRHEND, H. *et al.* A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. **Jpn. J. Med. Mycol.** 2006; 47: 225-229.

MONCADA, P. F. *et al.* **Molecular epidemiology of *Candida spp* isolated from pediatric in a teaching hospital.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA - 11, 2001, Foz do Iguaçu. **Resumos...** Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2001. p.156, ref. IH-071.

MOREIRA, M.E. Controvérsias a respeito da sepse fúngica no pré-termo extremo: profilaxia e esquemas terapêuticos. **J. Pediatr.** vol.81. p S52-S58. 2005.

MURRAY, P. R. *et al.* Micoses Oportunistas. **Microbiologia Médica**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. Cap.71, p. 487-489, 1998.

NIERTERS, H. G. M. *et al.* Rapid, polymerase chain reaction-based identification assays for *Candida* species. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n. 4, p. 904-910, 1993.

NUCCI, M. *et al.* Fungemia in cancer patients in Brazil predominance of non-albicans species. **Mycopathologia**, 141: 65 – 68, 1998.

NUCCI, M. & COLOMBO, A.L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 58, n. 2007, p. 77-82. 2006.

ODDS, F.C. **Candida and candidosis.** 2 ed. London: Ballière Tindall, p. 468, 1988.

ODDS, F.C. *et al.*, One year prospective survey of *Candida* bloodstream infections in Scotland. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, p. 1066-1075, 2007.

PATEL, M. *et al.* Initial management of candidemia at an academic medical center: Evaluation of the IDSA guidelines. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 52, p. 29 – 34, 2005.

PAULA, C. R. Candidíases. In: Zaitz C, Campbell I, Marques AS, *et al.* **Compêndio de Micologia Médica.** Rio de Janeiro: Medsi; p. 99-107, 1998.

PÉMAN, J. *et al.*, Estudio multicéntrico sobre la epidemiología de las candidemias en España. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 19, p. 30-35, 2002.

PFALLER, A. M. & DIEKEMA, D. J. Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 3551-3557, 2002.

PFALLER, A.M. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. **Clin. Infect. Diseases.** v. 22, p. S89-S94, 1996.

PINTO, P. M. *et al.* Genetic variability analysis among clinical *Candida spp.* Isolates using random amplified polymorphic DNA. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 147-152, 2004.

- PROCIANOY, R. S. *et al.* Empiric guidelines for treatment of *Candida* infection in high-risk neonates. **Eur. J. Pediatr.**, v. 165, p. 422-423, 2006.
- PUJOL, C. *et al.* Ca3 fingerprint of *Candida albicans* bloodstream isolates from the United States, Canada, South America, and Europe reveals a European Clade. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 8, p. 2729-2740, 2002.
- RENNERT, G. *et al.* Epidemiology of Candidemia - A Nationwide Survey in Israel. **Clin. Epidemiol. Studies**, v. 28, p. 26-29, 2000.
- RESENDE, J.C.P. *et al.* Phenotypic and genotypic identification of *Candida* spp. Isolated from hospitalized patients. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 21, p. 24-28, 2004.
- RIBEIRO, E.L. *et al.* Ocorrência de leveduras de *Candida* em hemoculturas originadas de infecção nosocomial. **NewsLab**, ed. 60, p.78-83, 2003.
- RIBEIRO, E.L. *et al.* Aspectos das leveduras de *Candida* vinculadas as infecções nosocomiais. **NewsLab**, n. 64, p. 106-128, 2004.
- ROILIDES, E. *et al.* Neonatal candidiasis: analysis of epidemiology, drug susceptibility, and molecular typing of causative isolates. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 23, p. 745-750, 2004.
- SAIMAN, L. Neonatal candidiasis. **Clin. Microbiol. Newsletter**, v.20, n.18, p. 149-155, 1998.
- SAIMAN, L. Strategies for prevention of nosocomial sepsis in the neonatal intensive care unit. **Curr. Opin. Pediatr.**, v. 18, p. 101-106, 2006.
- SAN MIGUEL L.G. *et al.* Morphotypic and genotypic characterization of sequential *Candida parapsilosis* isolates from a nosocomial outbreak in a pediatric intensive care unit. **Diag. Microbiol. Inf. Dis.**, v. 49, p. 189-196, 2004.
- SANDVEN, P. Epidemiology of candidemia. **Rev. Iberoamer. Micol.**, 17: 73 – 81, 2000.
- SANSINFORIANO, M. E. *et al.* Optimización de las condiciones RAPD-PCR en *Candida* spp y *Cryptococcus* spp. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 18, p. 65-69, 2001.
- SELVARANGAN, R. *et al.* Rapid identification of commonly encountered *Candida* species directly from blood culture bottles. **J. Clin. Microbiol.** v. 41, n. 12, p. 5660-5664, 2003.
- SILVA, M. R. R. **Variabilidade fenotípica e genotípica de amostras de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com AIDS.** 1999, 300 f. Tese (Doutorado) Universidade Federal de São Paulo, SP, 1999.
- SILVA, C. L. *et al.* Cluster of *Candida parapsilosis* primary bloodstream infection in a neonatal intensive care unit. **Braz. J. Infec. Dis.** v.5, n. 1, p. 32-36, 2001.

- SILVA, V. *et al.* Prevalência de serotipos de *Candida albicans* em aislamientos de hemocultura em Chile y primer caso de candidemia por *Candida dubliniensis*. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.20, p.46-51, 2003.
- SILVA, C. M. D. & RODRIGUES, T. Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular. ed. 1. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2006, p. 16-40.
- SUGIZAKI, M.F. *et al.* Prevalence and in vitro antifungal susceptibility of *Candida* spp isolated from clinical specimens in São Paulo, Brazil. **Rev. Iberoam. Micol.**, n.15, p. 16-18. 1998.
- TENOVER, F. C. *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 9, p. 2233-2239.1995.
- TENOVER, F. C. *et al.* How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infec. Con. Hosp. Epidem.** v. 18. n. 6. p.426-438. 1997.
- VALÉRIO, H. M. Differentiation of *Candida* species obtained from nosocomial candidemia using RAPD-PCR technique. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 39, n. 2, p. 174-178, 2006.
- VILLARI, P. *et al.* Molecular epidemiology as an effective tool in the surveillance of infecitons in the neonatal intensive care unit. **J. infectect.**, v. 37, p. 274-281, 1998.
- VIUDES, A. *et al.* Candidemia at a terciary-care hospital:epidemiology, treatment, clinical outcome and risk factors for death. **Eur. Clin. Microb. Inf. Dis.** v. 21. p. 767-774, 2002.
- VRIONI, G.& BERNARD-MATSIOTA, P. Molecular typing of *Candida* isolates from patients hospitalized in an intensive care unit. **J. Infect.** v. 42. p. 50-56. 2001.
- WAHYUNINGSIH, R. *et al.* Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serun by PCR for diagnosisof invasive candidiasis. **J. Clin. Microbiol.** v. 38, n. 8, p. 3016-3021, 2000.
- WHITE, P. L. *et al.* Detection of seven *Candida* species using the light-cycler system. **J. Med. Microbiol.** v.52. p. 229-238. 2003.

8. *ANEXOS*

Evolução : () alta:___dias de internação () Óbito:_____dias de internação

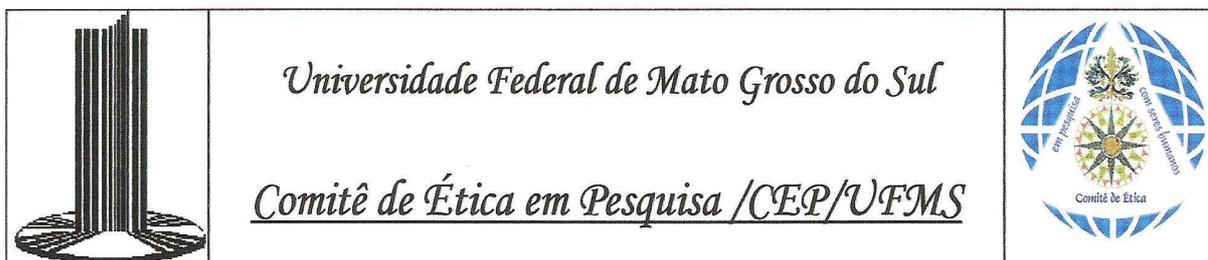
Procedimentos invasivos:

Cateter O₂ () ; Dreno () ; Sonda nasogástrica () ; Nutrição parenteral () ;

Cirurgia _____ () ; Traqueostomia () ; Ventilação mecânica () ;

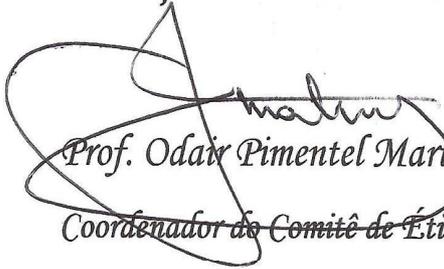
Hemodiálise () ; Transfusão sanguínea () ; Outros () _____

Infecção hospitalar: ()



Carta de Aprovação

A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 465 da Pesquisadora Marilene Rodrigues Chang, intitulado “Caracterização molecular de fungos do gênero Cândida isolados de pacientes com infecção na corrente sanguínea em Mato Grosso do Sul”, foi revisado por este Comitê e aprovado em reunião Ordinária no dia 29 de março de 2005, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.


Prof. Odair Pimentel Martins

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 30 de março de 2005.

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
<http://www.propp.ufms.br/bioetica/cep/>
bioetica@propp.ufms.br
fone 0XX67 345-7187

APÊNDICE 1

SOLUCÕES

SDS 10%

SDS (Sódio Dodecyl Sulfate)----- 10g
H₂O MILLI-Q ----- 100 mL
Conservar em temperatura ambiente e vidro âmbar.

EDTA 500 MM usa 0,5M

(aquecer para dissolver em banho-maria)

Na₂EDTA-----186,1g
H₂O MILLI-Q----- 800 mL
NaOH (pastilha)----- 20g
H₂O MILLI-Q----- 1000 mL
Conservar em temperatura ambiente e garrafa branca. PH = 8,0

TAMPÃO TE

TRISBASE (TRIZMA-BASE)----- 0,121g
EDTA 500 MM----- 0,2 mL
H₂O MILLI-Q----- 100 mL
Autoclavar e conservar temperatura ambiente em vidro âmbar, pH = 7,5.

TAMPÃO TBE

TRISBASE----- 54g
AC. BÓRICO----- 27,5g
EDTA (0,5M) ----- 20 mL
H₂O MILLI-Q----- 500 mL
Autoclavar e conservar em geladeira e vidro âmbar.

TAMPÃO SET

NaCl----- 4,38g
EDTA----- 9,30g
TRIS----- 2,42g
H₂O MILLI-Q----- 1000 mL
Autoclavar e conservar em vidro âmbar, pH = 8,0, regular o pH com NaOH 0,1 µ e completar para 1000 mL

MEIO DE CULTURA

YPD (YEAST PEPTONE DEXTROSE) Marca Difco ou Oxoid 500g

Extrato de levedura ----- 10g
Peptona----- 20g
Glicose----- 20g
H₂O----- 1000 mL

GEL DE AGAROSE PARA CORRIDA DE DNA

CUBA PEQUENA

Agarose 1,2% ----- 0,6g
TBE 10X ----- 5 mL
H₂O destilada----- 50 mL
Obs. O gel é 1,2 % . A água destilada acrescentar para 50 mL

CORANTE

Solução azul bromofenol (Solução 1)

Sucrase ----- 40%
Azul de bromofenol----- 25%
q.s.p. H₂O destil. ----- 10mL

Glicerol ----- 50 %
Solução 1 ----- 0,25%
TBE 5X q.s.p. ----- 10 mL