

DÉBORA DE SOUZA OLARTECHEA DE ALENCAR

**CARACTERIZAÇÃO DE *CANDIDA* SPP ISOLADAS DE
HEMOCULTIVO E ASPECTOS CLÍNICOS DE CANDIDEMIA**

CAMPO GRANDE
2013

DÉBORA DE SOUZA OLARTECHEA DE ALENCAR

**CARACTERIZAÇÃO DE *CANDIDA* SPP ISOLADAS DE
HEMOCULTIVO E ASPECTOS CLÍNICOS DE CANDIDEMIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^aDr.^aMarilene Rodrigues Chang

CAMPO GRANDE
2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

DÉBORA DE SOUZA OLARTECHEA DE ALENCAR

**CARACTERIZAÇÃO DE *CANDIDA* SPP ISOLADAS DE
HEMOCULTIVO E ASPECTOS CLÍNICOS DE CANDIDEMIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado: Aprovada

Campo Grande (MS), 28 de março de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira
Universidade Federal da Grande Dourados

Profa. Dra. Sonia Andrade Oliveira de Andrade
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Profa. Dra. Anamaria Mello Miranda Paniago
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Profa. Dra. Marilene Rodrigues Chang
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Dedico este trabalho

A Deus por estar presente em todos os momentos da minha vida, por todas as coisas maravilhosas que me foram concedidas, pois sem as suas bênçãos eu não poderia alcançá-las.

Aos meus pais Márcia e Edson que são a minha razão de viver, pelo amor, compreensão e por estarem sempre muito presentes em todas as etapas de minha vida.

Aos meus irmãos Everton e Edson pelo amor, motivação e carinho.

Ao meu marido Sérgio que me incentiva a buscar novos projetos, pelo amor, dedicação, apoio, motivação e incentivo que me guiam em todas as conquistas.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Dra. Marilene Rodrigues Chang pela sua orientação, dedicação, e pelos conhecimentos transmitidos, minha sincera gratidão.

À equipe do Laboratório de Micologia do Hospital Universitário/UFMS, especialmente a Maína de Oliveira Nunes e Gláucia Moreira Espíndola Lima, por terem cedido as leveduras utilizadas neste estudo e pelos auxílios prestados.

À amiga e companheira de mestrado Rosianne Assis de Souza Tsujisaki, pela ajuda e acompanhamento em todo o trabalho.

À amiga e companheira de mestrado Tâmara Trelha Gauna, pelo fornecimento de dados clínicos e ajuda no trabalho.

À equipe e companheiras do Laboratório de Análises Clínicas – LAC, Fernanda Spositto, Liliane Martins, Regina Leite, Rita de Cássia Benevides pelo apoio e compreensão nos momentos em que estive ausente.

À Professora Dra. Maria de Fátima Cepa Matos pelo incentivo, apoio e compreensão nos momentos de ausência.

Às Professoras Marilena dos Anjos Martins pelo treinamento da técnica de biologia molecular, à Dra. Maria Walderez Szeszs e à Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem pela prestatividade e esclarecimento às dúvidas.

À Professora Dra. Anamaria Mello Miranda Paniago, pelo apoio e colaboração com dados clínicos nesta pesquisa, mostrando-se sempre disposta a ajudar.

À Professora Dra. Elenir Rose Jardim Cury Pontes, pela colaboração na análise estatística.

Ao meu marido Sérgio Marques de Alencar, pela brilhante ajuda nas figuras.

Ao Programa de Pós-Graduação Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da UFMS, pela oportunidade.

A todos, que ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

*“Só existem dois dias no ano nos quais nada pode ser
feito. Um se chama ontem e o outro, amanhã, portanto
hoje é o dia certo para amar, acreditar,
fazer e, principalmente, viver”.*

Dalai Lama

RESUMO

ALENCAR DSO. Caracterização de *Candida* spp isoladas de hemocultivo e aspectos clínicos de candidemia. Campo Grande; 2013. [Dissertação - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

O aumento de infecções invasivas por leveduras do gênero *Candida* representa um grave problema de saúde pública. Recentemente observa-se a emergência global de espécies de *Candida* não *Candida albicans* como agente de candidemia. Objetivou-se neste estudo descrever as características demográficas e clínicas de 32 pacientes com diagnóstico laboratorial de candidemia, identificar as espécies envolvidas e determinar o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos. O estudo foi realizado no Hospital Universitário de Mato Grosso do Sul em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, entre março de 2010 a março de 2012. A identificação fúngica foi realizada por meio de testes fenotípicos (CHROMagar *Candida*, microcultivo, auxanograma) e pelo sistema automatizado VITEK 2. A concentração inibitória mínima do fluconazol, voriconazol, itraconazol e anfotericina B foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, documento M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute*. A diferenciação das espécies do complexo de *Candida parapsilosis* foi realizada pela técnica de PCR-RFLP. *Candida albicans* foi a espécie mais isolada (34,4%), seguida por *Candida* do complexo *C. parapsilosis* (21,9%), *C. guilliermondii* (15,6%), *C. glabrata* (12,5%), *C. tropicalis* (12,5%) e *C. krusei* (3,1%). *Candida* não *C. albicans* foram responsáveis por 65,6% dos casos. Entre as espécies do complexo *C. parapsilosis*, cinco eram *C. parapsilosis stricto sensu* e duas *C. orthopsilosis*. A maioria das leveduras foi sensível aos antifúngicos testados. Todas *C. glabrata* foram sensíveis dose dependente ao fluconazol e resistentes ao itraconazol. Entre os cinco isolados de *Candida guilliermondii*, um foi sensível dose dependente ao fluconazol e todos sensíveis dose dependente ao itraconazol. A ocorrência de candidemia foi maior em pacientes com idade acima de 60 anos (46,9%) e nos grupos considerados críticos, como os internados na unidade de terapia intensiva (40,6%) e no serviço de hemodiálise (21,9%). Em três pacientes foi observada a infecção de corrente sanguínea relacionada a cateter venoso central. Dos 32 pacientes, 47% foram a óbito. A análise multivariada mostrou associação entre o maior número de óbitos em pacientes com infecção de corrente sanguínea por *Candida albicans* do que *Candida* não *Candida albicans* ($p \leq 0,05$). Constata-se a emergência de *Candida* não *C. albicans* como agente de candidemia no HU/UFMS, especialmente por *Candida* do complexo *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. glabrata*. A técnica de PCR-RFLP foi útil na diferenciação das espécies do complexo *C. parapsilosis*.

Palavras-chave: candidemia, *Candida* spp, complexo *Candida parapsilosis*, suscetibilidade antifúngica.

ABSTRACT

ALENCAR DSO. Characterization of *Candida* spp isolated from blood cultures and clinical aspects of candidemia. Campo Grande, MS, Brazil; 2013. [Master's thesis – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Increases in invasive infection by yeasts of the genus *Candida* constitute a serious public health issue. Worldwide, non-*C. albicans* *Candida* species have recently emerged as agents of candidemia. The purposes of this study were to describe the demographic and clinical characteristics of 32 patients with laboratory diagnosis of candidemia, identify the infective species, and determine their antifungal susceptibility profiles. The study was conducted at the teaching hospital of the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul in Campo Grande, Mato Grosso do Sul state, Brazil, from March 2010 to March 2012. Fungal identification was based on phenotypic testing (CHROMagar *Candida*, microculture, auxanogram) and an automated Vitek 2 system. Minimum inhibitory concentrations of fluconazole, voriconazole, itraconazole, and amphotericin B were determined by broth microdilution, according to the M27-A3 document of the Clinical and Laboratory Standards Institute. PCR-RFLP was employed for differentiation of species in the *Candida parapsilosis* complex. Overall, *C. albicans* was the species most often isolated (34.4%), followed by the *C. parapsilosis* complex (21.9%), *C. guilliermondii* (15.6%), *C. glabrata*/*C. tropicalis* (12.5%), and *C. krusei* (3.1%). Non-*C. albicans* *Candida* species accounted for 65.6% of cases. Of the species pertaining to the *C. parapsilosis* complex, five isolates were *C. parapsilosis stricto sensu* and two were *C. orthopsilosis*. Most yeasts were sensitive to the antifungals tested. The susceptibility of all *C. glabrata* isolates was dose-dependent to fluconazole and all isolates proved itraconazole-resistant. Of five *C. guilliermondii* isolates, one was dose-dependently sensitive to fluconazole and all were dose-dependently susceptible to itraconazole. Candidemia incidence was higher (46.9%) among patients aged 60 years and older, as well as in critical groups, including those admitted to intensive care units (40.6%) or on hemodialysis (21.9%). Three patients acquired bloodstream infection related to central venous catheters. Of the 32 patients, 47% died. Multivariate analysis revealed an association between the higher number of deaths among patients with *C. albicans* bloodstream infection than among those infected with non-*C. albicans* *Candida* species ($p \leq 0.05$). The study revealed an emergence of non-*C. albicans* *Candida* species—particularly the *C. parapsilosis* complex, *C. guilliermondii*, and *C. glabrata*—as agents of candidemia in the hospital investigated. PCR-RFLP proved useful in differentiating species of the *C. parapsilosis* complex.

Key words: candidemia, *Candida* sp, *Candida parapsilosis* complex, antifungal susceptibility.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número e porcentagem dos agentes de candidemia, HU/UFMS – 2010 a 2012 (n=32).....	42
Tabela 2 -	Perfil de suscetibilidade aos antifúngicos de <i>Candida</i> spp isoladas de hemoculturas de pacientes internados, HU/UFMS - 2010 a 2012 (n=32).....	44
Tabela 3 -	Número e porcentagem de pacientes com candidemia segundo variáveis de estudo, HU/UFMS – 2010 a 2012 (n=32).....	45
Tabela 4 -	Número e porcentagem de pacientes com candidemia segundo aspectos clínicos, HU/UFMS – 2010 a 2012 (n=32).....	46
Tabela 5 -	Número e porcentagem de pacientes segundo procedimentos de risco a que foram submetidos, HU/UFMS – 2010 a 2012 (n=32).....	47
Tabela 6 -	Número e porcentagem de pacientes segundo variáveis de estudo e evolução clínica, HU/UFMS – 2010 a 2012 (n=32).....	48
Tabela 7 -	Número e porcentagem de pacientes segundo aspectos clínicos e evolução clínica, HU/UFMS – 2010 a 2012 (n=32).....	49
Tabela 8 -	Número e porcentagem de pacientes segundo condições associadas à ocorrência de candidemia e evolução clínica, HU/UFMS – 2010 a 2012 (n=32).....	50
Tabela 9 -	Razões de prevalência de óbitos em pacientes com candidemia, ajustadas pela análise multivariada, Campo Grande/MS – 2010 a 2012 (n=32).....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Desenho esquemático das diluições dos antifúngicos: anfotericina B, itraconazol e voriconazol, segundo o documento M27 A3, CLSI (2008).....	29
Figura 2 -	Desenho esquemático das diluições do antifúngico fluconazol, segundo o documento M27 A3, CLSI (2008).....	30
Figura 3 -	Desenho esquemático da distribuição dos antifúngicos diluídos nas microplacas, segundo o documento M27 A3, CLSI (2008).....	31
Figura 4 -	Desenho esquemático da distribuição do inóculo para o teste de microdiluição em caldo destinado a determinação da suscetibilidade de leveduras, segundo o documento M27 A3, CLSI (2008).....	33
Figura 5 -	Desenho esquemático da extração de DNA genômico das leveduras.....	36
Figura 6 -	Desenho esquemático da reação PCR – RFLP para <i>Candida</i> do complexo <i>Candida parapsilosis</i>	39
Figura 7 -	Gel de agarose a 2% mostrando os produtos de PCR-RFLP.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Anfotericina B
ASD	Ágar sabouraud dextrose
ATCC	American type culture collection
BHI	Brain infusion heart
CC	Controle de crescimento
CE	Controle de esterilidade
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and laboratory standards institute
CTI	Centro de terapia intensiva
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade ótima
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
FCZ	Fluconazol
HCl	Ácido clorídrico
HU/UFMS	Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
ICS	Infecção da corrente sanguínea
IAL – SP	Instituto Adolfo Lutz – São Paulo
ITZ	Itraconazol
MOPS	Ácido 3-morfolinopropano-1-sulfônico
PCR	Reação em cadeia da polimerase - <i>polymerase chain reaction</i>
RFLP	Polimorfismo dos fragmentos de restrição - <i>restriction fragment length polymorphism</i>
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute (Meio composto por aminoácidos e vitaminas)
SDD	Sensível dose dependente
TBE	Tampão tris-borato-EDTA

UFC	Unidade formadora de colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VCZ	Voriconazol

LISTA DE SÍMBOLOS

µg/mL	micrograma por mililitro
µL	microlitro
°C	graus Celsius
g	grama
h	hora
M	molar
mA	miliampere
mL	mililitro
mM	milimolar
pb	pares de bases
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotação por minuto
V	volt
®	marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Infecções de corrente sanguínea por <i>Candida</i>: epidemiologia e espécies envolvidas.....	17
2.2 Patogênese e aspectos clínicos.....	20
2.3 Diagnóstico laboratorial de candidemia e suscetibilidade <i>in vitro</i> aos antifúngicos.....	21
2.4 Tratamento e evolução.....	22
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo geral.....	25
3.2 Objetivos específicos.....	25
4 MATERIAL E CASUÍSTICA.....	26
4.1 Tipo de estudo.....	26
4.2 Sujeitos da pesquisa.....	26
4.3 Local e período.....	26
4.4 Pesquisas em laboratório.....	26
<u>4.4.1 Isolamento e identificação das leveduras.....</u>	<u>27</u>
<u>4.4.2 Teste de suscetibilidade <i>in vitro</i> aos antifúngicos.....</u>	<u>27</u>
4.4.2.1 Agentes antifúngicos.....	27
4.4.2.2 Preparo da solução estoque dos antifúngicos.....	28
4.4.2.3 Preparo das placas de microdiluição.....	28
4.4.2.4 Preparo do inóculo.....	32
4.4.2.5 Controle de qualidade.....	32
4.4.2.6 Leitura e interpretação dos resultados.....	34
<u>4.4.3 Testes moleculares.....</u>	<u>34</u>
4.4.3.1 Extração do DNA genômico.....	34
4.4.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismo dos Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP).....	37
4.4.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	37
4.4.3.4 Polimorfismo dos Fragmentos de Restrição (RFLP).....	38

4.5 Características epidemiológicas e clínicas.....	40
4.6 Análises de dados.....	40
4.7 Aspectos éticos.....	41
5 RESULTADOS.....	42
6 DISCUSSÃO.....	51
7 CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS.....	64
APÊNDICE A – FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS DO PRONTUÁRIO MÉDICO.....	74
APÊNDICE B – VALORES DE REFERÊNCIAS SEGUNDO CLSI (2008).....	76
APÊNDICE C – COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES.....	77
APÊNDICE D – RELAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	79
ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	80

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos 20 anos houve aumento significativo na incidência de infecções fúngicas sistêmicas causadas principalmente por leveduras do gênero *Candida* (CLEVELAND *et al.*, 2012; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; PFALLER *et al.*, 2011; SEGIREDY *et al.*, 2009).

Infecção invasiva por leveduras do gênero *Candida* representa um grave problema de saúde pública (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). *Candida albicans* é o principal agente de candidemia, porém, observa-se a emergência de outras espécies que não *Candida albicans* (HINRICHSSEN *et al.*, 2008; SAMAPAO CAMARGO *et al.*, 2010).

Nos Estados Unidos da América (EUA) a taxa de sepse devido à infecção fúngica aumentou em 207% durante o período 1979-2000 e mais de 50% dos casos das infecções de corrente sanguínea (ICS) foram causadas por *Candida albicans* (MARTIN *et al.*, 2003).

A candidemia é uma síndrome de alta gravidade associada à elevada mortalidade variando de 44,2% a 61% em diferentes casuísticas (BASSETTI *et al.*, 2011; CHANG *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2012; COLOMBO *et al.*, 2007; SAMPAIO CAMARGO *et al.*, 2010).

Infecções invasivas por *Candida* spp acometem principalmente pacientes em extremos de idade, em uso de antibióticos de largo espectro e submetidos a procedimentos invasivos como cateter venoso central, sonda vesical, ventilação mecânica e internados em unidade de terapia intensiva (CHANG *et al.*, 2008; FRANÇA *et al.*, 2008; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; KAUFFMAN, 2006; ORTEGA *et al.*, 2011).

A identificação das leveduras envolvidas ao nível de espécies é necessária para se conhecer a prevalência dos agentes envolvidos assim como monitorar, detectar resistência e contribuir para a escolha terapêutica mais adequada (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Dados da literatura têm mostrado distintos padrões de suscetibilidade frente aos antifúngicos, com maior porcentagem de resistência ao fluconazol, em especial os isolados provenientes dos EUA, comparados com países da América Latina (BORG-VON *et al.*, 2007; CHANG *et al.*, 2008; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003;

PFALLER; DIEKEMA, 2007). Sugere-se que a emergência das leveduras resistentes se deve, em parte, a falhas nas medidas de controle de infecção fúngica hospitalar e ao uso indiscriminado de agentes antifúngicos (EGGIMANN *et al.*, 2011).

Dada à relevância do assunto, a proposição deste estudo foi investigar a prevalência de candidemia diagnosticada laboratorialmente em pacientes atendidos em hospital público terciário de ensino situado na região Centro-Oeste do Brasil. Essa avaliação possibilitará uma vigilância contínua da infecção fúngica invasiva para monitorar a incidência de espécies emergentes e a detecção de resistência aos antifúngicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecções de corrente sanguínea por *Candida*: epidemiologia e espécies envolvidas

Leveduras do gênero *Candida* são micro-organismos unicelulares que se reproduzem por brotamento e produzem pseudo-hifas e hifas verdadeiras dependendo das condições de crescimento (LACAZ, 2002). São encontradas em variados ecossistemas, como solo, alimentos, água e fazem parte da microbiota de homens e animais (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Candida albicans é uma levedura que faz parte da microbiota normal dos seres humanos, esta espécie pode causar desde infecções superficiais em mucosas de indivíduos saudáveis, mas também é capaz de causar doença invasiva, particularmente quando o hospedeiro é debilitado ou imunossuprimido (DA MATTA *et al.*, 2010).

No ambiente hospitalar, infecções por *Candida* respondem por 80% de todas as infecções fúngicas, incluindo principalmente infecções de corrente sanguínea (ICS), do trato urinário e do sítio cirúrgico (COLOMBO *et al.*, 2012).

Candidíase hematogênica engloba ampla situação clínica, incluindo episódios isolados de candidemia até casos onde o fungo presente na corrente sanguínea dissemina-se para um ou vários órgãos do hospedeiro infectado (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; HINRICHSSEN *et al.*, 2005).

Em hospitais públicos terciários no Brasil, a incidência de candidemia é de cerca de 2,5 casos por mil admissões hospitalares (Colombo *et al.*, 2006), taxa esta considerada superior aos documentados nos hospitais da Europa e dos Estados Unidos (BASSETTI *et al.*, 2011; CLEVELAND *et al.*, 2012; DIEKEMA *et al.*, 2002; ODDS *et al.*, 2007).

De longa data, *Candida albicans* tem sido reconhecida como o patógeno mais comum de candidemia, porém, na última década outras espécies de *Candida* têm emergido (DIEKEMA *et al.*, 2012; GUIMARÃES *et al.*, 2012; NEUFELD *et al.*, 2009; ODDS *et al.*, 2007; ORTEGA *et al.*, 2011; SAMPAIO CAMARGO *et al.*, 2010). Estudos prévios mostram que nos últimos anos tem sido observada mudança na

epidemiologia das candidemias. As espécies de *Candida* mais estreitamente associados com candidemia e outros tipos de candidíase invasiva são diferentes na América Latina, na América do Norte e Europa (NUCCI *et al.*, 2010; ORTEGA *et al.*, 2011).

Estudo retrospectivo realizado por Chen *et al.* (2012), em um centro médico terciário em Taiwan entre 2006 a 2009 revelou que de um total de 447 episódios de candidemia, *Candida albicans* foi a mais frequentemente identificada (57,7%), seguida por *C. tropicalis* (15,0%), *C. parapsilosis* (13,0%) e *C. glabrata* (8,3%).

Outros estudos relatam que ao longo das últimas três décadas em hospitais dos EUA e Escócia houve redução na proporção de candidemia por *Candida albicans* e um aumento na proporção por *Candida glabrata*, que corresponde por cerca de um terço das candidemias hospitalares (DIEKEMA *et al.*, 2012; ODDS *et al.*, 2007). Em contraste com a maioria dos estudos de candidemia dos Estados Unidos, *Candida glabrata* representaram apenas 3% de todos os episódios de candidemia no Brasil, enquanto *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* são responsáveis por cerca de 40% de todos os isolados de *Candida* (CHANG *et al.*, 2008; COLOMBO *et al.*, 2007).

Estudo recente, realizado por Guimarães *et al.* (2012), com análise retrospectiva de 987 episódios de candidemia registrados em 14 hospitais terciários no Brasil, revelou que *Candida* não *Candida albicans* foram isoladas em 61% dos casos, as mais frequentes foram *Candida tropicalis* (24%) e *Candida parapsilosis* (21%) e *Candida glabrata* representou 7% dos casos.

Similar a *C. albicans*, *Candida* do complexo *C. parapsilosis* pode fazer parte da microbiota dos seres humanos. Faz se importante destacar que esta levedura é capaz de formar biofilme em soluções glicosiladas e aderir a materiais plásticos, tais como dispositivos intravasculares, materiais protéticos e as mãos de profissionais de saúde favorecendo infecções hospitalares (MEDRANO *et al.*, 2006; TROFA *et al.*, 2008). Embora *C. parapsilosis* seja considerada menos virulenta que *C. albicans*, essa espécie de *Candida* tem mostrado incidência crescente a partir de 1990 em todo o mundo (TROFA *et al.*, 2008).

Desde 2005 já está estabelecido que *Candida parapsilosis* é na verdade um complexo de três espécies distintas que são diferenciadas por testes de biologia molecular em *Candida parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*,

sendo a mais prevalente a *Candida parapsilosis* *stricto sensu*, seguida de *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (TAVANTI *et al.*, 2005).

Candida tropicalis é considerada agente oportunista em indivíduos neutropênicos, normalmente causa infecção quando há supressão da microbiota bacteriana pelo uso de antimicrobianos e danos na mucosa gastrointestinal (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Guimarães *et al.* (2012), mostram que candidemia por *Candida tropicalis* é mais comum entre os idosos. Em estudo realizado por Muñoz *et al.* (2011), revelaram que os pacientes idosos com câncer e submetidos a cirurgias abdominais foram mais propensos a desenvolver ICS por *C. tropicalis*.

Candida glabrata causam infecções superficiais e profundas em seres humanos e tem sido isolada na corrente sanguínea de pacientes com câncer, diabetes mellitus e infecção abdominal (LACAZ, 2002; SEGIREDDY *et al.*, 2009). Outro aspecto interessante sobre a epidemiologia deste patógeno é sua maior ocorrência em pacientes idosos (CHANG *et al.*, 2008; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; GARNACHO-MONTERO *et al.*, 2010).

De acordo com Klevaya *et al.* (2009), infecções de corrente sanguínea por *Candida glabrata* podem ocorrer em pacientes previamente expostos a terapia com triazóis como o fluconazol e voriconazol.

Candida guilliermondii, embora em menor proporção, também pode fazer parte da microbiota humana. Infecções associadas a esta levedura são incomuns, o que pode ser atribuído a sua baixa patogenicidade (PFALLER *et al.*, 2006). De acordo com estudo prévio, os fatores de risco para candidemia tenham sido semelhantes entre pacientes infectados por *C. guilliermondii* ou outras espécies de *Candida*, a mortalidade associada com *C. guilliermondii* foi significativamente menor (PASQUALOTO *et al.*, 2006). A maioria dos casos descritos relaciona-se a pacientes com câncer (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Candida krusei é naturalmente resistente ao fluconazol e talvez isso explique seu aumento em pacientes neutropênicos expostos a este antifúngico (ALMIRANTE *et al.*, 2011; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; ORTEGA *et al.*, 2011). A incidência de candidemia por *Candida krusei* costuma ser baixa e acomete especialmente pacientes imunocomprometidos (GARNACHO-MONTERO *et al.*, 2010; PASQUALOTO *et al.*, 2008).

Infecções hematogênicas por *Candida* spp acometem pacientes de ambos os sexos e mais frequentemente pacientes em extremos de idade tais como recém nascidos e com idade superior a 60 anos (CHANG *et al.*, 2008; ORTEGA *et al.*, 2011). Segundo Diekema *et al.* (2012), nas últimas décadas tem sido observado nos EUA redução nos casos de candidemia entre os pacientes oncológicos e aumento entre os pacientes cirúrgicos.

As principais condições facilitadoras para o desenvolvimento de infecções fúngicas invasivas associadas a pacientes com candidemia são uso de antibióticos de largo espectro, cateter venoso central, bloqueador do receptor de histamina tipo 2, nutrição parenteral, internação em unidade de terapia intensiva, sonda vesical, ventilação mecânica, neutropenia e colonização de vários sítios anatômicos por *Candida* (FRANÇA *et al.*, 2008; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; KAUFFMAN, 2006).

Pacientes que estão em unidade de terapia intensiva são suscetíveis a ter infecções hematogênicas por *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e em menor proporção *C. parapsilosis* e *C. krusei* (LACAZ, 2002).

Almirante *et al.* (2006), descreveram associação de infecção de corrente sanguínea por *C. parapsilosis* e nutrição parenteral por meio de cateter venoso central.

2.2 Patogênese e aspectos clínicos

De acordo com dados da literatura a maioria dos casos de candidemia é precedida por colonização pelo mesmo agente (COLOMBO *et al.*, 2012). O acesso à corrente sanguínea pode ocorrer via endógena por meio de translocação intestinal, local onde há rica colonização por *Candida* spp. em até 70% da população normal (COLOMBO *et al.*, 2012; HINRICHSEN *et al.*, 2005). O desequilíbrio da microbiota normal ou lesão da mucosa gastrointestinal pode ser um agente facilitador de translocação de *Candida* spp até a corrente sanguínea (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Infecções hematogênicas por *Candida* spp podem ainda ser adquiridas por via exógena, por meio de contato com indivíduos colonizados, contaminação de procedimentos médicos invasivos como cateter venoso central, implante de

próteses/drenos e soluções parenterais contaminadas (HINRICHSSEN *et al.*, 2005; PFALLER, 1996).

Não há dados clínicos ou laboratoriais que permitam ao profissional da saúde identificar com segurança, o momento da invasão fúngica na corrente sanguínea, quais episódios serão apenas transitórios e quais acarretarão quadros de candidemia disseminada (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; NUCCI; COLOMBO, 2012).

A candidemia quase sempre está associada a um quadro febril que pode ter início insidioso ou apresentar-se de forma súbita, acompanhada de calafrios, mialgia, taquicardia e hipotensão. Em alguns casos pode ocorrer disseminação da infecção para múltiplos órgãos e o paciente evoluir para o óbito. O aparecimento de lesões cutâneas pode ser a primeira manifestação de doença invasiva ou um marcador de disseminação da doença. Daí a importância do reconhecimento precoce das lesões e o seu diagnóstico (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

2.3 Diagnóstico laboratorial de candidemia e suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos

O hemocultivo é a principal forma de diagnóstico laboratorial de infecção de corrente sanguínea, entretanto, possui baixa sensibilidade (ELLEPOLA; MORRISON, 2005; KAUFFMAN, 2006).

Novas técnicas de laboratório podem contribuir para o diagnóstico precoce e o tratamento (EGGIMANN *et al.*, 2011; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). O teste da 1-3 beta-D-glucana tem sido considerado útil para iniciar o tratamento de pacientes colonizados por *Candida* com risco de desenvolver candidemia (POSTERARO *et al.*, 2011).

O desenvolvimento e o aperfeiçoamento das técnicas de biologia molecular tem-se mostrado uma estratégia clinicamente viável nos casos de infecções invasivas, sendo a (Reação em Cadeia da Polimerase) PCR a técnica mais utilizada para identificação rápida de diferentes espécies de *Candida*. De acordo com estudo realizado por Moreira-Oliveira *et al.* (2005), a sensibilidade e especificidade da PCR

em comparação com a hemocultura, considerada padrão-ouro, foram de 72,1% e 91,2% respectivamente.

Entretanto, para o diagnóstico em laboratório de rotina, a PCR ainda não mostra razão positiva entre custo e eficácia em comparação aos métodos clássicos (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Candida albicans é naturalmente sensível a todas as drogas antifúngicas de uso sistêmico, mas casos de resistências adquiridas aos azólicos são conhecidos em pacientes que foram expostos por tempo prolongado a estes medicamentos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; DEMITTO *et al.*, 2012; SAMPAIO CAMARGO *et al.*, 2010).

Entre todas as espécies de *Candida*, resistência antifúngica é considerado evento raro (ANTUNES *et al.*, 2004; COLOMBO *et al.*, 2006; MARTINÉZ *et al.*, 2006). *Candida krusei*, por sua vez, é intrinsecamente resistente ao fluconazol, mas pode mostrar falsa sensibilidade no teste *in vitro*. Por essa razão, todos os cuidados devem ser tomados para evitar a liberação desses resultados (MOTTA *et al.*, 2010).

Candida glabrata costuma apresentar sensibilidade *in vitro* reduzida tanto a anfotericina B quanto ao fluconazol (DÉRY; HASBUN, 2011; EGGIMANN *et al.*, 2011; KLEVAY *et al.*, 2009; MOTTA *et al.*, 2010; PAPPAS *et al.*, 2009).

2.4 Tratamento e evolução

Em razão da alta ocorrência de candidemia em pacientes hospitalizados faz-se necessário o tratamento imediato, eficaz e seguro de modo a diminuir o índice de mortalidade (DEMITTO *et al.*, 2012; MIMICA *et al.*, 2009; NUCCI; COLOMBO, 2012). De acordo com KAUFFMAN (2006) nos EUA, o fluconazol é o antifúngico de primeira escolha para o tratamento de candidemia causada por *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*.

Segundo, o Consenso Brasileiro de infecções por *Candida*, os fármacos de escolha para o tratamento de candidíase invasiva são: anfotericina B e suas formulações, fluconazol, voriconazol e equinocandinas (COLOMBO *et al.*, 2012).

A anfotericina B é uma droga fungicida e de rápida atuação contra as diferentes espécies de *Candida*, sendo muito rara a ocorrência de resistência

secundária (GÓMEZ *et al.*, 2010; TAPIA *et al.*, 2003). Estudos prévios sugerem que a CIM de anfotericina B para *Candida glabrata* e *Candida krusei* são mais elevadas, sendo necessário o uso de doses maiores desse poliênico (COLOMBO *et al.*, 2012).

A profilaxia medicamentosa com uso de fluconazol tem sido utilizada para prevenir infecções fúngicas em recém-nascidos de alto risco, pacientes neutropênicos, indivíduos com infecção pelo HIV, transplantados e pacientes em unidades de terapia intensiva, entre outros. No entanto, de acordo com alguns relatos, esta exposição prévia ao fluconazol pode gerar resistência, reduzindo ainda mais as opções de tratamento medicamentoso (DÉRY; HASBUN, 2011; EGGIMANN *et al.*, 2011; PASQUALOTO *et al.*, 2008).

Apesar do fluconazol ser mais frequentemente administrado do que a anfotericina B, existem opiniões conflitantes sobre o uso deste fármaco, pois pode ocorrer a emergência de micro-organismos resistentes e contribuir com a mudança na distribuição das espécies de *Candida* causadoras de candidemia (DÉRY; HASBUN, 2011; EGGIMANN *et al.*, 2011; KLEVAY *et al.*, 2009; TROFA *et al.*, 2008). Pasqualoto *et al.* (2008), observaram associação entre o aumento do uso de fluconazol e a incidência elevada de candidemia por *Candida glabrata* em um hospital universitário localizado no Sul do Brasil.

O voriconazol é um fármaco com grande atividade antifúngica contra a maioria dos fungos causadores de micoses sistêmicas como *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* e outros fungos filamentosos (COLOMBO *et al.*, 2012; QUINDÓS *et al.*, 2007). De acordo com estudos prévios, o voriconazol é mais ativo no tratamento de candidíase hematogênica causada por todas as espécies de *Candida*, incluindo *Candida glabrata* e *Candida krusei* que são resistentes ao fluconazol e itraconazol (KAUFFMAN, 2006; LUMBRERAS *et al.*, 2003).

As equinocandinas têm emergido como uma nova opção terapêutica representada por caspofungina, micafungina e anidulafungina. Têm ampla ação contra a maioria das espécies de *Candida* e estão associadas à baixa ocorrência de efeitos adversos (COLOMBO *et al.*, 2012; CÓRTEZ *et al.*, 2011; MARTINÉZ, 2006).

A candidemia invasiva agrava o quadro clínico e piora o prognóstico de pacientes críticos (FRANÇA *et al.*, 2008; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). Estudo retrospectivo realizado em um centro médico terciário em Taiwan entre 2006 a 2009 relevou que 48,2%, dos pacientes com candidemia evoluíram a óbito e não foi

observada diferença significativa entre *Candida albicans* e *Candida* não *Candida albicans* (CHEN *et al.*, 2012).

Em estudo descrito por Klevay *et al.* (2009) nos EUA, entre os pacientes com infecções de corrente sanguínea por *Candida glabrata* e *Candida albicans* não houve diferença significativa na mortalidade.

Segundo Kauffman (2006), uma forma de verificar a eficácia do tratamento do paciente com candidemia é o monitoramento de hemocultivos, com manutenção da terapêutica medicamentosa por duas semanas após a data da primeira hemocultura negativa.

Dada à relevância do tema, se propôs no presente estudo, verificar a distribuição das espécies de *Candida* responsáveis por candidemia e correlacionar com o desfecho clínico do paciente de modo a colaborar com estratégias de controle de infecção invasiva por *Candida* na instituição hospitalar estudada.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Proceder à caracterização de *Candida* spp isoladas de hemocultivo e avaliar aspectos clínicos de candidemia em pacientes atendidos em hospital público terciário de Mato Grosso do Sul.

3.2 Objetivos específicos

- Estimar a prevalência de candidemia identificada laboratorialmente em pacientes atendidos em hospital público de Mato Grosso do Sul no período de março de 2010 a março de 2012.
- Identificar os agentes de candidemia e realizar a diferenciação molecular de leveduras do complexo *Candida parapsilosis*.
- Determinar o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos de *Candida* spp isolados de hemocultura.
- Descrever as características demográficas e clínicas dos pacientes com candidemia e correlacionar com a evolução clínica.

4 MATERIAL E CASUÍSTICA

4.1 Tipo de estudo

Pesquisa descritiva, transversal e observacional.

4.2 Sujeitos da pesquisa

A população de estudo constitui-se de 32 pacientes com quadro clínico de infecção de corrente sanguínea e que tiveram pelo menos uma amostra de hemocultura positiva para *Candida* spp.

Na presente investigação foi considerada uma única amostra por paciente.

4.3 Local e período

O estudo foi realizado com pacientes atendidos no período de março de 2010 a março de 2012 no Hospital Universitário “Maria Aparecida Pedrossian” da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HU/UFMS), Campo Grande – MS.

O HU/UFMS é um hospital terciário com 256 leitos ativos de referência em diagnóstico e tratamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias que presta assistência em diferentes especialidades médicas pelo Sistema Único de Saúde.

4.4 Pesquisas em laboratório

As hemoculturas foram realizadas a pedido médico para fins de diagnóstico.

Os dados de exames laboratoriais foram obtidos no Laboratório de Micologia do HU/UFMS, responsável pela cultura e identificação de fungos no âmbito do Hospital Universitário.

Os demais procedimentos laboratoriais referentes a este estudo foram realizados no Laboratório de Pesquisas Microbiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

4.4.1 Isolamento e identificação das leveduras

A detecção das leveduras provenientes de hemoculturas foi feita por meio do Sistema automatizado BactAlert (Biomérieux, França) / Bactec (BD, USA) e a identificação por meio do Sistema automatizado Vitek 2 (Biomérieux, França). Os micro-organismos foram mantidos estocados em Caldo de Infusão de Cérebro e Coração (BHI) [Oxoid, Inglaterra], com glicerol a 15% em temperatura de -20°C até a realização dos testes propostos.

Quarenta e oito horas antes da realização dos testes as leveduras foram repicadas em Cromoagar (Difco, USA) para certificação da pureza das mesmas. Em seguida foi realizado repique em Agar Sabouraud Dextrose (ASD) [Oxoid, Inglaterra] para realização dos testes de suscetibilidade.

4.4.2 Teste de suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos

A concentração inibitória mínima das leveduras frente aos antifúngicos foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo padronizada pelo documento M27-A3 do *Clinical And Laboratory Standards Institute* – CLSI (CLSI, 2008).

4.4.2.1 Agentes antifúngicos

A atividade antimicrobiana *in vitro* foi avaliada frente aos antifúngicos: anfotericina B (Sigma Aldrich, EUA), fluconazol (Sigma Aldrich, EUA), itraconazol (Sigma Aldrich, EUA) e voriconazol (Pfizer, EUA).

4.4.2.2 Preparo da solução estoque dos antifúngicos

Para se obter a concentração desejada da solução mãe (solução estoque para uso), o antifúngico foi pesado e calculada a sua potência, expressa em $\mu\text{g/mL}$. Após a pesagem os antifúngicos foram dissolvidos em solventes apropriados. O fluconazol foi dissolvido em água destilada, obtendo-se uma concentração de $5120 \mu\text{g/mL}$. Anfotericina B, itraconazol e voriconazol foram dissolvidos em Dimetilsulfóxido (DMSO) [Sigma, EUA] tendo uma concentração final de $1600 \mu\text{g/mL}$. A solução contendo os antifúngicos foram aliquotadas em tubo tipo ependorff e armazenadas no freezer a -20°C , até a preparação das placas de microdiluição.

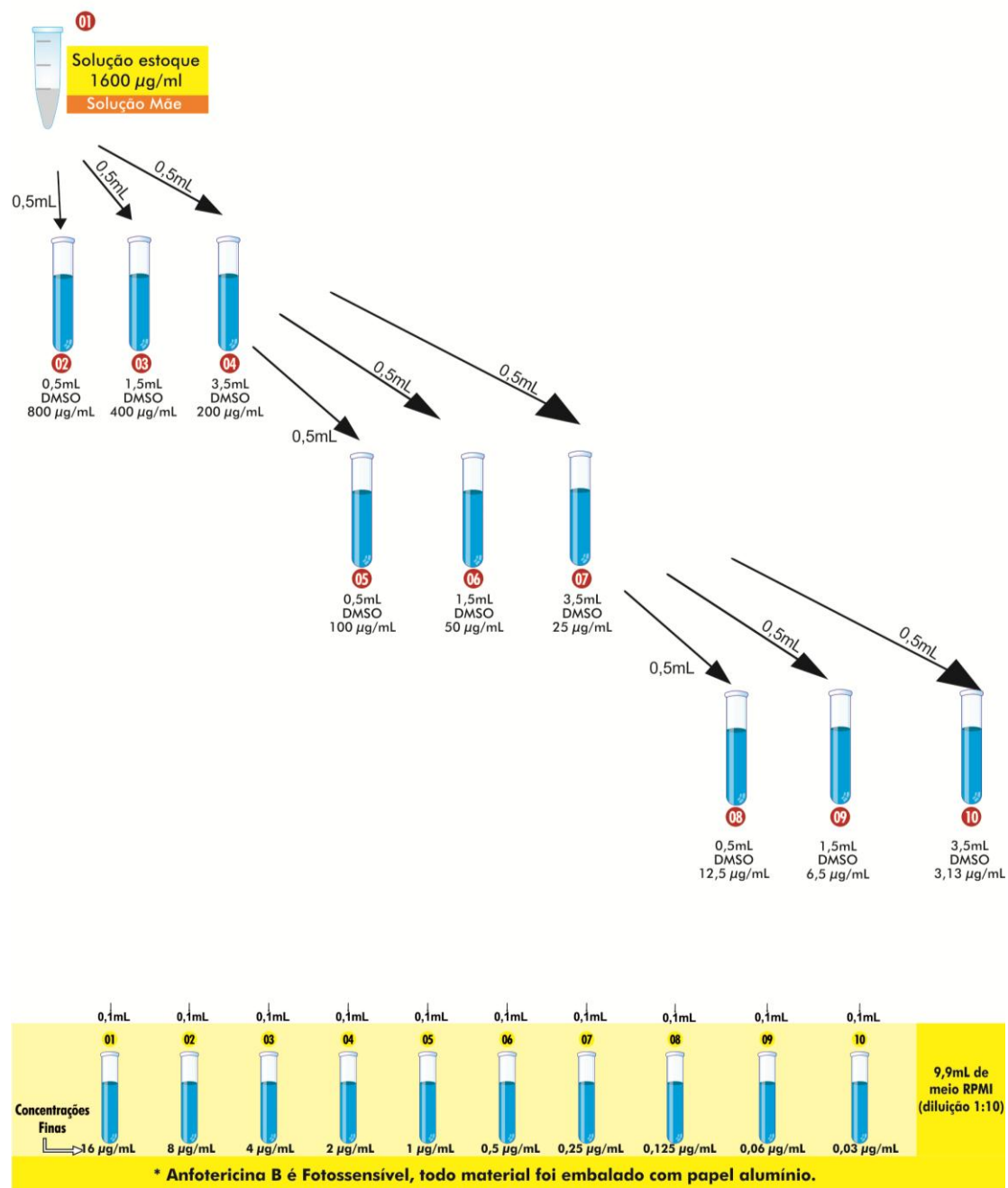
4.4.2.3 Preparo das placas de microdiluição

A partir da solução estoque (solução mãe) contendo anfotericina B, itraconazol e voriconazol foram realizadas sucessivas diluições com DMSO em nove tubos de ensaios (primeiras diluições). Para a segunda série diluições utilizaram-se dez tubos de ensaio contendo meio RPMI 1640 com glutamina, sem bicarbonato e antibiótico, pH 7, MOPS $0,165\text{mM}$ (Vitrocell, Brasil). Transferiu-se $0,1\text{mL}$ das primeiras diluições para os tubos contendo $9,9 \text{ mL}$ de meio RPMI, somente para o primeiro tubo pipetou-se $0,1\text{mL}$ da solução mãe. A concentração nesses tubos variou de $16 \mu\text{g/mL}$ a $0,03 \mu\text{g/mL}$. A Figura 1 ilustra um desenho esquemático de todo o processo de diluição realizada.

Para o fluconazol, a partir da solução mãe foram realizadas diluições com o meio RPMI 1640 em dez tubos de ensaios (primeiras diluições). Na segunda série de diluições transferiu-se $0,1\text{mL}$ da primeira diluição para outros dez tubos de

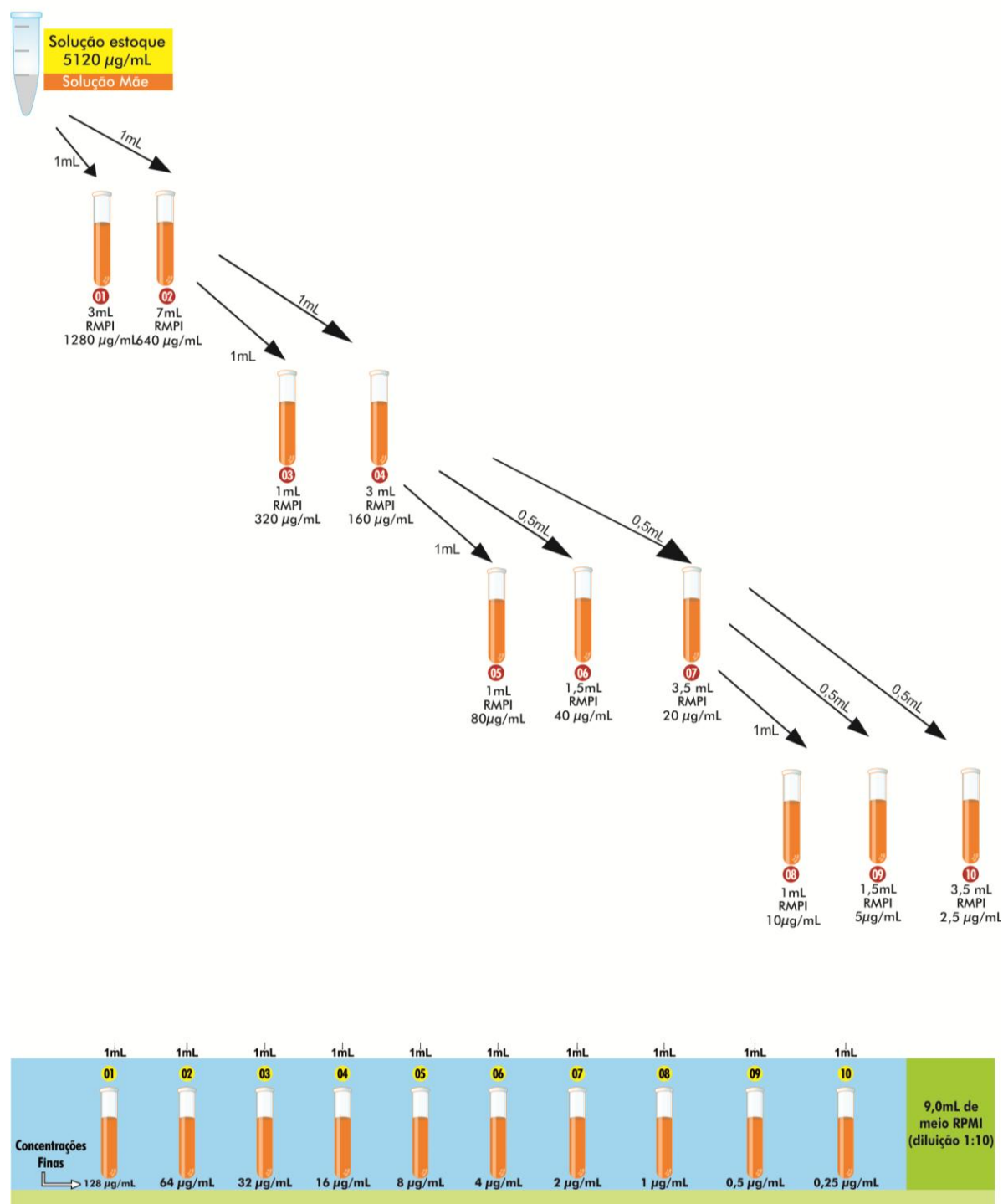
ensaios, contendo 9,0mL de meio RPMI, tendo uma concentração de 128 μ g/mL a 0,25 μ g/mL. A Figura 2 mostra o desenho esquemático destas diluições.

Figura 1 - Desenho esquemático das diluições dos antifúngicos: anfotericina B, itraconazol e voriconazol, segundo o documento M27 A3, CLSI (2008)



Fonte: Alencar, 2013

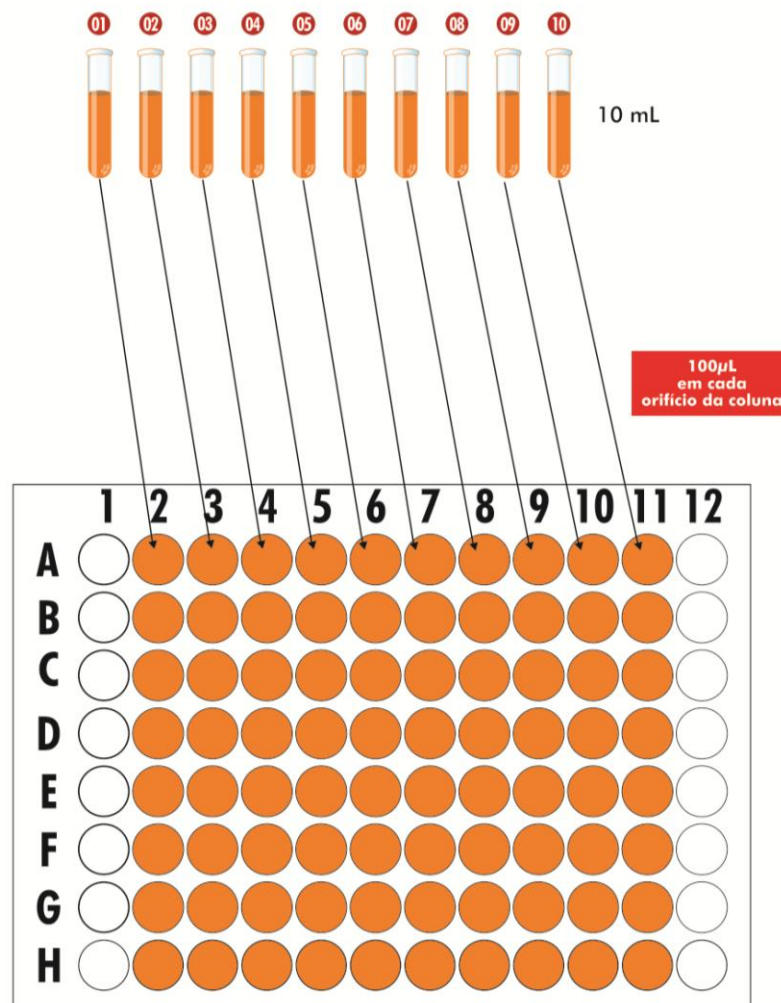
Figura 2 - Desenho esquemático das diluições do antifúngico fluconazol, segundo o documento M27 A3, CLSI (2008)



Fonte: Alencar, 2013

Os antifúngicos foram distribuídos em microplacas, pipetando-se 100µL das diluições, começando da menor concentração para a maior, dispensando os mesmos nos orifícios de numeração de *onze* a *dois* no sentido vertical, deixando vazio o orifício de numeração *doze* para o controle de crescimento (CC) e o orifício de numeração *um* para controle de esterilidade (CE). A Figura 3 ilustra a distribuição dos antifúngicos nas microplacas.

Figura 3 - Desenho esquemático da distribuição dos antifúngicos diluídos nas microplacas, segundo o documento M27 A3, CLSI (2008)



Anfotericina B é fotossensível, as placas foram embaladas com papel alumínio.

Após esse procedimento, as microplacas foram cobertas com parafilm® e armazenadas no freezer a -20°C por até seis meses. As microplacas de anfotericina B foram acondicionadas protegidas da luz, devido a sua fotosensibilidade.

4.4.2.4 Preparo do inóculo

A partir do crescimento em cultura de colônia pura em ASD incubado a 35°C por 24 horas, com auxílio de alça descartável estéril foram selecionadas de uma a cinco colônias e transferiu-se para um tubo contendo solução fisiológica estéril. A suspensão foi homogeneizada no vórtex e ajustada a turbidez com o tubo 0,5 na escala de McFarland que corresponde a 1×10^6 – 5×10^6 Unidade Formadora de colônia - UFC/mL. A Figura 4 ilustra a distribuição do inóculo.

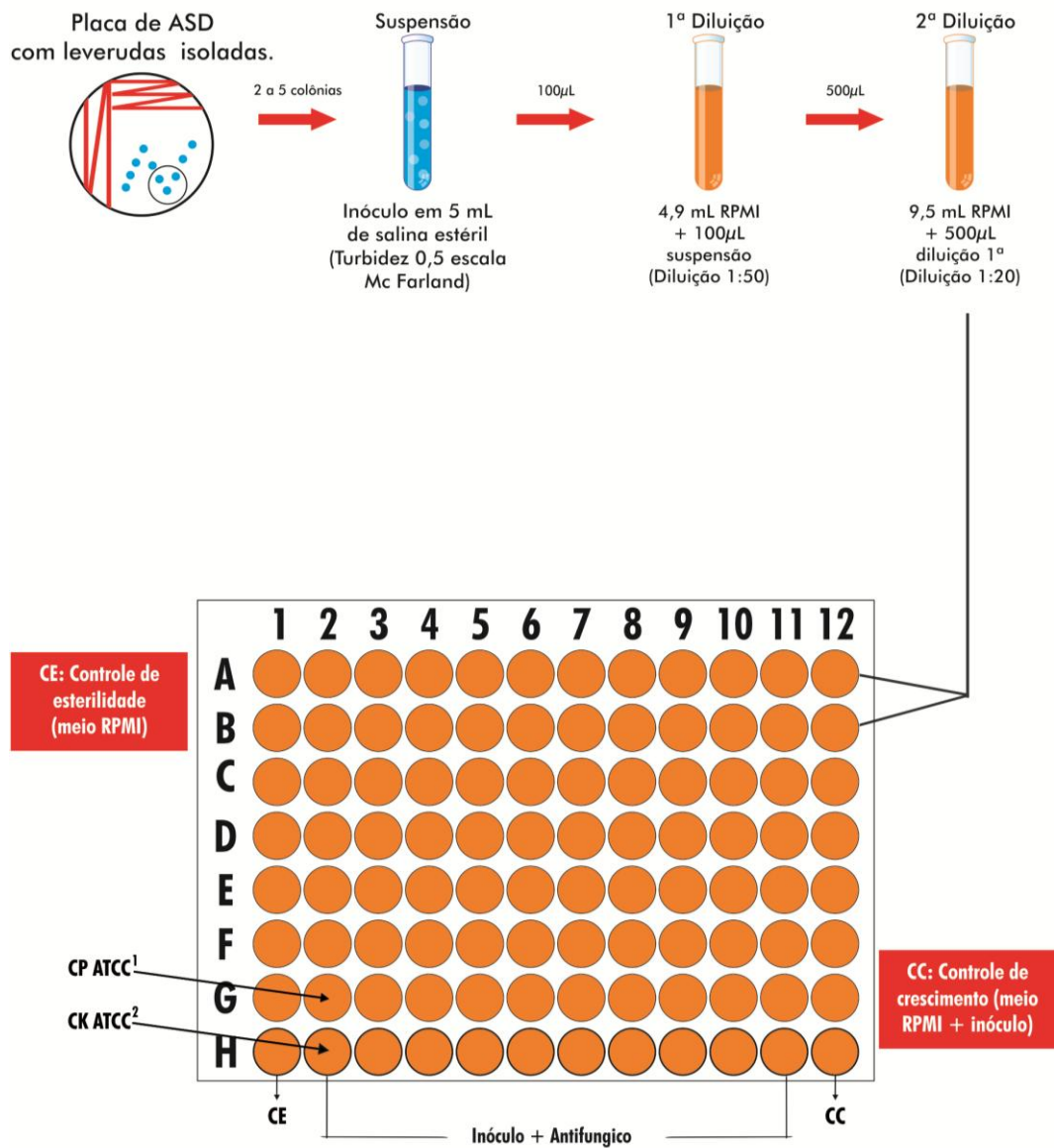
Dispensou 4,9 mL de meio RPMI no tubo de ensaio, pipetou 100µL do inóculo (diluição 1:50) com posterior agitação no vórtex. Transferiu-se 500µL do mesmo em outro tubo de ensaio contendo 9,5 mL de meio RPMI (diluição 1:20) agitado novamente no vórtex. A concentração final dessa suspensão correspondeu a $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

A suspensão das leveduras testadas foi distribuída nas linhas horizontais da microplaca. No orifício de número *um* foi adicionado somente meio RPMI e foi considerado como controle de esterilidade (CE). No orifício doze foi adicionado o meio RPMI juntamente com a suspensão das leveduras e foi considerado controle de crescimento (CC). Em seguida as microplacas foram incubadas por 48 horas a 35°C.

4.4.2.5 Controle de qualidade

Como controle de qualidade e reprodutibilidade dos testes, foram incluídas cepas *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Essas cepas foram distribuídas nas duas últimas linhas. A Figura 4 ilustra a distribuição.

Figura 4 - Desenho esquemático da distribuição do inóculo para o teste de microdiluição em caldo, destinado a determinação da suscetibilidade de leveduras, segundo o documento M27 A3, CLSI (2008)



¹cepa de controle de qualidade *Candida parapsilosis* ATCC 22019

²cepa de controle de qualidade *Candida krusei* ATCC 6258

Fonte: Alencar, 2013

4.4.2.6 Leitura e interpretação dos resultados

A leitura da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada após 24h de incubação para fluconazol/voriconazol de acordo com CLSI - M27 S4 (2012) e 48h para anfotericina B/itraconazol conforme o CLSI - M27 S3 (2008). A presença ou ausência de crescimento das leveduras em cada orifício da placa foi avaliada por meio de leitura visual, a partir do orifício de maior número para o de menor número.

Para a interpretação dos resultados baseada na leitura visual estabeleceu-se a seguinte pontuação (escore).

- 0= opticamente claro
- 1= crescimento indefinido
- 2= redução proeminente de crescimento
- 3= ligeira redução do crescimento
- 4= nenhuma redução de crescimento

Para a anfotericina B, a concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada a menor concentração do antifúngico capaz de inibir totalmente (100%) o crescimento da levedura.

Para os azóis a concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada a menor concentração do antifúngico capaz de inibir parcialmente (50%) o crescimento da levedura.

Os pontos de corte (breakpoints) da CIM estabelecida pelo CLSI - M27-S3 (2008) e M27-S4 (2012) para as cepas de referência estão dispostos no apêndice B.

4.4.3 Testes moleculares

4.4.3.1 Extração do DNA genômico

A extração de DNA das leveduras foi realizada conforme previamente descrito por Sambrook *et al.* (1989) no Laboratório de Micologia do Instituto Adolfo Lutz –

(IAL-SP). A Figura 5 ilustra um desenho esquemático da extração de DNA genômico.

Inicialmente, os micro-organismos foram repicados em ASD e incubados a 30°C por até 48h. As colônias foram transferidas com o auxílio da alça descartável para um microtubo contendo 1mL de EDTA (Sigma, EUA) 50mM e em seguida centrifugada a 10.000 rpm por 12 minutos e o sobrenadante desprezado. Neste microtubo foi adicionado 200µL de EDTA 50mM e 30µL da enzima *Trichoderma harzianum* (Sigma, EUA) com posterior agitação no vórtex. Em seguida, o microtubo foi incubado em banho maria a 37°C por 1h.

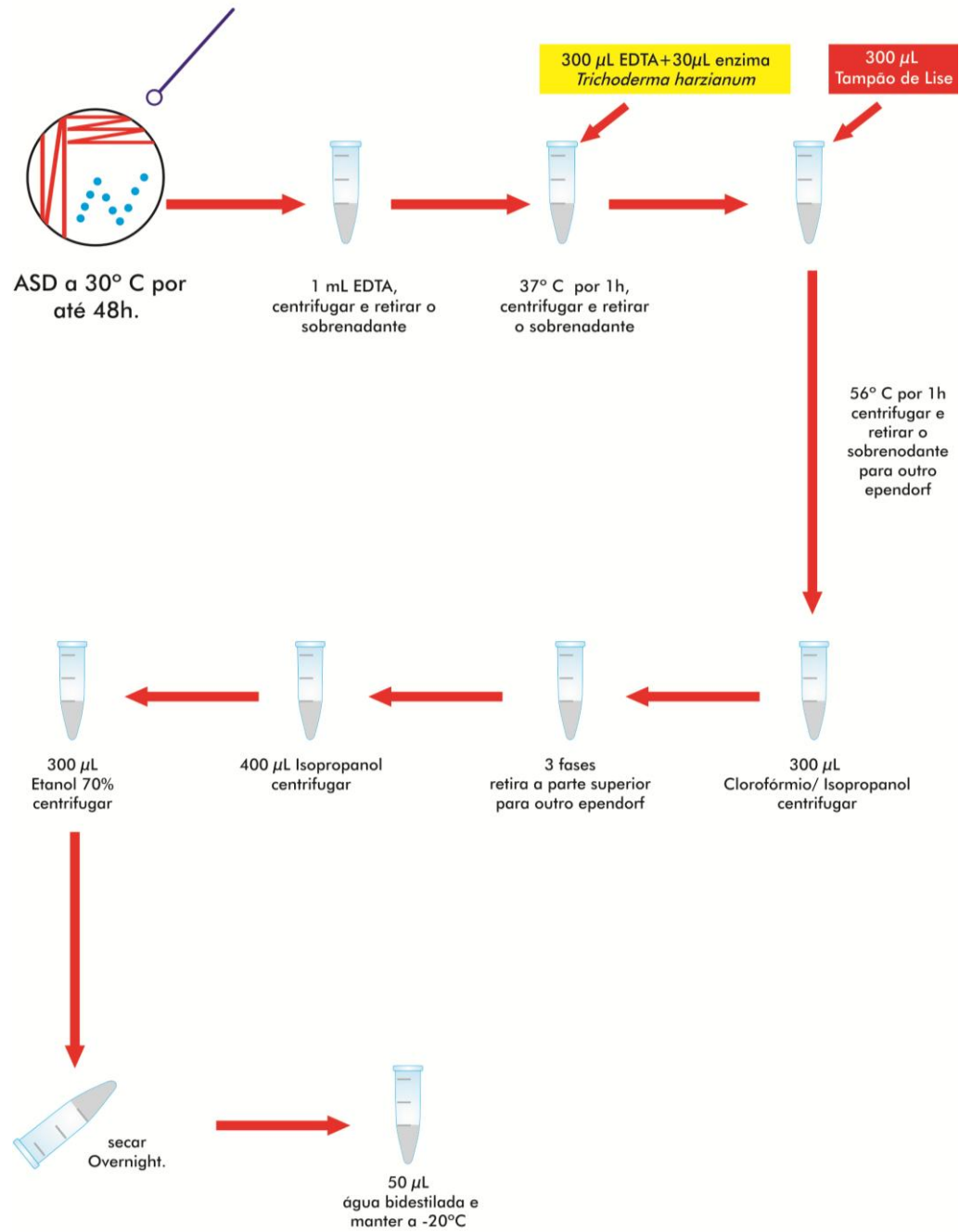
Após este período, foi centrifugado e o sobrenadante desprezado. Na sequência adicionou-se 200µL de tampão de lise e incubou-se em banho maria a 56°C por 1h.

Após esse procedimento, a suspensão foi centrifugada e o sobrenadante removido para outro microtubo contendo 300µL de clorofórmio/isopropanol (24:1). Em seguida nova centrifugação foi realizada e a fase aquosa (parte superior) foi transferida para outro microtubo. A esse, adicionou-se 400µL de isopropanol (Synth, Brasil). Posteriormente, nova centrifugação e descarte da fase líquida. O precipitado foi lavado com 300µL de etanol (Sigma, EUA) a 70%. Após este processo a fase líquida foi descartada e o microtubo foi mantido aberto e enrolado no papel toalha para secar, “overnight” à temperatura ambiente.

No dia seguinte, o precipitado contendo DNA da levedura foi então suspenso com 50µL de água bidestilada estéril.

A quantificação de DNA foi medida no espectrofotômetro NANO DROP 1000, no Laboratório de Micologia do Instituto Adolfo Lutz – (IAL-SP). O grau de pureza das extrações foi determinado pela razão entre as leituras de densidade ótica (DO) de 260/ DO 280 que deveriam estar com valores entre 1,8 e 2,0.

Figura 5 – Desenho esquemático da extração de DNA genômico das leveduras



Fonte: Alencar, 2013

4.4.3.2 Reação em cadeia da polimerase – Polimorfismo dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP)

A diferenciação das espécies do complexo *Candida parapsilosis* (*Candida parapsilosis stricto sensu*, *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis*) foi realizada pela técnica de PCR-RFLP de acordo com Tavanti *et al.* (2005) e está ilustrada na Figura 6.

4.4.3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a realização da PCR, foi preparado um *mix* contendo 12,5µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega, EUA), 1µL do DNA extraído e 0,7µL do par de primers S1F: 5' GTTGATGCTGTTGGATTGT-3' e S1R: 5' CAATGCCAAATCTCCCAA-3' (Invitrogen, EUA), e água bidestilada estéril para atingir um volume final de 25 µL.

A amplificação foi realizada no termociclador (Progene, LongGene Scientific Instruments - Hangzhou/China) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 50°C por um minuto seguido de extensão a 72°C por um minuto e extensão final a 70°C por dez minutos.

Após o término da reação, o DNA amplificado foi mantido em freezer a -20°C até a realização da eletroforese.

Os produtos amplificados foram separados mediante eletroforese em gel de agarose (Promega, EUA) a 2% com TBE 1x (Apêndice C).

No gel agarose foi aplicado 3,5µL da reação da PCR e a corrida foi realizada a 100V e 400mA por 35 minutos. Ao término da corrida os géis foram corados por brometo de etídio por 20 minutos e observados no transiluminador de ultravioleta e fotografados para observação do DNA amplificado com aproximadamente 716 pb, correspondente ao complexo *Candida parapsilosis*.

4.4.3.4 Polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP)

Os produtos do PCR foram digeridos com enzima de restrição *BanI* (Fermentas, Lituânia) em tampão específico da enzima sob incubação a 37°C em banho maria por 2h. Resumidamente, preparou-se um *mix* contendo 5µL do produto da PCR, 2µL da enzima *BanI*, 2µL BSA (tampão que acompanha a enzima) e água bidestilada estéril com um volume final de 20µL.

Os fragmentos de DNA após digestão com *BanI* foram separados por eletroforese em gel de agarose (Promega, EUA) a 2% com TBE 1x (Apêndice C).

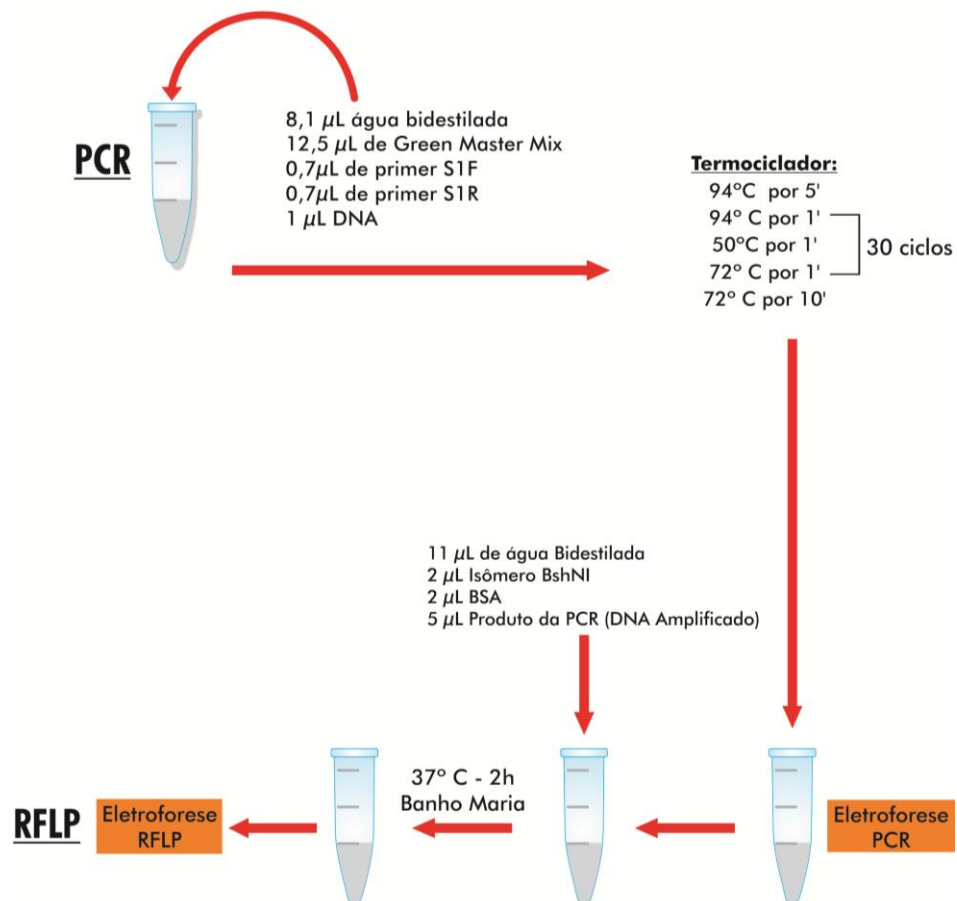
A corrida foi realizada a 100V e 400mA por 40 minutos. Em seguida o gel foi corado por brometo de etídio por 20 minutos. Os fragmentos foram observados no fotodocumentador sob luz ultravioleta. A interpretação dos fragmentos visualizados foi feita pela comparação com cepas padrões:

Candida parapsilosis stricto sensu – um sítio de restrição – duas bandas, uma com 521 pb e outra com 196 pb (ATCC 22019).

Candida orthopsilosis – nenhum sítio de restrição – uma banda em 716 pb (ATCC 96139).

Candida metapsilosis – três sítios de restrição – quatro bandas com 370, 188, 93, 60 pb (ATCC 96144).

Figura 6 – Desenho esquemático da reação PCR – RFLP para *Candida* do complexo *Candida parapsilosis*



Fonte: Alencar, 2013

4.5 Características epidemiológicas e clínicas

Os dados demográficos, epidemiológicos e clínicos foram coletados a partir de prontuários médicos. As informações foram registradas em um formulário apropriado (Apêndice A) e as variáveis estudadas foram:

- a) Dados demográficos: sexo e idade.
- b) Dados epidemiológicos: setor de internação, período de internação, espécie isolada.
- c) Condições clínicas: baseadas nos sinais e sintomas apresentados no momento do diagnóstico.
- d) Doença de base: diabetes mellitus, imunodeficiência pelo HIV, doença renal e outras.
- e) Comorbidades: doença cardíaca, doença pulmonar, hipertensão e outras.
- f) Procedimentos de risco clínico: internação em unidade de tratamento intensivo, plaquetopenia, ventilação mecânica, hemodiálise, cateter venoso central, nutrição parenteral total, sonda vesical, sonda nasogástrica/orogástrica/nasoenteral, hemodiálise, dreno, cirurgia abdominal, uso de antibióticos: carbapenêmicos, vancomicina e de cefalosporinas de 3ª ou 4ª geração, próteses, quimioterapia, uso de bloqueador do receptor de histamina tipo 2, omeprazol, uso de corticóide/imunossupressor.
- g) Terapia empírica ou terapêutica com antifúngico: uso de antifúngico anterior e após hemocultura positiva.
- h) Exames complementares: exames que poderiam demonstrar a relação entre a candidemia e as condições clínicas do paciente, tais como o hemograma, contagem de plaquetas e isolamento do fungo em outros sítios.

4.6 Análises de dados

Uma base de dados foi criada com informações demográficas e clínicas dos pacientes e relacionadas aos micro-organismos estudados. Os dados descritivos foram apresentados em representação tabular, constando de frequência absoluta e

relativa. Para verificar possíveis associações entre as variáveis de estudo foram utilizados os testes Qui-quadrado corrigido por Yates e Teste Exato de Fisher, e calculadas as razões de prevalência, com os respectivos intervalos de confiança de 95%. Para estimar as razões de prevalência ajustadas, foi utilizada a Regressão de Cox, utilizando as variáveis com significância $<$ que 20% e as que tinham relevância clínica-epidemiológica. Foram utilizados os Programas de computador BioEstat versão 5 e Epi Info 3.5.3 (AYRES *et al.*, 2007; CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION, 2011).

4.7 Aspectos éticos

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em pesquisa da UFMS (protocolo nº1591) conforme consta no Anexo A. O levantamento de dados epidemiológicos foi realizado a partir de prontuários médicos e não houve contato com pacientes.

5 RESULTADOS

No período de março de 2010 a março de 2012 foram processadas 6.879 hemoculturas no laboratório de Análises Clínicas do HU/UFMS. Destas, 48 (0,7%) provenientes de 32 pacientes, foram positivas para leveduras do gênero *Candida*.

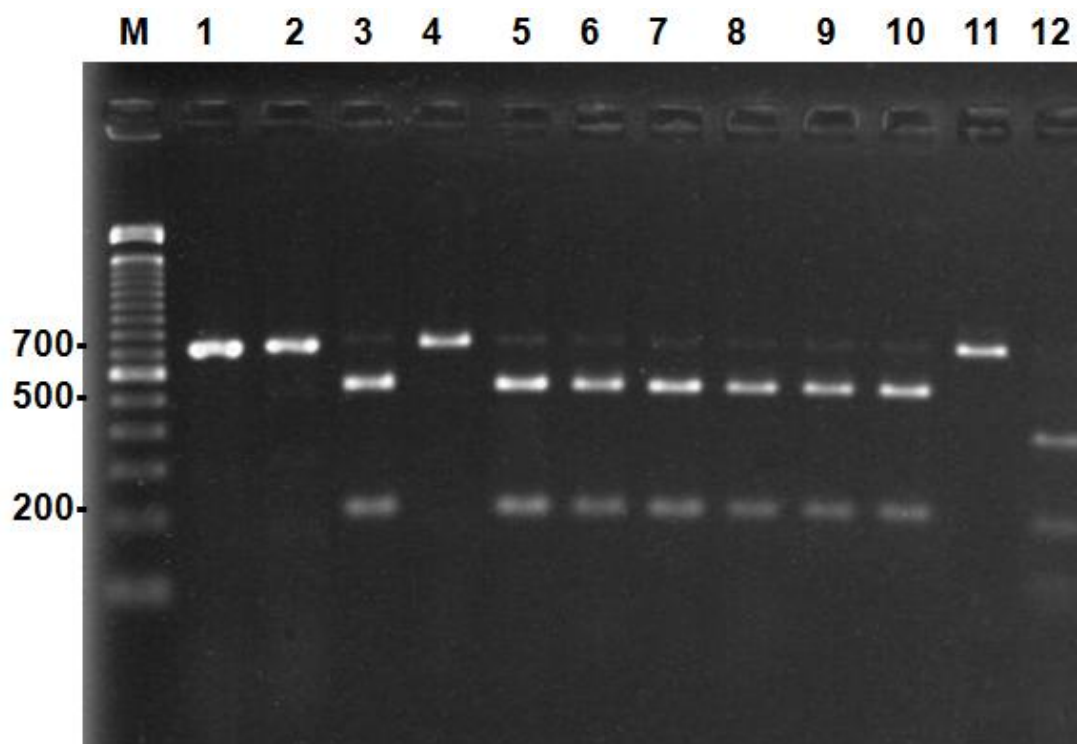
As espécies de *Candida* responsáveis por candidemia foram: 11 (34,4%) *Candida albicans*, 7 (21,9%) *Candida* do complexo *C. parapsilosis*, 5 (15,6%) *Candida guilliermondii*, igual número de isolados 4 (12,5%) *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e 1 (3,1%) *Candida krusei*. Juntas as espécies de *Candida* não *Candida albicans* representaram 65,6% (Tabela 1).

Tabela 1 - Número e porcentagem dos agentes de candidemia, HU/UFMS – 2010 a 2012 (n=32)

Espécies	Nº.	%
<i>Candida albicans</i>	11	34,4
<i>Candida</i> não <i>albicans</i>	21	65,6
<i>Candida parapsilosis</i>		
<i>Candida parapsilosis stricto sensu</i>	5	15,6
<i>Candida orthopsilosis</i>	2	6,3
<i>Candida guilliermondii</i>	5	15,6
<i>Candida glabrata</i>	4	12,5
<i>Candida tropicalis</i>	4	12,5
<i>Candida krusei</i>	1	3,1

A diferenciação das espécies do complexo *Candida parapsilosis* realizada pela técnica de PCR seguida de RFLP revelou que entre as sete *Candida parapsilosis* identificadas inicialmente pelo sistema automatizado VITEK2, cinco eram *Candida parapsilosis stricto sensu* e duas *Candida orthopsilosis*. A figura 7 ilustra os produtos da amplificação na técnica de PCR-RFLP.

Figura 7 - Gel de agarose a 2% mostrando os produtos de PCR-RFLP



M: marcador molecular de 100 pares de base; L: Linhas, L1 e L2: bandas representativas dos produtos de PCR do isolado clínico e cepa padrão, respectivamente; Linhas 3 a 9 – produtos da restrição com enzima BanI dos isolados clínicos: L3-03H₁/11, L4-80H₃/11, L5-189H₄/11, L6-117H₅/11, L7-07H₈/11, L8-72H₁₁/11, L9-45H₂/12 e Linhas 10 a 12: produtos de restrição com enzima BanI das cepas padrão: L10-*C. parapsilosis* ATCC 22019; L11-*C. orthopsilosis* ATCC 96139; L12-*C. metapsilosis* ATCC 96144, respectivamente.

Na tabela 2 observam-se os valores da concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos testados frente às diferentes espécies de *Candida* isoladas.

Todas *Candida albicans* e *Candida tropicalis* isoladas de hemocultura no HU/UFMS foram sensíveis aos antifúngicos testados: anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol.

Entre as sete leveduras do Complexo *Candida parapsilosis*, somente uma *Candida parapsilosis stricto sensu* foi resistente ao fluconazol (CIM 8,0 µg/mL).

Todas as quatro *Candida glabrata* isoladas mostraram resistência ao itraconazol e sensíveis dose dependente frente ao fluconazol.

Entre as cinco *Candida guilliermondii* isoladas, uma foi sensível dose dependente ao fluconazol e todas sensíveis dose dependente ao itraconazol.

Tabela 2 - Perfil de suscetibilidade aos antifúngicos de *Candida* spp isoladas de hemoculturas de pacientes internados, HU/UFMS - 2010 a 2012 (n=32)

Espécie	n	Antifúngico	Varição CIM (µg/ml)	Sensível N°. (%)	SDD N°. (%)	Resistência N°. (%)
<i>C. albicans</i>	11	Anfotericina B	0,25 – 0,5	11(100)	-	-
		Fluconazol	0,125 – 0,25	11(100)	-	-
		Itraconazol	0,03 – 0,06	11(100)	-	-
		Voriconazol	0,015	11(100)	-	-
<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>	5	Anfotericina B	0,5 – 1,0	5(100)	-	-
		Fluconazol	0,125 – 8,0	4(90)	-	1(10)
		Itraconazol	0,015 – 0,125	5(100)	-	-
		Voriconazol	0,015 – 0,06	5(100)	-	-
<i>C. orthopsilosis</i>	2	Anfotericina B	0,5	2(100)	-	-
		Fluconazol	0,125 – 0,25	2 (100)	-	-
		Itraconazol	0,06 – 0,125	2(100)	-	-
		Voriconazol	0,015	2(100)	-	-
<i>C. tropicalis</i>	4	Anfotericina B	0,5 – 1,0	4(100)	-	-
		Fluconazol	0,125 – 0,25	4(100)	-	-
		Itraconazol	0,03 – 0,06	4(100)	-	-
		Voriconazol	0,015	4(100)	-	-
<i>C. glabrata</i>	4	Anfotericina B	0,5 – 1,0	4(100)	-	-
		Fluconazol	4,0 – 8,0	-	4(100)	-
		Itraconazol	1,0	-	-	4(100)
		Voriconazol	0,125	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	5	Anfotericina B	0,25 – 1,0	5(100)	-	-
		Fluconazol	0,5 – 4,0	4(90)	1(10)	-
		Itraconazol	0,25 – 0,5	-	5(100)	-
		Voriconazol	0,015 – 0,06	5(100)	-	-
<i>C. krusei</i>	1	Anfotericina B	1	1(100)	-	-
		¹ Fluconazol	8,0	-	-	-
		Itraconazol	0,5	-	1(100)	-
		Voriconazol	0,06	1(100)	-	-

¹As espécies de *C. krusei* são intrinsecamente resistentes *in vivo* ao fluconazol, independente da CIM. A Interpretação da CIM para anfotericina B e itraconazol foi baseada nas recomendações da CLSI - M27 S3, (2008) e para fluconazol e voriconazol no documento M27 S4 (2012). SDD – Sensível dose dependente. CIM – Concentração inibitória mínima. SDD – Sensível dose dependente.

Do total de 32 pacientes com diagnóstico laboratorial de candidemia, 17 (53,1%) eram do sexo masculino e 15 (46,9%) do sexo feminino (Tabela 3).

A idade dos pacientes variou de 1 dia a 93 anos com média de 65 anos. Entre todos, cinco eram crianças sendo três neonatos com média de idade de 25 dias. Dois de três recém-nascidos eram prematuros um pesava 495g e o outro 700g.

Os pacientes estavam internados nos seguintes setores: nove (28,1%) no CTI Adulto, quatro (12,9%) na Clínica Cirúrgica, dois (6,3%) no CTI Pediátrico, UTI

Neonatal, Clínica Médica, Unidade Coronariana e Pronto Atendimento Médico, um (3,2%) no Berçário e Doenças Infecciosas e Parasitárias. Sete (21,9%) pacientes estavam realizando tratamento hemodialítico no serviço de hemodiálise.

O tempo médio de internação entre os 17 pacientes que tiveram alta hospitalar foi de 50 dias e entre aqueles que foram a óbito de 19 dias. A letalidade geral foi de 46,9%. De acordo com o Teste Mann Whitney aplicado, a diferença entre o período de internação daqueles pacientes que tiveram alta hospitalar e os que foram a óbito foi considerada estatisticamente significativa ($p = 0,015$).

Tabela 3 - Número e porcentagem de pacientes com candidemia segundo variáveis de estudo, HU/UFMS – 2010 a 2012 (n=32)

Variáveis	Nº.	%
Faixa Etária		
De 1 a 25 dias	3	9,4
De 26 dias a menos de 1 ano	-	-
De 1 a 4 anos	2	6,2
De 5 a 20 anos	-	-
De 21 a 30 anos	3	9,4
De 31 a 40 anos	2	6,2
De 41 a 50 anos	4	12,5
De 51 a 60 anos	3	9,4
Acima de 60 anos	15	46,9
Sexo		
Masculino	17	53,1
Feminino	15	46,9
Setor de internação		
CTI Adulto	9	28,1
Unidade Renal ⁽¹⁾	7	22,0
Clínica Cirúrgica I	4	12,5
CTI Pediátrico	2	6,2
UTI Neonatal	2	6,2
Clínica Médica	2	6,2
Pronto Atendimento Médico	2	6,2
Unidade Coronariana	2	6,2
Berçário	1	3,2
DIP	1	3,2
Evolução Clínica		
Sobrevida	17	53,1
Óbito	15	46,9

⁽¹⁾ Os pacientes não estavam internados, a hemocultura foi positiva no dia em que realizavam hemodiálise. CTI - Centro de terapia intensiva. UTI – Unidade de terapia intensiva. DIP- Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Na tabela 4 estão elencadas as manifestações clínicas, doenças de bases e comorbidades apresentadas pelos pacientes que desenvolveram candidemia.

As principais manifestações clínicas destes na ocasião da coleta de sangue para hemocultura foram: hipotensão (16; 50%), febre e taquicardia (12; 37,5%). A maioria tinha mais de uma doença de base, com predomínio de doença renal crônica e diabetes. Dentre as comorbidades, hipertensão e doenças cardíacas foram as mais relatadas.

Tabela 4 - Número e porcentagem de pacientes com candidemia segundo aspectos clínicos, HU/UFMS – 2010 a 2012 (n=32)

Aspectos clínicos	Nº.	%
Manifestações Clínicas		
Hipotensão	16	50,0
Febre	12	37,5
Taquicardia	12	37,5
Infecção Urinária por <i>Candida</i>	4	12,5
Dispnéia	8	25,0
Candidíase Oral	6	18,8
Lesão de pele	5	15,6
Doença de base		
Doença Renal Crônica	13	40,6
Diabetes	12	37,5
Câncer	4	12,5
Prematuridade	3	9,4
AIDS	3	9,4
Comorbidade		
Hipertensão	17	53,1
Doença Cardíaca	16	50,0
Doença Pulmonar	4	12,5
Doença Neurológica	3	9,4
Doença Hepática	3	9,4
Doença Auto-Imune	2	6,3

Nota: cada paciente poderia apresentar um ou mais manifestações clínicas, doenças de base, comorbidades e outros sítios com *Candida*.

No mesmo período da hemocultura positiva, *Candida* spp foi isolada em cultura de outras espécimes clínicas, principalmente de urina 4 (12,5%) e 3 (9,4%) foram isoladas da cultura de ponta de cateter.

Dos pacientes que tiveram candidemia (32), nove apresentaram mais de uma hemocultura positiva para um mesmo agente. Em dois pacientes renais crônicos que

faziam hemodiálise a hemocultura foi positiva por período de quatro e nove meses, respectivamente.

Todos os pacientes com candidemia foram submetidos a algum tipo de procedimento de risco clínico, tais como: (30; 93,8%) uso de cateter venoso central, (23; 71,9%) sonda nasogástrica/orogástrica/nasoenteral, (20; 62,5%) sonda vesical de demora, (19; 59,4%) ventilação mecânica, (14; 43,8%) hemodiálise, (13; 40,6%) internação no CTI/UTI, (11; 34,4%) nutrição parenteral, (13; 40,6%) uso prévio de carbapenêmicos, (12; 37,5%) uso prévio de cefalosporinas de 3ª e 4ª geração e (11; 34,4%) uso prévio de vancomicina, entre outros (Tabela 5).

Dez (31,3%) pacientes realizaram cirurgia até 30 dias antes do episódio de candidemia. Entre essas, oito foram cirurgia abdominal, cinco cirurgias cardíacas, duas torácicas, duas biópsias e uma confecção de fístula.

Tabela 5 - Número e porcentagem de pacientes segundo procedimentos de risco a que foram submetidos, HU/UFMS – 2010 a 2012 (n=32)

Procedimentos de risco clínico	Nº.	%
Cateter Venoso Central	30	93,8
Sonda Nasogástrica/Sonda Orográfica/Sonda Nasoenteral	23	71,9
Sonda Vesical de Demora	20	62,5
Ventilação Mecânica	19	59,4
Omeprazol	18	56,3
Bloqueador do receptor de histamina tipo 2	16	50,0
Hemodiálise	14	43,8
Plaquetopenia	14	43,8
Internado CTI/UTI	13	40,6
Carbapenêmicos	13	40,6
Cefalosporinas 3ª e 4ª geração	12	37,5
Nutrição Parenteral Total	11	34,4
Vancomicina	11	34,4
Corticóide/Imunossupressor	11	34,4
Cirurgia até 30 dias da Hemocultura Positiva	10	31,3
Dreno	9	28,1
Cirurgia Abdominal	8	25,0

Nota: cada paciente poderia ter sido submetido a um ou mais procedimentos de risco.
CTI/UTI – Centro de Terapia Intensiva/Unidade de Terapia Intensiva.

Quanto ao tratamento antifúngico: 23/32 pacientes foram tratados após o diagnóstico laboratorial de candidemia, sendo o fluconazol 21(65,6%) o antifúngico de primeira escolha. Nove pacientes não receberam tratamento antifúngico. Entre esses, cinco pacientes foram a óbito no dia da coleta da hemocultura ou até três dias depois e quatro pacientes apresentaram quadro de candidemia transitória e receberam alta hospitalar.

Como pode ser constatado na tabela 6, não houve associação estatisticamente significativa entre a evolução clínica e as seguintes variáveis: idade, sexo, setor de internação. Entre os pacientes que evoluíram a óbito, em dez foi isolado *Candida albicans* e em cinco *Candida* não *Candida albicans*.

Também não houve associação estatisticamente significativa entre a evolução clínica e as doenças de base e comorbidades apresentadas pelos pacientes (Tabela 7).

Tabela 6 - Número e porcentagem de pacientes segundo variáveis de estudo e evolução clínica, HU/UFMS – 2010 a 2012 (n=32)

Variáveis	Evolução clínica				⁽¹⁾ <i>p</i>	⁽²⁾ RP (IC 95%)
	Óbito (n= 15)		Sobrevida (n = 17)			
	Nº	%	Nº	%		
Pacientes						
Crianças e idosos (acima de 60 anos)	12	60,0	8	40,0	⁽³⁾ 0,120	2,40 (0,85-6,81)
Adultos	3	25,0	9	75,0		
Sexo						
Feminino	8	53,3	7	46,7	⁽⁴⁾ 0,739	1,30 (0,62-2,71)
Masculino	7	41,2	10	58,8		
Setor de Internação						
CTI/UTI	8	61,5	5	38,5	⁽⁴⁾ 0,310	1,67 (0,81-3,46)
Outras Enfermarias	7	36,8	12	63,2		
Espécie						
<i>Candida albicans</i>	10	90,9	1	9,1	⁽⁴⁾ 0,001	3,82 (1,74-8,39)
<i>Candida</i> não <i>Candida albicans</i>	5	23,8	16	76,2		

⁽¹⁾ p ≤ 0,05 = diferença estatisticamente significativa.

⁽²⁾ RP (IC 95%) = razão de prevalência com intervalo de confiança de 95%.

⁽³⁾ Teste Exato de Fisher.

⁽⁴⁾ Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

Tabela 7 - Número e porcentagem de pacientes segundo aspectos clínicos e evolução clínica, HU/UFMS – 2010 a 2012 (n=32)

Aspectos Clínicos	Evolução clínica				⁽¹⁾ <i>p</i>	⁽²⁾ RP (95%)
	Óbito (n= 15)		Sobrevida (n = 17)			
	Nº	%	Nº	%		
Doença de Base						
AIDS	3	100,0	-	-	⁽³⁾ 0,091	2,42 (1,57 - 3,73)
Câncer	3	75,0	1	25,0	⁽³⁾ 0,319	1,75 (0,86 - 3,56)
Diabetes	5	41,7	7	58,3	⁽⁴⁾ 0,927	0,83 (0,37 - 1,85)
Doença Renal Crônica	5	38,5	8	61,5	⁽⁴⁾ 0,668	0,73 (0,33 - 1,64)
Prematuridade	1	33,3	2	66,7	⁽³⁾ 1,000	0,69 (0,13 - 3,57)
Comorbidade						
Doença Neurológica	2	66,7	1	33,3	⁽³⁾ 0,589	1,49 (0,61 - 3,64)
Doença Pulmonar	2	50,0	2	50,0	⁽³⁾ 1,000	1,08 (0,37- 3,10)
Hipertensão	7	41,2	10	58,8	⁽⁴⁾ 0,739	0,77 (0,37 - 1,62)
Doença Cardíaca	6	37,5	10	62,5	⁽⁴⁾ 0,478	0,67 (0,31 - 1,43)
Doença Hepática	-	-	3	100,0	⁽³⁾ 0,288	-
Doença Auto-Imune	-	-	1	100,0	⁽³⁾ 1,000	-

Nota: cada paciente poderia apresentar uma ou mais doenças de base ou comorbidades. ⁽¹⁾ p ≤ 0,05 = diferença estatisticamente significativa.

⁽²⁾ RP (IC 95%) = razão de prevalência de óbitos, com intervalo de confiança de 95%, entre os que tinham ou não a doença de base ou comorbidade.

⁽³⁾ Teste Exato de Fisher.

⁽⁴⁾ Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

Em relação aos procedimentos de risco clínico (Tabela 8), avaliados o uso prévio de corticóide/imunossupressor, bloqueador do receptor de histamina tipo 2, ventilação mecânica, uso de sonda nasogástrica/orogástrica/nasoenteral e sonda vesical foram associados à ocorrência de óbitos (p≤0,05).

Tabela 8 - Número e porcentagem de pacientes segundo condições associadas à ocorrência de candidemia e evolução clínica, HU/UFMS – 2010 a 2012 (n=32)

Procedimentos de risco clínico	Evolução clínica				⁽¹⁾ p	⁽²⁾ RP (IC 95%)
	Óbito (n= 15)		Sobrevida (n = 17)			
	Nº.	%	Nº.	%		
Corticóide/ Imunossupressor	8	72,7	3	27,3	⁽³⁾ 0,080	2,18 (1,08 - 4,42)
Bloqueadores H ₂	11	68,8	5	31,2	⁽³⁾ 0,033	2,75 (1,11 - 6,84)
Ventilação Mecânica	13	68,4	6	31,6	⁽³⁾ 0,009	4,45 (1,20 - 16,50)
Nutrição Parenteral Total	7	63,6	4	36,4	⁽³⁾ 0,316	1,67 (0,83 - 3,38)
SNG/SOG/SNE	15	65,2	8	34,8	⁽⁴⁾ 0,001	-
Cirurgia Abdominal	5	62,5	3	37,5	⁽⁴⁾ 0,423	1,50 (0,73 - 3,07)
Internado UTI/CTI	8	61,5	5	38,5	⁽³⁾ 0,310	1,67 (0,81-3,46)
Carbapenêmicos	8	61,5	5	38,5	⁽³⁾ 0,310	1,67 (0,81 - 3,46)
Sonda Vesical	13	65,0	7	35,0	⁽³⁾ 0,022	3,90 (1,06 - 14,39)
Omeprazol	10	55,6	8	44,4	⁽³⁾ 0,448	1,56 (0,69 - 3,52)
CEF 3ª e 4ª Geração	7	58,3	5	41,7	⁽³⁾ 0,522	1,46 (0,71 - 2,99)
Plaquetopenia	8	57,1	6	42,9	⁽³⁾ 0,503	1,47 (0,70 - 3,07)
Cateter Venoso Central	14	46,7	16	53,3	⁽⁴⁾ 1,000	0,93 (0,22 - 3,93)
Hemodiálise	6	42,9	8	57,1	⁽³⁾ 0,964	0,86 (0,40 - 1,83)
Cirurgia até 30 dias antes Hemocultura +	5	50,0	5	50,0	⁽⁴⁾ 1,000	1,10 (0,51- 3,93)
Dreno	4	44,4	5	55,6	⁽⁴⁾ 1,000	0,93 (0,40 - 2,17)
Vancomicina	3	27,3	8	72,7	⁽³⁾ 0,216	0,48 (0,17 - 1,34)

Nota: cada paciente poderia apresentar um ou mais condições associadas à ocorrência de candidemia.

SNG/SOG/SNE - Sonda Nasogástrica/Sonda Orogástrica/Sonda Nasoenteral.

CEF3ª e 4ª Geração– Cefalosporina de 3ª e 4ª Geração.

⁽¹⁾ p ≤ 0,05 = diferença estatisticamente significativa.

⁽²⁾ RP (IC 95%) = razão de prevalência de óbitos, com intervalo de confiança de 95%, entre os expostos ou não às condições associadas à ocorrência de candidemia.

⁽³⁾ Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

⁽⁴⁾ Teste Exato de Fisher.

Na tabela 9 estão demonstradas as razões de prevalência ajustadas.

Tabela 9 – Razões de prevalência de óbitos em pacientes com candidemia, ajustadas pela análise multivariada, HU/UFMS – 2010 a 2012 (n=32)

Variáveis	p	Razão de prevalência ajustada (RP)	IC 95% (RP)
<i>Candida albicans</i> versus <i>Candida</i> não <i>C. albicans</i>	0,045	2,92	1,02 - 8,37
Idosos e crianças versus adultos	0,244	2,44	0,54 – 1,10
Uso de Bloqueadores H ₂ versus não uso	0,295	2,01	0,54 – 7,47
Uso de Corticóide/ Imunossupressor versus não uso	0,466	1,52	0,49 – 4,74
Uso de sonda vesical versus não uso	0,471	1,85	0,34 – 10,05
Uso de ventilação mecânica versus não uso	0,529	1,72	0,31 – 9,41
Sexo feminino versus masculino	0,661	0,75	0,21 – 2,70

Nota: Regressão de Cox – se p ≤ 0,05 diferença estatisticamente significativa.

6 DISCUSSÃO

No HU da UFMS, no período de 2010 a 2012 foi registrado em média, 16 casos de candidemia ao ano. Comparado a estudo anterior realizado por Bonfietti *et al.* (2012) com dados da mesma instituição hospitalar, observa-se um aumento no número de casos candidemia (10 *versus* 16 ao ano). Acredita-se que esse aumento possa estar relacionado à complexidade dos procedimentos invasivos e ao aumento no número de pacientes imunologicamente debilitados (BASSETTI *et al.*, 2011).

Dados da literatura revelam que a epidemiologia da candidemia mudou ao longo das últimas três décadas. Estudos prévios têm mostrado emergência de *Candida* não *Candida albicans* como agentes de infecções sistêmicas em todas as partes do mundo, tanto em hospitais públicos quanto privados (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; PFALLER *et al.*, 2011; SIGIREDDY *et al.*, 2009).

Em hospitais dos Estados Unidos e Europa também tem sido descrito redução na proporção de *Candida albicans* e um aumento no número de espécies de *Candida* não *Candida albicans* associados à candidiase hematogênica (DIEKEMA *et al.*, 2012; PFALLER *et al.*, 2009; SIGIREDDY *et al.*, 2009).

Estudo prospectivo realizado em um Hospital Clínico de Barcelona por meio de um programa de vigilância em hemocultura por um período de 18 anos (1991 a 2008) revelou que apesar de *Candida albicans* ter sido a espécie mais comumente identificada (48%), as espécies de *Candida* não *Candida albicans* foram mais representativas (52%), incluindo *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* entre outras (ORTEGA *et al.*, 2011).

Em hospitais brasileiros, as espécies de *Candida* não *Candida albicans* também tem sido responsabilizadas por mais de 50% dos casos de infecção de corrente sanguínea (CHANG *et al.*, 2008; COLOMBO *et al.*, 2007; HINRICHSEN *et al.*, 2008; MOTTA *et al.*, 2010; SAMPAIO CAMARGO *et al.*, 2010).

Estudo prévio realizado em Campo Grande-MS, conduzido por Chang *et al.* (2008) com candidemia diagnosticada em um período de oito anos (1998 a 2006) no HU/UFMS já mostrava prevalência de espécies de *Candida* não *Candida albicans* (54,2%). Os resultados da presente pesquisa (Tabela 1) mostram continua elevação do número de casos por espécies *Candida* não *Candida albicans* (65,6%) como agente de candidemia no Mato Grosso do Sul, com predomínio de *Candida*

parapsilosis. Diferentemente de estudo realizado por Almeida *et al.* (2013), em Dourados, Mato Grosso do Sul, em um período de um ano, *Candida albicans* (66,6%) foi predominante, seguido de *Candida tropicalis* (33,4%).

Pesquisa multicêntrica realizado por Colombo *et al.* (2006) no período de 2003 a 2004 relatou que *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* eram entre as espécies de *Candida* não *Candida albicans* as mais isoladas no Brasil, em torno de 70%.

Desde 2005, *Candida parapsilosis* tem sido descrita como complexo *Candida parapsilosis* incluindo *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*. (TAVANTI *et al.*, 2005). A diferenciação dessas espécies tem sido feita por meio de métodos moleculares, restringindo assim a sua utilização no laboratório de rotina, que necessita de pessoal treinado e equipamentos de alto custo (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Em hospital terciário da Espanha, De Toro *et al.* (2011), descreveram a distribuição das espécies do complexo de *Candida parapsilosis* em 122 isolados do sangue e de outros sítios. *Candida parapsilosis stricto sensu* foi a mais isolada (91%), seguida por *Candida orthopsilosis* (8,2%) e (0,8%) *Candida metapsilosis*.

Os resultados obtidos na presente investigação (Figura 7) mostram também predomínio de *Candida parapsilosis stricto sensu*. Nenhuma *Candida metapsilosis* foi isolada como agente de candidemia. Esse dado está de acordo com estudo prévio que afirma que *C. metapsilosis* é agente incomum de infecção sistêmica, e tem sido mais isolada em amostra do trato respiratório e superfície da mucosa (SILVA *et al.*, 2009).

Interessante foi a observação de maior número de isolamentos de *C. guilliermondii* (15,6%) entre espécies de *Candida* não *C. albicans*. De acordo com estudos anteriores, *C. guilliermondii* é um agente incomum de candidemia (COLOMBO *et al.*, 2006; PASQUALOTTO *et al.*, 2006; PFALLER *et al.*, 2006).

Estudo realizado por Colombo *et al.* (2007), em São Paulo, revelou que em quatro hospitais estudados, somente em um foi registrada infecção de corrente sanguínea por *C. guilliermondii*. Pesquisa anterior desenvolvida por Bonfietti *et al.* (2012) com dados de 1998 a 2007 mostrou que candidemia por *C. guilliermondii* era considerada rara no HU da UFMS.

Estudo desenvolvido por Nucci e Colombo (2007), com 924 episódios de candidemia diagnosticadas em hospitais do sul, sudeste e região central do Brasil

mostrou que *Candida tropicalis* (20%) foi o segundo agente de candidemia. Até 2007, essa era também a segunda espécie de *Candida* não *C. albicans* mais isolada de hemocultivos no HU da UFMS (BONFIETTI *et al.*, 2012). A presente pesquisa mostra que *C. glabrata* está emergindo no Hospital Universitário estudado, pois foi isolada na mesma proporção do que *Candida tropicalis* (12,5%).

Em se tratando de *C. glabrata*, de acordo com Colombo *et al.* (2006), entre 2003 e 2004, a ocorrência de candidemia por essa espécie era pouco documentada nos hospitais brasileiros. Por outro lado, no mesmo período, nos EUA e Europa já se observava a emergência dessa levedura como um dos principais agente de infecção fúngica de corrente sanguínea (DIEKEMA *et al.*, 2012; PFALLER *et al.*, 2009; SEGIREDY *et al.*, 2009).

Similar a estudos prévios, o isolamento de *Candida krusei* em hemocultivos foi pouco frequente (FRANÇA *et al.*, 2008; HINRICHSEN *et al.*, 2008; PASQUALOTO *et al.*, 2008; PFALLER *et al.*, 2008). Esse dado é importante tendo em vista que *C. krusei* é intrinsecamente resistente ao fluconazol, antifúngico este bastante utilizado na prática médica.

O conhecimento do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos é recomendado, pois a resistência *in vitro* pode predizer falha terapêutica (PFALLER, 2012). As técnicas disponíveis para realização de testes de suscetibilidade aos antifúngicos incluem disco difusão (CLSI - M44 A2, 2009), E-test Pfaller (2012), microdiluição em caldo que pode ser realizada de forma manual, como a preconizada pelo CLSI - M27 A3 (2008) e por meio de sistema automatizado (PFALLER, 2012). As técnicas de microdiluição tem a vantagem de determinar a concentração inibitória mínima. Entre essas, as recomendadas são as do Comitê Internacional CLSI (2008) e EUCAST (2008).

Na presente investigação foi realizada a técnica de microdiluição (CLSI, 2008) utilizada na rotina do Laboratório de Pesquisas Microbiológicas da UFMS para monitorar a emergência de leveduras resistentes aos antifúngicos.

Similar a estudos de Bonfietti *et al.* (2012) e Motta *et al.* (2010) os resultados obtidos no teste *in vitro* mostram que a maioria das leveduras foram sensíveis aos antifúngicos testados (Tabela 2).

Embora ainda pouco descrita no Brasil a resistência aos antifúngicos representa um desafio terapêutico, especialmente entre as espécies de *Candida* não *Candida albicans* (COLOMBO *et al.*, 2006; COLOMBO *et al.*, 2007).

Acredita-se que a frequente utilização de fluconazol para tratar um paciente com candidemia persistente (por nove meses) pode ter favorecido o desenvolvimento de resistência a esse antifúngico observada em uma *Candida parapsilosis stricto sensu*, no presente estudo. Já está estabelecido que o uso extensivo deste farmaco está associado ao surgimento de leveduras resistentes (DÉRY; HASBUN, 2011).

Candida guilliermondii com suscetibilidade reduzida para diferentes classes de agentes antifúngicos tem sido pouco descrita. Estudo realizado por Pfaller *et al.* (2006) mostrou sensibilidade reduzida ao fluconazol (85%) corroborando com os resultados da presente investigação.

Embora o itraconazol não seja indicado para o tratamento de infecções fúngicas invasivas (Colombo *et al.* 2012), foi observado que todas as *C. guilliermondii* isoladas foram sensíveis dose dependente a esse antifúngico.

Já é bem conhecido na literatura que entre as espécies de *Candida*, *C. glabrata* costuma apresentar maior resistência aos antifúngicos e necessitam doses maiores de azólicos para possibilitar sucesso no tratamento terapêutico. (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

De acordo com Pappas *et al.* (2009), no teste de suscetibilidade *in vitro*, *Candida glabrata* se mostra sensível dose dependente ou resistente tanto para fluconazol como itraconazol. Na presente investigação, o perfil de resistência de *Candida glabrata* observado frente ao itraconazol foi superior o descrito (3/7) por França *et al.* (2008), em pacientes com candidemia no Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Essa levedura também pode ser resistente a outros antifúngicos. Estudo realizado no México por González *et al.* (2008), relataram resistência ao fluconazol, itraconazol e anfotericina B entre as espécies de *Candida glabrata*.

Candida krusei é intrinsecamente resistente ao fluconazol e tende a ser sensível dose dependente ao itraconazol (PAPPAS *et al.*, 2009). O laboratório de microbiologia deve ficar atento na interpretação do antifungigrama tendo em vista que, por vezes, *Candida krusei* pode mostrar halo de inibição de crescimento diante do fluconazol sugerindo falsa sensibilidade (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; MOTTA *et al.*, 2010).

Similar à maioria dos estudos sobre candidemia, na presente investigação (Tabela 3), não foi observada diferença estatisticamente significativa em relação ao

sexo dos pacientes (ALMIRANTE *et al.*, 2006; COLOMBO *et al.*, 2006; COLOMBO 2007 *et al.*, 2007; HORN *et al.*, 2009). Outros pesquisadores descreveram prevalência de 60% a 62% entre os pacientes do sexo masculino (FRANÇA *et al.*, 2008; HINRICHSEN *et al.*, 2008).

Dados da literatura mostram que pacientes em extremos de idades são mais suscetíveis a infecções por micro-organismos oportunistas como leveduras do gênero *Candida* (BASSETTI *et al.*, 2011; GUIMARÃES *et al.*, 2012; HORN *et al.*, 2009; SAMAPAI CAMARGO *et al.*, 2010). Corroborando com outros autores, a maioria dos pacientes que desenvolveram infecção de corrente sanguínea por *Candida* no Hospital Universitário de Mato Grosso do Sul tinha idade acima de 60 anos (ALMIRANTE *et al.*, 2005; COLOMBO *et al.*, 2006; FRANÇA *et al.*, 2008; GUIMARÃES *et al.*, 2012; HINRICHSEN *et al.*, 2008). Indivíduos com idade avançada costumam ser imunologicamente debilitados e normalmente são portadores de doenças crônicas as quais predispõem infecções microbianas, inclusive infecção de corrente sanguínea (VAZIRI *et al.*, 2012).

Prematuridade e baixo peso (inferior a 1500g) podem ter favorecido as ICS entre os neonatos do presente estudo. Pesquisa realizada por Xavier *et al.* (2008), na UTI Neonatal do HU/UFMS, revelou que em dezessete recém nascidos que desenvolveram candidemia a média de idade era de 16,7 dias de vida, corroborando com outros autores que descrevem prematuridade como condição de risco para infecção hematogênica (ALMIRANTE *et al.*, 2005; ALMIRANTE *et al.*, 2006; ARAUJO 2012; COLOMBO, GUIMARÃES 2003).

Com relação ao setor de internação dos pacientes, 40,6% estavam internados em unidades de terapia intensiva. De acordo com dados da literatura, a internação em UTI constitui condição de risco para a ocorrência de candidemia, pela gravidade dos pacientes ali internados e, pelos dispositivos invasivos frequentemente utilizados para o diagnóstico e tratamento (COLOMBO *et al.*, 2007; HINRICHSEN *et al.*, 2008; HORN *et al.*, 2009).

Entre todos pacientes analisados 7 (22%) eram doentes renais crônicos em tratamento hemodialítico, considerados grupos de risco para infecção fúngica invasiva. Infecção de corrente sanguínea associada ao uso de cateter venoso central é uma das principais complicações em nefropatas crônicos que fazem hemodiálise. Nesses pacientes, sepse representa a principal causa de hospitalização e a segunda de óbito (LUKOWSKY *et al.*, 2012).

Normalmente, as manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes com sepse são inespecíficas e não há como diferenciar infecção de corrente sanguínea causada por bactérias ou fungos. Febre costuma ser o sinal mais frequente, presente em cerca de 60 a 80% dos enfermos (COLOMBO *et al.*, 1999; MÉAN *et al.*, 2008; NUCCI; COLOMBO, 2012).

De acordo com especialistas, a persistência da febre, mesmo com uso de antibióticos potentes costuma ser um indicativo de infecção fúngica. O paciente pode apresentar febre de forma súbita acompanhada de calafrios, mialgia, taquicardia e hipotensão. O aparecimento de lesões cutâneas pode ser a primeira manifestação de doença invasiva em 10 a 15% dos casos (COLOMBO *et al.*, 1999; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Corroborando com outros autores, na presente investigação (Tabela 4), as principais manifestações clínicas nos pacientes com candidemia foram: hipotensão, febre e taquicardia (ALMIRANTE *et al.*, 2006; ÁSMUNDSDÓTTIR *et al.*, 2012; COLOMBO *et al.*, 2006; MOREIRA-OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Recente estudo realizado por Gauna *et al.* (2013), no Serviço de hemodiálise no HU/UFMS mostrou que a presença de tremores, calafrios e hiperemia no local de inserção do cateter foram considerados sintomas indicativos de infecção de corrente sanguínea ($p \leq 0,05$) entre 60 doentes renais crônicos que se encontravam em tratamento hemodialítico, similar ao observado por outros autores (AL MOHAJER; DAROUICHE, 2012; FERMI, 2010).

De modo geral, pacientes idosos apresentam doenças de base e mais de uma comorbidade. Entre as mais frequentes cita-se: diabetes, insuficiência renal, doença cardíaca e doença pulmonar como também observado nos pacientes com candidemia do presente estudo (ÁSMUNDSDÓTTIR *et al.*, 2012; BASSETTI *et al.*, 2011; GUIMARÃES *et al.*, 2012; HINRICHSEN *et al.*, 2008).

De acordo com estudos prévios, entre os fatores que predispõem fungemia cita-se: condições inerentes ao indivíduo e outras relacionadas a procedimentos médicos. Entre as condições inerentes ao paciente, extremos de idade, deficiência imunológica, diabetes, insuficiência renal crônica dialítica são os mais descritos (ÁSMUNDSDÓTTIR *et al.*, 2012; FRANÇA *et al.*, 2008; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). As condições relacionadas a procedimentos médicos incluem: uso prévio de corticóides, quimioterápicos e drogas citotóxicas, técnicas invasivas como cirurgia

abdominal, uso de cateter venoso central e procedimentos endoscópicos (ARAUJO, 2012; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; CORNISTEIN *et al.*, 2013).

Na presente investigação, os pacientes com candidemia foram submetidos a uma variedade de procedimentos (Tabela 5), que segundo estudos prévios, são considerados de risco para infecção de corrente sanguínea. Entre esses, destaca-se: o uso de cateter venoso central, sonda nasogástrica/orogástrica/nasoenteral, sonda vesical de demora e ventilação mecânica (COLOMBO *et al.*, 2007; GUIMARÃES *et al.*, 2012; HINRICHSSEN *et al.*, 2008; ORTEGA *et al.*, 2011). Dispositivos esses bastante utilizados em pacientes internados em unidade de terapia intensiva do HU/UFMS os quais foram à maioria (40,6%).

Estudo recente mostra que mais de 10% dos cateteres venosos centrais podem estar colonizados por leveduras, que ao serem manipulados, aumentam a chance de infecção de corrente sanguínea (RAMOS *et al.*, 2011). Esses dispositivos vasculares são importantes ferramentas para auxiliar o tratamento de paciente criticamente enfermo, porém, sua utilização não está isenta de riscos (GAUNA *et al.*, 2013).

Já é bem conhecido que uma das principais complicações associadas ao uso de CVC é a infecção de corrente sanguínea (O'GRADY; CHERTOW, 2011; SEREFHANOGLU *et al.*, 2012). Diante desta informação, e considerando que 93,8% dos pacientes com candidemia estudados faziam uso de CVC, especula-se que esse dispositivo pode ter favorecido o desenvolvimento de fungemia. A observação de duas *Candida parapsilosis* e uma *Candida albicans* isoladas concomitantemente de hemocultura e cultura de ponta de cateter sugere infecção relacionada ao cateter. O diagnóstico de Infecção de corrente sanguínea associada ao uso de cateter venoso central é de grande importância clínica tendo em vista que essas podem ter consequências sistêmicas graves como sepse, e estar associadas a elevadas taxas de mortalidade (BRASIL, 2009; SEREFHANOGLU *et al.*, 2012).

Na presente investigação, digno de nota foi à observação de candidemia persistente causada por leveduras do complexo *Candida parapsilosis* (nove meses) e por *Candida guilliermondii* (quatro meses) em dois pacientes renais crônicos que faziam uso de cateter venoso central. Estudo realizado na Islândia por Ásmundsdóttir *et al.* (2012), mostrou que em 29 anos somente nove de 307 pacientes tiveram *Candida* sp repetidamente isolada de hemocultivos sugerindo que este é um evento raro.

Estudos mostram administração de nutrição parenteral contaminada está associada a infecção de corrente sanguínea (MEDRANO *et al.*, 2006; RAMOS *et al.*, 2011; TROFA *et al.*, 2008). Na presente investigação 34% dos pacientes fizeram uso de nutrição parenteral, entretanto, não foi observada correlação estatisticamente significativa desse procedimento com o desenvolvimento de candidemia.

Dados da literatura revelam que o uso de determinadas classes de antimicrobianos por tempo prolongado pode favorecer o desenvolvimento de candidemia (BRISAUD *et al.*, 2012; CORNISTEIN *et al.*, 2013; ZAOUTIS, 2010). Segundo Brisaud *et al.* (2012), o uso prévio de cefalosporinas de amplo espectro e carbapenêmicos aumenta a chance de ocorrência de candidemia em torno de duas a três vezes, respectivamente. Zaoutis (2010), refere que o uso prévio de vancomicina por mais de uma semana, aumenta em torno de seis a quatro vezes o risco de adquirir infecção por *Candida* spp. Diante do exposto, acredita-se que o uso desses antimicrobianos (carbapenêmicos 40,6%, cefalosporinas 37,5% e vancomicina 34,4%) podem estar implicados no desenvolvimento de candidemia nos pacientes estudados, porém sem significância estatística.

Na presente pesquisa, oito de dez pacientes foram submetidos a procedimentos cirúrgicos realizaram cirurgia abdominal. De acordo com Colombo *et al.* (2012), lesão na mucosa gastrointestinal permite a translocação de *Candida* spp para a corrente sanguínea. Estudo realizado por Ásmundsdóttir *et al.* (2012), observou que cirurgia abdominal (44%), foi considerada uma das principais condições de risco para candidemia nos pacientes atendidos no período 1980 a 2008 na Islândia.

Com relação ao tratamento de pacientes com candidíase hematogênica, de acordo com especialistas, esse depende da espécie envolvida e pode diferir se o paciente é neutropênico ou não (COLOMBO *et al.*, 2012; PAPPAS, *et al.*, 2009).

Consenso sobre o tratamento de infecções causadas por *Candida* recomenda no caso de infecções invasivas: anfotericina B e suas formulações, fluconazol, voriconazol e equinocandinas (COLOMBO *et al.*, 2012). Com exceção de *C. krusei* que é intrinsicamente resistente ao fluconazol, resistência antifúngica por espécies de *Candida* tem sido pouco descritas (CONSOLO, 2012; DÉRY; HASBUN, 2011; GARNACHO-MONTERO *et al.*, 2010). O antifúngico de escolha para o tratamento dos pacientes com diagnóstico de candidemia no HU/UFMS foi o fluconazol (Tabela 6), similar ao descrito por Horn *et al.* (2009). Estudos prévios mostram que esse

azol é eficaz na terapêutica de infecções de corrente sanguínea (DIEKEMA *et al.*, 2012; TROFA *et al.*, 2008). Em período anterior, estudo realizado por Colombo *et al.* (2007), revelou que a anfotericina B (54%) foi o fármaco de escolha no tratamento de candidemia e somente um quarto dos pacientes receberam tratamento com antifúngicos azóis.

Dados da literatura revelam que *Candida glabrata* apresenta menor suscetibilidade ao fluconazol quando os pacientes tem exposição prévia a esse antifúngico (COLOMBO *et al.*, 2012; PFALLER, 2012). Nestes casos, a droga de escolha deve ser da classe das equinocandinas (PAPPAS *et al.*, 2009).

Demitto *et al.* (2012), refere que diante das características peculiares apresentadas por diferentes espécies de *Candida*, do ponto de vista terapêutico e epidemiológico, a identificação do agente causal em nível de espécie e o conhecimento do seu perfil de suscetibilidade são fundamentais para a terapêutica mais adequada assim como para estudos de vigilância

Na tentativa de verificar correlação entre as características demográficas e clínicas com a evolução dos pacientes estudados, algumas variáveis foram submetidas a análises estatísticas.

Já está bem estabelecido na literatura que a incidência de candidemia aumenta com a complexidade dos pacientes sendo mais frequentes naqueles considerados de alto risco para infecção (BASSETTI *et al.*, 2011; GUIMARÃES *et al.*, 2012; HORN *et al.*, 2009; SAMAPAI CAMARGO *et al.*, 2010) e possuem sistema imune deficitário (BASSETTI *et al.*, 2011; HORN *et al.*, 2009; ORTEGA *et al.*, 2011; SAMAPAI CAMARGO *et al.*, 2010). Também já se sabe que candidemia é uma das principais causas de mortalidade em ambientes hospitalares (HORN *et al.*, 2009; MUÑOZ *et al.*, 2011).

Na presente pesquisa foi observada elevada letalidade (46,9%), porém inferior (60,4%) a descrita na mesma instituição hospitalar em pacientes com candidemia diagnosticados entre 1998 a 2006 (CHANG *et al.*, 2008). A diferença observada pode ser devido ao maior número de casos de candidemia em recém-nascidos no estudo de Chang *et al.* (2008).

Pesquisa multicêntrica desenvolvida por Colombo *et al.* (2007), em quatro hospitais de atendimento terciário da cidade de São Paulo relatou letalidade maior ainda (61%). Esses dados são superiores aos observados em países europeus e

nos Estados Unidos (BASSETTI *et al.*, 2011; DIEKEMA *et al.*, 2012; HORN *et al.*, 2009).

No presente estudo, a prevalência de óbitos foi aproximadamente quatro vezes maior nos pacientes com candidemia por *Candida albicans* do que por espécies de *Candida* não *Candida albicans* ($p \leq 0,05$), corroborando com Medrano *et al.* (2006). Outras pesquisas, porém, afirmam que não há diferença significativa entre as espécies de *C. albicans* e *Candida* não *C. albicans* na evolução clínica do paciente (BASSETTI *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2012; HORN *et al.*, 2009; SAMAPAI CAMARGO *et al.*, 2010).

Estudo realizado na Espanha por Ortega *et al.* (2011), refere maior taxa de mortalidade (39%) quando o agente envolvido era *Candida krusei* e menor (23%) em pacientes com ICS causada por *Candida parapsilosis*, embora sem diferenças estatisticamente significativas.

Elevada letalidade associada a *Candida krusei* também foi evidenciada em estudo realizado por Horn *et al.* (2009) com 2.019 pacientes com diagnóstico de candidemia em vinte e três centros Norte-Americanos.

Outras condições de risco (Tabela 9) podem estar associadas a um mal prognóstico nos pacientes que desenvolvem infecção de corrente sanguínea por *Candida*.

No presente estudo, observou-se uma prevalência aproximadamente duas vezes maior de óbitos nos pacientes com candidemia que fizeram uso prévio de corticóide/imunossupressor, em comparação aos que não utilizaram. Entretanto, na análise multivariada a utilização destes medicamentos não foi considerada significativa para o desfecho fatal dos pacientes com candidemia. Por outro lado, estudo realizado por Muñoz *et al.* (2011), mostrou que o tratamento com corticóide e choque séptico foram considerados fatores de risco independentes para óbito.

O número de mortes também foi três vezes maior nos que usaram bloqueador do receptor de histamina tipo 2. Estudo, desenvolvido por França *et al.* (2008), revelou deste fármaco não foi considerado fator de risco para candidemia, mas poderia ser considerado como um marcador de gravidade da doença, devido o mesmo ser utilizado para prevenção de hemorragia digestiva alta em pacientes críticos.

Os resultados da presente pesquisa mostram ainda cinco vezes mais óbito nos pacientes submetidos à ventilação mecânica; e quatro vezes mais nos que

utilizaram sonda vesical, corroborando com estudos prévios (GUIMARÃES *et al.* 2012; LEROY *et al.*, 2009).

Como pode ser observado nos dados da tabela 9, houve associação entre o uso de sonda nasogástrica/orogástrica/nasoenteral e a ocorrência de óbitos, no entanto, não foi possível calcular a razão de prevalência, pois não ocorreu nenhum óbito dentre os que não usaram estes tipos de sonda.

As variáveis associadas à ocorrência de candidemia e que apresentaram maior frequência de óbitos na análise bivariada, deixaram de apresentar esta associação na análise multivariada, permanecendo apenas a associação entre maior número de óbitos nos pacientes com infecção de corrente sanguínea pela espécie de *Candida albicans* (Tabela 10).

Em suma, os resultados da presente pesquisa mostram que avaliar a associação entre candidemia e o desfecho clínico dos pacientes não é uma tarefa fácil, pois inúmeros são os fatores envolvidos e pode variar de acordo com a população estudada.

7 CONCLUSÕES

No HU/UFMS são registrados em média dezesseis casos de candidemia por ano com comprovação laboratorial. Incidência essa maior do que a observada em estudos anteriores na mesma instituição.

Os agentes etiológicos de candidemia são *Candida albicans*, *Candida* do complexo *C. parapsilosis* (*C. parapsilosis stricto sensu* e *C. orthopsilosis*), *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. As espécies de *Candida* não *Candida albicans* são responsáveis por mais de 60% dos casos de candidemia.

Observa-se emergência de *Candida guilliermondii*, considerada pouco comum como agente de candidemia no HU/UFMS e em outras instituições do Brasil.

Os resultados dos testes de suscetibilidade mostram que a maioria das leveduras é sensível aos antifúngicos fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B. O antifúngico mais eficaz no teste *in vitro* é a anfotericina B.

Observa-se que o uso prolongado de fluconazol para o tratamento de candidemia persistente por *Candida parapsilosis stricto sensu* pode favorecer o desenvolvimento de resistência a esse antifúngico.

Candida guilliermondii e *Candida glabrata* apresentam reduzida sensibilidade ao fluconazol.

Entre os adultos com candidemia a maioria tem idade acima de 60 anos e entre os pacientes pediátricos, a maioria é recém-nascido prematuro e de baixo peso. Pacientes internados em unidade de terapia intensiva e doentes renais crônicos em tratamento hemodialítico são também considerados grupos de risco para infecções fúngicas invasivas.

A observação de duas *Candida parapsilosis* e uma *Candida albicans* isoladas concomitantemente de hemocultura e cultura de ponta de cateter venoso central sugere infecção relacionada ao cateter venoso central.

O antifúngico de escolha para o tratamento dos pacientes com diagnóstico de candidemia no HU/UFMS é o fluconazol.

Observa-se elevada letalidade nos pacientes com infecção de corrente sanguínea por *Candida*. Principalmente quando o agente envolvido é *C. albicans*.

O uso prévio de corticóide/imunossupressor, bloqueador do receptor de histamina tipo 2, assim como utilização de ventilação mecânica e sonda vesical são condições de risco para infecção de corrente sanguínea por *Candida* spp.

A análise multivariada mostra associação entre maior número de óbitos nos pacientes com infecção de corrente sanguínea por *Candida albicans* do que por *Candida* não *C. albicans* ($p \leq 0,05$).

REFERÊNCIAS¹

ALMEIDA, A. A.; MESQUITA, C. S. S.; SVIDZINSKI, T. I. E.; OLIVEIRA, K. M. P. Antifungal susceptibility and distribution of *Candida* spp. isolates from the University Hospital in the municipality of Dourados, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 3, p. 335-339. 2013.

ALMIRANTE B.; RODRÍGUEZ D.; PARK B. J.; CUENCA-ESTRELLA M.; PLANES A. M.; ALMELA M.; Mensa, J.; Sanchez, F.; Ayats, J.; Gimenez, M.; Saballs, P.; Fridkin, S. K.; Morgan J.; Rodriguez-Tudela, J. L.; Warnock, D. W.; Pahissa, A. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4 p. 1829–1835, apr. 2005.

ALMIRANTE, B.; RODRÍGUEZ, D.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ALMELA, M.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; Alonso-Tarres, C.; Rodriguez-Tudela, J. L.; Pahissa, A. Epidemiology, Risk Factors, and Prognosis of *Candida parapsilosis* Bloodstream Infections: Case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1681–1685, may 2006.

ALMIRANTE, B.; CUENCA-ESTRELLA, M. Candidemia: impacto de los estudios epidemiológicos en la terapéutica y en el pronóstico de una infección grave. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 29, n.5, p. 325–327, 2011.

AL MOHAJER, M., DAROUICHE, R.O. Sepsis syndrome, bloodstream infections and device-related infections. **Medical Clinics of North America**, v. 96, p.1203–1223, 2012.

ANTUNES, A. G. V.; PASQUALOTTO, A. C.; DIAZ, M. C.; AZEVEDO, P. A.; SEVERO, L. C. Candidemia in a brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.46, n.5, p.239-241, Sept./Oct. 2004.

ARAUJO, M. R. E. Hemocultura: recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados. **Journal of Infection Control**, v.1, n. 1, p. 08-19, 2012.

ÁSMUNDSDÓTTIR, L. R.; ERLENDSDÓTTIR, H.; GÍSLADÓTTIR, A. L.; GOTTFREDSSON, M. Molecular epidemiology of late recurrent candidaemia - a population based study in Iceland. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 2, p. 195- 201, fev. 2012.

¹ Nota: Normas segundo ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS). NBR 6023: Informação e documentação: Referências: Elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. BioEstat® versão 5.0: aplicações estatísticas das ciências bio-médicas. Belém (PA): Sociedade Mamirauá, 2007.

BASSETTI, M.; TARAMASSO, L.; NICCO, E.; MOLINARI, M. P.; MUSSAP, M.; VISCOLI, C. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and outcome of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in Italy. **Plos One**, v. 6, n. 9, p. e24198, sept. 2011.

BONFIETTI, L. X.; SZESZS, M. W.; CHANG, M. R.; MARTINS, M. A.; PUKINSKAS, S. R. B. S.; NUNES, M. O.; Pereira, G. H.; Paniago, A. M. M.; Purisco, S. U.; Melhem, M. S. C. Ten-year study of species distribution and antifungal susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates at a brazilian tertiary hospital. **Mycopathologia**, n. 174, p. 389-96, 2012.

BORG-VON, Z. M.; KUNZ, L.; RÜCHEL, R.; REICHARD, U.; WEIG, M.; GROSS, U. Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 60, p. 424–428, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Corrente sanguínea: critérios nacionais de infecções relacionadas à assistência à saúde**. Brasília: Anvisa, set. 2009.

BRISAUD, O.; GUICHOUX, J.; HARAMBAT, J.; TANDONNET, O.; ZAOUTIS, T. Invasive fungal disease in PICU: epidemiology and risk factors. **Annals of Intensive Care**, n. 2, v. 6, 2012.

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.; MACHADO, V. E. *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n. 50, v. 5, p. 265-268, sept./oct. 2008.

CHEN, L.-Y.; KUO, S.-C.; WU, H.-S.; YANG, S.-P., CHAN, Y.-J.; CHEN, L.-K., Wang, F.-D. Associated clinical characteristics of patients with candidemia among different *Candida* species. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 22. pii:S1684-1182(12)00162-4. sept. 2012.

CLEVELAND, A. A.; FARLEY, M. M.; HARRISON, L. H.; STEIN, B.; HOLICK, R.; LOCKHART, S. R.; Magill, S. S.; Derado, G.; Park, B. J.; Chiller, T. M. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008–2011. **Clinical Infectious Diseases**, n. 55, v. 10, p. 1352–61, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline**. Wayne: Clinical Laboratory Standards Institute, 2004. (CLSI document M44-A).

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard.** 3 ed. Wayne: Clinical Laboratory Standards Institute, 2008. (CLSI document M27-A3).

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; third information supplement.** Wayne: Clinical Laboratory Standards Institute, 2008. (CLSI document M27-S3).

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informational supplement.** Wayne: Clinical Laboratory Standards Institute, 2012. (CLSI document M27-S4).

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; SALOMÃO, R.; BRANCHINI, M. L. M.; RICHTMANN, R.; DEROSI, A.; WEY, S. B. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, n. 34, v. 4, p. 281–286, 1999.

COLOMBO, A.L.; Guimarães, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 36, v. 5, p. 599-607, set.-out. 2003.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D. A.; Warnock, D.; Morgan, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816–2823, aug. 2006.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R. B. F.; MONFARDINI, L. P. A.; CUNHA, A. K. B.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R. C. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, n. 5, p. 570-576, may 2007.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; CAMARGO, L. F. A.; RICHTMANN, R.; QUEIROZ-TELLES, F.; SALLES, M. J. C.; Cunha, C. A.; Yasuda, M. A. S.; Moretti, M. L.; Nucci M. Tratamento das principais infecções causadas por *Candida* spp.: relato de reunião conjunta de três sociedades médicas. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. supl.1, p. 1-43, 2012.

CONSOLO, L.C.T. **Colonização por *Candida* spp. e fatores de risco associado ao desenvolvimento de Candidemia.** 2012. 114 f. Dissertação. (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS, Campo Grande, 2012.

CORNISTEIN, W.; MORA, A.; ORELLANA, N.; CAPPARELLI, F. J.; CASTILLO, M. *Candida*: epidemiología y factores de riesgo para especies no *albicans*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 31, n. 6, p. 380–384, 2013.

CORTÉS, J. A. L.; Russi, J.A.N. Equinocandinas. **Revista Chilena de Infectología**, v. 28, n. 6, p. 529-536, 2011.

DA MATTA, D. A.; MELO, A. S.; COLOMBO, A. L.; FRADE, J. P.; NUCCI, M.; LOTT, T. J. Candidemia surveillance in Brazil: evidence for a geographical boundary defining an area exhibiting an abatement of infections by *Candida albicans* group 2 strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3062–3067, sept. 2010.

DEMITTO, F. O.; AMARAL, R. C. R.; BIASI, R. P.; GUILHERMETTI, E.; SVIDZINSKI, T. I. E.; BAEZA, L. C. Suscetibilidade a antifúngicos *in vitro* de *Candida spp.* em pacientes do Hospital Universitário Regional de Maringá-PR. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 5, p. 315-321, out. 2012.

DÉRY, M.; HASBUN, R. Fluconazole-resistant *Candida*: mechanisms and risk factor identification. **Current Fungal Infection Reports**, v. 5, p. 23–28. 2011.

DE TORO, M.; TORRES, M. J.; MAITE, R.; AZNAR, J. Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p.418-424, 2011.

DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; BRUEGGEMANN, A. B.; COFFMAN, S. L.; DOERN, G. V.; HERWALDT, L. A.; Pfaller, M. A. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1298–1302, apr. 2002

DIEKEMA, D.; ARBEFEVILLE, S.; BOYKEN, L.; KROEGER, J.; PFALLER, M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, p. 45–48, 2012.

DIVISION OF PUBLIC HEALTH SURVEILLANCE AND INFORMATICS. **Epi Info, versão 3.5.3**. jan. 2011. Disponível em <<http://www.cdc.gov>>. Acesso em: 01 fev. 2012.

EGGIMANN, P.; BARBERINI, L.; CALANDRA, T.; MARCHETTI, O. Invasive *Candida* infections in the ICU. **Mycoses**, v. 55, n. suppl.1, p. 65–72, 2011.

ELLEPOLA, A. N. B.; MORRISON, C. J. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. **The Journal of Microbiology**, v. 43, p. 65-84, feb. 2005.

EUCAST - Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST Definitive Document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 398-405, 2008.

FERMI, M. R. V. **Diálise para enfermagem: guia prático**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p. 11-16.

FRANÇA, J. C. B.; RIBEIRO, C. E. L.; QUEIROZ-TELLES, F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e susceptibilidade aos antifúngicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, p. 23-28, jan./fev. 2008.

GARNACHO-MONTERO, J.; DÍAZ-MARTÍN, A.; GARCÍA-CABRERA, E.; PIPAÓN, M. R. P.; HERNÁNDEZ-CABALLERO, C.; AZNAR-MARTÍN, J.; CISNEROS, J. M.; ORTIZ-LEYBA C. Risk factors for fluconazole-resistant candidemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 8, p. 3149–3154, aug. 2010.

GAUNA, T. T.; OSHIRO E.; LUZIO Y.C.; PANIAGO A. M. M.; PONTES, E.R. J. C.; CHANG M. R. Bloodstream infection in patients with end-stage renal disease in a teaching hospital in central-western Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 4, p. 426-432, july/aug. 2013.

GIOLO, M.P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Phisiopathogenesis, epidemioly and laboratory diagnosis of candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225-234, jun. 2010.

GÓMEZ, J.; GARCÍA-VÁZQUEZ, E.; HERNÁNDEZ, A.; ESPINOSA, C.; RUIZ, J. Candidemias nosocomiales: nuevos retos de um problema emergente. **Revista Espanola de Quimioterapia**, v. 23, n. 4, p. 158-168, 2010.

GONZÁLEZ, G. M.; ELIZONDO, M.; AYALA, J. Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, Mexico, to seven antifungal agents: results of a 3-Year (2004 to 2007) Surveillance Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 9, p. 2902–2905, sept. 2008.

GUIMARÃES, T.; NUCCI, M.; MENDONÇA, J. S.; MARTINEZ, R.; BRITO, L. R.; SILVA, N.; MORETTI, M. L.; SALOMÃO, R.; COLOMBO, A. L. Epidemiology and predictors of a poor outcome in elderly patients with Candidemia. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 16, p. 442–447, 2012.

HINRICHSEN, S. L.; FILHO, A. M. L.; ROLIM, H.; VALENTE, A.; BRITO, C. Infecções fúngicas. In: Hinrichsen, S. L. **Doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro-RJ: Guanabara Koogan S.A.; 2005. p. 437-443.

HINRICHSEN, S. L.; FALCÃO, E.; VILELLA, T. A. S.; COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; MOURA, L.; RÊGO, L.; LIRA C.; ALMEIDA L. Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 394-398, jul./ago. 2008.

HORN, D. L.; NEOFYTOS, D.; ANAISSIE, E. J.; FISHMAN, J. A.; STEINBACH, W. J.; OLYAEI, A. J.; MARR, K. A.; PFALLER, M. A.; CHANG, C.-H.; WEBSTER, K. M. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p. 1695–703, 2009.

KAUFFMAN, C. A. Fungal infections. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 3, n.1, p. 35–40, 2006.

KLEVAY, M. J.; HORN, D. L.; NEOFYTOS D.; PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Initial treatment and outcome of *Candida glabrata* versus *Candida albicans* bloodstream infection. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, p. 152–157, 2009.

LACAZ, C. S.; PORTO, E; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Leveduras de Interesse Médico. In: LACAZ, C. S.; PORTO, E; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. Sarvier: São Paulo, 2002. cap. 6, p. 123-173.

LEROY, O.; GANGNEUX, J. P.; MONTRAVERS, P.; MIRA, J. P.; GOUIN, F.; SOLLET, J. P.; CARLET, J.; REYNES, J.; ROSENHEIM, M.; REGNIER, B.; LORTHOLARY, O. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). **Critical Care Medicine**, v. 37, n. 5, p. 161-8, may 2009.

LUKOWSKY, L. R.; KHEIFETS, L.; ARAH, O. A.; NISSENSON, A. R.; KALANTAR-ZADEH, K. Patterns and predictors of early mortality in incident hemodialysis patients: new insights. **American Journal of Nephrology**, v. 35, p. 548-558, 2012.

LUMBRERAS, C.; LIZASOAIN, M.; AGUADO, J. M. Antifúngicos de uso sistêmico. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 21, n. 7, p. 366-80, 2003.

MARTIN, G. S.; MANNINO, D. M.; EATON, S.; MOSS, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 1546-54, 2003.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p. 449-60, 2006.

MÉAN, M.; MARCHETTI, O.; CALANDRA, T. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. **Critical Care**, v. 12, n. 1, p. 204, 2008.

MEDRANO, D. J. A.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A; ROCHA, M. F. G.; RABENHORST, S. H. B.; SIDRIM, J. J. C. Candidemia in a brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 1, p. 17-20, jan./fev. 2006.

MIMICA L. M. J.; UEDA S. M. Y.; MARTINO M. D. V.; NAVARINI A.; MARTINI I. J. *Candida* infection diagnosis: evaluation of *Candida* species identification and characterization of susceptibility profile. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 1, p. 17-23, fev. 2009.

MOREIRA-OLIVEIRA, M. S.; MIKAMI, Y.; MIYAJI, M.; IMAI, T.; SCHREIBER, A. Z.; MORETTI, M. L. Diagnosis of candidemia by polymerase chain reaction and blood culture: prospective study in a high-risk population and identification of variables associated with development of candidemia. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 24, p. 721–726, 2005.

MOTTA A. L.; ALMEIDA G. M. D.; JÚNIOR J. N. A.; BURATTINI M. N.; ROSSI F. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 441-448, 2010.

MUÑOZ, P.; GIANNELLA, M.; FANCIULLI, C.; GUINEA, J.; VALERIO, M.; ROJAS, L.; RODRÍGUEZ-CRÉIXEMS, M.; BOUZA, E. *Candida tropicalis* fungaemia: incidence, risk factors and mortality in a general hospital. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, p. 1538–1545, 2011.

NEUFELD, P. M.; SANTOS, L. H.; RIBEIRO, M. D.; SILVA, M. F.; ROCHA, A. C. M.; SILVA, M.; LAZERÁ, M. S. Prevalência e susceptibilidade *in vitro* a itraconazol e anfotericina B de isolados clínicos de *Candida*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 41, n. 2, p. 119-125, 2009.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, p. 77–82, 2007.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A. M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 5, p. 561–570, 2010.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. When using empirical therapy in invasive fungal diseases. **Revista Panamericana de Infectología**, v. 14, n. 1, p. 32-44, 2012.

ODDS, F. C.; HANSON, M. F.; DAVIDSON, A. D.; JACOBSEN, M. D.; WRIGHT, P.; JULIE, A. W.; Gow, N. A. R.; Jones B. L. One year prospective survey of *Candida* bloodstream infections in Scotland. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 1066–1075, 2007.

O' GRADY, N. P.; CHERTOW, D. S. Managing bloodstream infections in patients who have short-term central venous catheters. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 78, n. 1, p. 10- 17, jan. 2011.

ORTEGA, M.; MARCO, F.; SORIANO, A.; ALMELA, M.; MARTÍNEZ, J. A.; LÓPEZ, J.; PITART, C.; MENSA, J. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. **Journal of Hospital Infection**, n. 77, p. 157-161, 2011.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D.; BENJAMIN, D. K.; CALANDRA, T. F.; EDWARDS, J. E.; FILLER, S. G.; FISHER, J. F.; KULLBERG, B.-J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A. C.; REX, J. H.; WALSH, T. J.; SOBEL, J. D. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious diseases society of america. **Clinical Infectious Diseases**, n. 48, p. 503–35, 2009.

PASQUALOTTO, A. C.; ANTUNES, A. G. V.; SEVERO, L. C. *Candida guilliermondii* as the aetiology of candidosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 3, p. 123-127, may/june, 2006.

PASQUALOTTO, A. C.; ZIMERMAN, R. A.; ALVES, S. H.; AQUINO, V. R.; BRANCO, D.; WILTGEN, D.; AMARAL, A.; CECHINEL, R.; COLARES, S. M.; ROCHA, I. G.; SEVERO, L. C.; SUKIENNIK, T. C. T. Take control over your fluconazole prescriptions: the growing importance of *Candida glabrata* as an agent of candidemia in Brazil. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, n. 29, v. 9, p. 898-899, 2008.

PFALLER, M. A. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs and modes of transmission. **Clinical Infectious Diseases**, n. 22, v. suppl 2, p. 889-94, 1996.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; MENDEZ, M.; KIBBLER, C.; ERZSEBET, P.; CHANG, S. C.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A. *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3551–3556, oct. 2006.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133–163, jan. 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A.; NAGY, E.; DOBIASOVA, S.; RINALDI, M.; BARTON, R.; VESELOV, A. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program, 2001 to 2005. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 515–521, feb. 2008.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J.; BOYKEN, L.; TENDOLKAR, S.; KROEGER, J.; DIEKEMA, D. J. Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location in the United States in 2001 to 2007. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 10, p. 3185–3190, oct. 2009.

PFALLER, M. A.; MOET, G. J.; MESSER, S. A.; JONES, R. N.; CASTANHEIRA, M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY antimicrobial surveillance program, 2008-2009. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 561–566, feb. 2011.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1A, p. S3-13, jan. 2012.

POSTERARO, B.; DE PASCALE, G.; TUMBARELLO, M.; TORELLI, R.; PENNISI, M. A.; BELLO, G.; MAVIGLIA, R.; FADDA, G.; SANGUINETTI, M.; ANTONELLI, M. Early diagnosis of candidemia in intensive care unit patients with sepsis: prospective comparison of (1-3)- β -D-glucan assay, *Candida* score, and colonization index. **Critical Care**, v. 15, p. R249, 2011.

QUINDÓS, G.; CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; ERASO, E.; CANTÓN, E.; PEMÁN, J. Actividad antifúngica in vitro de voriconazol: nuevos datos después de los primeros años de experiencia clínica. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, p. 198-209, 2007.

RAMOS, R. T.; LEITE, G. M. L.; MARTINEZ, H. V.; SIBIN, K. C.; GERMANO, A.; SVIDZINSKI, T. Características clínicas e epidemiológicas de doentes com cateter venoso central colonizado por leveduras. **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, n. S2, p. 257-262, 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSH, E. F.; MANIATIS, T. Commonly used techniques in molecular cloning. In: SAMBROOK, J.; FRIYSH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**. A laboratory manual, appendix E. Cold Spring Harbour Laboratory Press: New York, 1989. p. 3-6.

SAMPAIO CAMARGO, T. Z.; MARRA, A. R.; SILVA, C. V.; CARDOSO, M. F. S.; MARTINO, M. D. V.; CAMARGO, L. F. A.; CORREA, L. Secular trends of candidemia in a tertiary care hospital. **American Journal of Infection Control**, v. 38, n. 7, p. 546-551, 2010.

SEGIREDDY, M.; JOHNSON, L. B.; SZPUNAR, S. M.; KHATIB, R. Differences in patient risk factors and source of candidemia caused by *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Mycoses**, v. 54, p. 39-43. 2009

SEREFHANOGLU, K.; TIMURKAYNAK, F.; CAN, F.; CAGIR, U.; ARSLAN, H.; OZDEMIR, F. N. Risk factors for candidemia with non-*albicans* *Candida* spp. in intensive care unit patients with end-stage renal disease on chronic hemodialysis. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 111, p. 325-332, 2012.

SILVA, A. P.; MIRANDA, I. M.; LISBOA, C.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2392–2397, aug. 2009.

TAKESUE, Y.; KAKEHASHI, M.; OHGE, H.; IMAMURA, Y.; MURAKAMI, Y.; SASAKI, M.; MORIFUJI, M.; YOKOYAMA, Y.; KOUYAMA, M.; YOKOYAMA, T.; SUEDA, T. Combined assessment of beta-D-glucan and degree of candida colonization before starting empiric therapy for candidiasis in surgical patients. **World Journal of Surgery**, v. 28, n.6, p. 625-630, 2004.

TAPIA, C.; LEON, E.; PALAVECINO, E. Antifungal susceptibility of yeast by etest. Comparision of 3 media. **Revista Médica de Chile**, v. 131, n. 3, p. 299-302, mar. 2003.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A.D.; GOW, N.A.R.; MAIDEN, M.C.J.; ODDS, F.C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 284–292, jan. 2005.

TROFA, D.; GÁCSE, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 606–625, oct. 2008.

VAZIRI, N. D.; PAHL, M. V.; CRUM, A.; NORRIS, K. Effect of uremia on structure and function of immune system. **Journal of Renal Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 149-156, jan. 2012.

XAVIER, P. C. N.; CHANG, M. R.; NUNES, M. O.; PALHARES, D. B.; SILVA, R. A.; BONFIM, G. F.; JÚNIOR, N. F. A. Neonatal candidemia in a public hospital in Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 459-463, set./out. 2008.

ZAOUTIS T. E. Candidemia in children. **Current Medical Research and Opinion**, v. 26, n. 7, p. 1761-1768, july 2010.

APÊNDICE A – FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS DO PRONTUÁRIO MÉDICO

Projeto Candidemia HU/UFMS

Amostra: _____ Espécie: _____ Setor de internação: _____
 Data (coleta): ____/____/____ Data da hemocultura positiva: ____/____/____
 RG – HU:

--	--	--	--	--	--	--

Nome: _____

Sexo: () Masc () Fem Idade(época da coleta): _____ Data nascimento: ____/____/____
 Data Internação: ____/____/____ APGAR: ____/____
 Idade gestacional: ____ semanas Peso: _____ Cor: _____
 Procedência: _____ Naturalidade: _____

Causa/diagnóstico na internação: _____

Doença/infecção atual: _____

Dias entre internação e hemocultura +: _____

Evolução:

() alta: ____/____/____ () dias de internação () óbito: ____/____/____ () dias de internação

Dias entre hemocultura + e óbito: _____

Doença de base (que pode ter contribuído para ocorrer a candidemia):

- () AIDS () Doença renal crônica
 () Câncer () Prematuridade
 () Diabetes

Comorbidade (que pode ter contribuído para ocorrer a candidemia):

- () Doença Auto-Imune () Doença Neurológica
 () Doença Cardíaca () Doença Pulmonar
 () Doença Hepática () Hipertensão

Condições clínicas na ocasião do episódio da candidemia:

- () Febre ($\geq 37,8^{\circ}\text{C}$) () Dispnéia () Diarreia () Taquicardia () Mialgia
 () Convulsão () Anasarca () Hipotensão (sistólica $\leq 90\text{mm}$)
 () Candidíase oral () Lesão de pele (envolvendo Candida)
 () Infecção urinária por Candida

Condições de risco anteriores a candidemia:

- () Internado em UTI/CTI () Plaquetopenia () Diálise () Dreno
 () Quimioterapia () Prótese () Oclusão intestinal
 () Vancomicina () Cefalosporinas 3ª e 4ª geração (ceftriaxona, ceftazidima, cefepime) () Carbapenêmicos (imipenem, meropenem) () Colostomia
 () Bloqueadores H2 (cimetidina, ranitidina) () Omeprazol
 () Cirurgia abdominal
 () Cirurgia (até 30 dias antes da hemo +)
 () Cateter venoso central () Cateter umbilical
 () Sonda vesical () Sonda nasogástrica/orogástrica
 () Ventilação mecânica
 () Nutrição Parenteral total
 () Corticóide/Imunossupressor

Tratamento ANTIFÚNGICO: () SIM () NÃO () Óbito antes ou no dia da hemocultura +
() Óbito até 3 dias da hemocultura +

Tratamento sistêmico PRÉVIO (48 hrs antes) a candidemia: () SIM () NÃO

Antifúngico prévio	Dose (mg/dia)	Início	Término	Dias de tratamento

Uso de Micostatin e/ou Nistatina: () NÃO () SIM, Início: _____ Término: _____

Tratamento antifúngico APÓS a coleta:

Antifúngico	Dose (mg/dia)	Início	Término	Dias de tratamento

Antifúngico de primeira escolha: () Fluconazol () Anfotericina B () Itraconazol
() Outro: _____

Troca de antifúngico: () Fluco por AnB () AnB por Fluco () Outra: _____

Combinação de antifúngicos sistêmicos: () SIM _____ () NÃO

Dias entre hemocultura positiva e tratamento: _____

Antifungograma:

Antifúngico	MIC Vitek (µg/mL)	MIC CLSI (µg/mL)	Resultado
Anfotericina B			
Fluconazol			
Itraconazol			
Voriconazol			

Antibióticos utilizados ANTES da coleta da hemocultura: Número de antibióticos: _____

1) _____ Início: _____ Término: _____
 2) _____ Início: _____ Término: _____
 3) _____ Início: _____ Término: _____
 4) _____ Início: _____ Término: _____
 5) _____ Início: _____ Término: _____
 6) _____ Início: _____ Término: _____
 7) _____ Início: _____ Término: _____
 8) _____ Início: _____ Término: _____

Hemograma (mais próximo do dia da coleta da hemocultura):

Hemácias: _____ Hemoglobina: _____ Hematócrito: _____ () Anemia
 Leucócitos totais: _____ () Leucopenia () Leucocitose
 Metamielócitos: _____ Bastonetes: _____ Segmentados: _____
 Eosinófilos: _____ Linfócitos: _____ Monócitos: _____
 Plaquetas: _____

Obs: _____

**APÊNDICE B – VALORES DE REFERÊNCIAS, SEGUNDO CLSI M27 – S3 (2008)
E M27 – S4 (2012)**

Tabela 1 - Variação das espécies de referência recomendada pelo CLSI M27- S4 (2012), segundo concentração inibitória mínima (CIM)

Espécie	CIM (µg/mL) 24 horas de Incubação			
	Anfotericina B	Fluconazol	Itraconazol	Voriconazol
<i>Candida parapsilosis</i>	0,25-2,0	0,5-4,0	0,06-0,5	0,015-0,12
<i>Candida krusei</i>	0,5-4,0	1,0-4,0	0,06-0,5	0,03-0,25

Espécie	CIM (µg/mL) 48 horas de Incubação			
	Anfotericina B	Fluconazol	Itraconazol	Voriconazol
<i>Candida parapsilosis</i>	0,5-2,0	8,0-64	0,12-1,0	0,06-0,5
<i>Candida krusei</i>	1,0-4,0	16-128	0,25-1,0	0,12-1,0

Tabela 2 - Variação da concentração inibitória mínima (CIM), segundo o documento CLSI M27 - A3 (2008) e M27- S4 (2012)

Antifúngico	Espécies	CIM (µg/mL)		
		S	SDD	R
Fluconazol ¹	<i>C. albicans</i>	≤ 2	4	≥ 8
	<i>C. parapsilosis</i>	≤ 2	4	≥ 8
	<i>C. tropicalis</i>	≤ 2	4	≥ 8
	<i>C. glabrata</i>	-	≤ 32	≥ 64
	<i>C. krusei</i>	-	-	-
Voriconazol ¹	<i>C. albicans</i>	≤ 0,12	0,25 – 0,5	≥ 1
	<i>C. parapsilosis</i>	≤ 0,12	0,25 – 0,5	≥ 1
	<i>C. tropicalis</i>	≤ 0,12	0,25 – 0,5	≥ 1
	<i>C. glabrata</i>	-	-	-
	<i>C. krusei</i>	≤ 0,5	1	≤ 2
Itraconazol ²		≤ 0,12	0,25 – 0,5	≥ 1
Anfotericina B ²		-	-	> 1

¹CLSI M27-S4 (2012), Leitura de 24h.

²CLSI M27-S3 (2008), Leitura de 48h.

APÊNDICE C – COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES

Tampão TE

(Tris HCL 10mM pH 8,0, EDTA 10mM pH 8,0)

EDTA 0,5M pH 8,0 (Sigma, EUA).....	1 mL
Tris-HCL 1M pH 7,5 (Sigma, EUA).....	0,5 mL
Água bidestilada.....	50 mL

Manter na geladeira.

Tampão de Lise

Tampão TE (10mM Tris HCL pH 8,0, 10mM EDTA)

SDD 10% - Dodecil sulfato de sódio (USB, EUA).....	2,5 mL
N-Lauroylsarcosine sodium salt a 1% (Sigma, EUA).....	500 µL
Proteinase K – 55mg/mL (Sigma, EUA).....	100 µL

Completar para 50 mL

Aliquotar em tubos Falcon de 15mL e manter a -20°C.

Tampão TBE 10X

Ácido Bórico (Sigma, EUA).....	27,50 g
Tris Base (Sigma, EUA).....	54,00 g
EDTA 0,5M pH 8,0 (Sigma, EUA).....	20,00 mL
Água bidestilada estéril.....	500 mL

Manter na geladeira.

TBE 1X

Tampão TBE 10x..... 100 mL

Água bidestilada estéril..... 900 mL

Manter na geladeira.

APÊNDICE D – RELAÇÃO DAS AMOSTRAS

Amostra	Identificação Fenotípica	Identificação Molecular	CIM (µg/mL)			
			AMB ²	FCZ ¹	ITZ ²	VCZ ¹
313 H3-10	<i>C. albicans</i>		0,5	0,125	0,03	0,015
318 H3-10	<i>C. glabrata</i>		1	8	1	0,125
454 H3-10, 530H3-10	<i>C. guillermundii</i>		0,5	0,5	0,25	0,015
443 H3-10	<i>C. glabrata</i>		1	4	1	0,125
489 H4-10	<i>C. albicans</i>		0,5	0,125	0,03	0,015
518 H4-10	<i>C. tropicalis</i>		1	0,25	0,03	0,015
674H5-10	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	0,5	0,25	0,125	0,015
192 H5-10, 31 H6-10, 40 H6-10	<i>C. krusei</i>		1	4	0,5	0,06
164 H6-10, 24 H6-10, 28 H6-10	<i>C. albicans</i>		0,5	0,25	0,06	0,015
108 H7-10, 106 H6-10	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,5	0,06	0,015
184 H7-10	<i>C. albicans</i>		0,5	0,25	0,03	0,015
19 H8-10	<i>C. albicans</i>		0,25	0,25	0,03	0,015
52 H9-10, 03 H1-11	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,06	0,015
423 H9-10	<i>C. glabrata</i>		0,5	4	1	0,125
458 H10-10	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,06	0,015
184 H10-10 N.R.	<i>C. guillermundii</i>		0,25	1	0,5	0,03
153 H1-11	<i>C. albicans</i>		0,5	0,25	0,03	0,015
80 H3-11	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	0,5	0,125	0,06	0,015
139 H3-11	<i>C. albicans</i>		0,25	0,125	0,03	0,015
90 H3-11	<i>C. guillermundii</i>		0,25	4	0,5	0,03
08 H4-11, 25 H4-11	<i>C. albicans</i>		0,25	0,125	0,03	0,015
18 H4-11	<i>C. glabrata</i>		1	8	1	0,125
189 H4-11	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,125	0,015	0,015
03H5-11	<i>C. tropicalis</i>		0,5	0,125	0,06	0,015
117 H5-11, 07 H8-11, 72 H11-11, 45H2-12	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	1	8	0,125	0,06
103H8-11, 166H9-11, 19 H10-11, 197H11-11, 110H12-11	<i>C. guillermundii</i>		1	2	0,5	0,06
130H9-11	<i>C. albicans</i>		0,5	0,125	0,03	0,015
28H11-11	<i>C. tropicalis</i>		1	0,25	0,03	0,015
252H12-11	<i>C. tropicalis</i>		1	0,25	0,03	0,015
75 H3-12	<i>C. albicans</i>		0,5	0,125	0,03	0,015
108 H3-12	<i>C. guillermundii</i>		0,5	2	0,25	0,03
113 H3-12	<i>C. albicans</i>		0,5	0,125	0,03	0,015

¹CLSI M27-S4 (2012), Leitura de 24h.

²CLSI M27-S3 (2008), Leitura de 48h.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS



Carta de Aprovação

A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 1591 da Pesquisadora Marilene Rodrigues Chang intitulado “Caracterização de leveduras isoladas de hemocultivo e susceptibilidade aos antifúngicos”, foi revisado por este comitê e aprovado em reunião ordinária no dia 4 de março de 2010, 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, 04 de março de 2010.

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