Lourdes das Neves Miranda

Colonização por *Candida* em indivíduos com candidemia

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Área de concentração: Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Anna Sara Shafferman Levin

São Paulo

2007

Lourdes das Neves Miranda

Colonização por *Candida* em indivíduos com candidemia

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Área de concentração: Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Anna Sara Shafferman Levin

São Paulo

2007

A meu pai, Abilio Augusto Miranda (*in memoriam*)

e a

Ivan Ribeiro Canuto (*in memoriam*)

Agradecimentos

À Professora Dra. Anna Sara Shaferman Levin, pelo apoio, incentivo e orientação na realização deste trabalho.

À Professora Dra. Silvia Figueiredo Costa, pelo apoio e colaboração para realização deste estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio à pesquisa nº 03/10008-7.

À Inneke, pelo apoio e pela colaboração técnica durante todas as etapas da realização deste trabalho.

À Ana Paula e Ramiro, pelo apoio e colaboração na realização deste trabalho.

A todos do Laboratório de Investigação Médica (LIM-54) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo apoio e colaboração.

À Subcomissão de Infecção Hospitalar do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial à Cleide e Satiko, pelo apoio e colaboração na realização deste estudo.

Ao Grupo de Infecção Hospitalar do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial à Renata e Sueli, pela colaboração na realização deste estudo.

À equipe do Departamento de Microbiologia do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial à Adriana e Wagner, pela colaboração na realização deste trabalho.

Ao Instituto de Infectologia Emílio Ribas, em especial a Vicente e Rodolfo, pela colaboração no estudo.

Aos amigos do Hospital Geral de Itapeverica da Serra, em especial à Christiane, Monica e Norma, pelo apoio e incentivo na realização deste estudo.

À Marilúcia e Marco pelo incentivo e apoio.

Ao amigo Icaro, pelo apoio e incentivo, durante todas as etapas da realização deste trabalho.

À minha mãe Clotilde, e às minhas sobrinhas Júlia e Beatriz pelo incentivo e carinho.

"Vivendo, se aprende; mas o que se aprende, mais, é só a fazer outras maiores
perguntas"

João Guimarães Rosa

Grande sertão: veredas.

9ª Ed. José Olympio, Rio de Janeiro, 1974, p.312.

Resumo

Miranda, Lourdes das Neves. *Colonização por Candida em indivíduos com candidemia* (dissertação). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 120p.

Nas duas últimas décadas, várias espécies de *Candida* têm surgido como importantes patógenos hospitalares, no mundo e no Brasil. A identificação da origem da infecção tem importância na definição de estratégias de prevenção e controle. As estratégias para a prevenção de candidíase endógena podem focar, parcialmente, em métodos para redução da colonização de mucosas, por exemplo, a restrição ao uso de antibióticos de largo espectro. Entretanto, nos casos nos quais está envolvida uma fonte exógena, um expressivo reforço, na melhoria da qualidade das práticas de assistência à saúde, é prioritário para prevenção da transmissão. O objetivo deste estudo foi avaliar diferentes sítios de colonização por *Candida* como potenciais fontes de candidemia. O estudo foi desenvolvido em 3 hospitais no Brasil: Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo, hospital universitário de nível terciário de complexidade, com mil leitos; o Instituto de Infectologia Emílio Ribas, um hospital com 200 leitos, referência para todo o Estado de São Paulo; e o Hospital Geral de Itapeverica da Serra, hospital de cuidados secundários da Grande São Paulo. Foram incluídos no estudo os pacientes com isolamento de *Candida* em hemocultura obtida de veia periférica após 48 horas de admissão hospitalar. As culturas de vigilância para *Candida* foram colhidas dos seguintes sítios: urina, reto, cavidade oral, pele (virilha e axila), pele ao redor do cateter e ponta de cateter caso disponível. A tipagem molecular foi realizada quando a mesma espécie de *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and *C. glabrata*) foi isolada no sangue e nos sítios de vigilância do mesmo paciente. A eletroforese em campo pulsado foi realizada para os isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. A amplificação de segmentos polimórficos do DNA foi realizada para *C. albicans* e *C. tropicalis*. No total 63 pacientes consecutivos com candidemia foram incluídos no estudo no período de maio de 2004 a outubro de 2005. *C. albicans* foi isolada em 42% das hemoculturas, *C. parapsilosis* em 35%, *C. tropicalis* em 16%, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. glabrata*, e *C. holmii*, em 2% cada uma. Unicamente seis dos 10 isolados de ponta de cateter apresentaram perfil eletroforético idêntico aos isolados de *C. parapsilosis* do sangue. Os isolados de *C. albicans* do sangue e de culturas de vigilância do trato gastrointestinal correspondentes, oriundos de 12 pacientes, apresentaram genótipos idênticos. Os resultados sugerem que a colonização do trato gastrointestinal é a provável fonte de candidemia por *C. albicans* e que a candidemia por *C. parapsilosis* é de origem exógena.

Summary

Miranda, Lourdes das Neves. *Candida* colonization in individuals with candidemia (dissertation). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 120p.

In the last two decades, *Candida* spp. have emerged as important nosocomial pathogens in the world and in Brazil. The identification of the source of infection is important in approaching prevention and control strategies. Strategies for the prevention of endogenous candidiasis may focus, to a certain extent, on methods for reducing mucosal colonization, for example limitation use of wide-spectrum antibiotics. However, in cases in which an exogenous source is involved, the aggressive reinforcement of adequate healthcare practices is mandatory to prevent transmission. The objective of this study was to evaluate different *Candida* colonization sites as potential sources for *Candida* fungemia. The study was done in 3 hospitals in Brazil: the Central Institute of Hospital das Clinicas, a 1000-bed tertiary-care hospital affiliated to the University of São Paulo; the Institute Emilio Ribas, a 200-bed infectious diseases hospital, reference for all the state of São Paulo; and the General Hospital of Itapeacerica da Serra, a secondary-care community hospital located in area of the greater São Paulo. The patients with a positive blood culture for *Candida*, collected from a peripheral vein, were included in the study if they had to be hospitalized for 48 hours or more before candidemia. The following surveillance cultures for *Candida* were collected from: urine, rectum, oropharynx, skin (groin and axilla), skin around the catheter and catheter tip if available. Molecular typing was performed when the same species of *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and *C. glabrata*) was isolated from the blood and from surveillance sites of a single patient. Pulsed-field gel electrophoresis was performed for *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. glabrata* isolates. Randomly amplified polymorphic DNA was performed for *C. albicans* and *C. tropicalis*. A total of 63 consecutive patients with candidemia were included in the period from May 2004 to October 2005. *C. albicans* comprised 42% of the blood isolates, *C. parapsilosis* 35%, *C. tropicalis* 16%, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. glabrata*, and *C. holmii*, 2% each. Six of the 10 isolates from catheter tips presented identical electrophoretic profiles to corresponding *C. parapsilosis* blood cultures and no other surveillance sites were related. *C. albicans* isolates from blood and from corresponding gastrointestinal surveillance sites from 12 patients presented identical genotypes. In conclusion, our results suggest that tract gastrointestinal colonization is the probable source of *C. albicans* candidemia and that *C. parapsilosis* candidemia is not endogenous.

Sumário

1. Introdução	3
1.1. Taxonomia e biologia	3
1.2. Epidemiologia	3
1.3. Impacto da candidemia	6
1.4. Distribuição das espécies de <i>Candida</i> relacionadas a candidemia e sua implicação clínica	7
1.5. Fatores de risco	11
1.6. Identificação de <i>Candida</i>	15
1.7. Desenhos de estudo epidemiológicos	22
2. Objetivos	27
2.1. Objetivo geral	27
2.2. Objetivos específicos	27
3. Métodos	28
4. Resultados	34
5. Discussão	48
6. Conclusões	71
Anexo A	72
Anexo B	75
Anexo C	78
Anexo D	82
Anexo E	88
Referências	89

1. Introdução

Existem descrições de lesões orais, provavelmente, monilíase que datam de Hipócrates e Galeno. Em 1839, foi observada pela primeira vez, por Langenbeck, a mais importante levedura patogênica ao homem, hoje conhecida como *Candida albicans* (Mandell et al., 2005).

1.1. Taxonomia e biologia

A *Candida* pertence ao reino *Fungi*, Filo *Deuteromycotina* ou *Fungi imperfecti* (Sidrim et al., 2004). As leveduras caracterizam-se por serem unicelulares, eucarióticas, tendo como reservatório de açúcar o glicogênio. Têm como estrutura primária, células que se reproduzem por brotamento, em geral, de forma arredondada. Estas células são esporos de origem assexuada e se denominam blastoconídeos (ANVISA, 2004).

A *Candida* é colonizadora ubíqua dos seres humanos e de outros animais de sangue quente. Esta levedura reside primariamente no trato gastrointestinal, mas também pode ser encontrada como comensal na vagina, uretra, na pele e sob as unhas (Dignari et al., 2003).

1.2. Epidemiologia

A *Candida* spp. causa um espectro de infecções que variam de candidíase superficial de pele e mucosas a infecções mais graves que ameaçam a vida.

O termo candidíase invasiva compreende uma grande variedade de desordens graves que incluem a candidemia, candidíase disseminada, endocardite, meningite, endoftalmite e envolvimento de outros órgãos profundos; ficam excluídas as

doenças superficiais, como a candidíase orofaríngea e esofágica (Pappas, 2006). A infecção da corrente sanguínea (candidemia) é a apresentação clínica mais comum da candidíase invasiva e representa de 10 a 20% de todas as candidíases (Beck-Sagué et al., 1993).

Nos Estados Unidos, as espécies de *Candida* são responsáveis por 8 a 10% de infecções da corrente sanguínea (ICS) nosocomiais (Wisplinghoff et al., 2004) e são a quarta causa mais comum de ICS hospitalar (Edmond et al., 1999; CDC, 2001). Há uma incidência de 1,5 casos por 10.000 pacientes-dia ou oito infecções por 10.000 saídas hospitalares (Hajjeh et al., 2004).

Em estudos europeus comparáveis, a incidência é algo menor: 0,5 a 0,7 casos por 10.000 pacientes-dia ou 2 a 5 infecções por 10.000 saídas hospitalares (Richet et al., 2002; Marchetti et al., 2004; Arendrup et al., 2005).

No Brasil, a incidência de candidemia associada à assistência à saúde é mais alta: 3,7 casos por 10.000 pacientes-dia. Esse dado foi obtido a partir de um programa de vigilância em 11 centros médicos de atenção terciária brasileiros (Colombo et al., 2006).

Apesar das razões para esta alta taxa de infecção não serem claras, um variado número de fatores poderia estar envolvido. Entre eles, poderíamos considerar: recursos limitados disponíveis para os cuidados médicos e programas de treinamento, dificuldades na implementação de programas de controle de infecção de países em desenvolvimento, número limitado de profissionais de saúde no atendimento a pacientes de unidades de terapia intensiva (UTI) e práticas menos agressivas no tratamento antifúngico de pacientes de alto risco.

No entanto, como nos EUA, também entre nós as espécies de *Candida* estão entre a quarta causa mais comum de ICS nosocomial, indicando que estes fatores não afetam apenas a taxa de candidemia, mas todas as demais ICS (Colombo et al., 2006).

Nos Estados Unidos, no período de 1989 a 1999, foi observada uma diminuição na frequência de ICS causada por *Candida* entre pacientes de UTIs, de acordo com a base de dados do *National Nosocomial Infections Surveillance System* (NNIS) (Trick et al., 2002). Esta diminuição foi devida em grande parte a uma diminuição na incidência de ICS por *C. albicans*. Este relato contrasta com a alta incidência mantida da candidíase invasiva nas estimativas do *National Hospital Discharge Survey* (NHDS) no período de 1996 a 2003 e com os estudos de base populacional de estimativas de incidência de candidemia na Europa, Canadá e EUA (Pfaller et al., 2007).

É possível que a candidíase invasiva esteja mudando do ambiente de UTI para a população geral hospitalar. Hajjeh et al (2004) mostraram que no período de 1998 a 2000, somente 36% das candidemias ocorreram dentro de uma UTI, sendo que 28% tinham origem comunitária. Claramente, os fatores de risco associados com candidemia (colonização prévia, lesão de mucosa, uso de cateteres venosos centrais e antibioticoterapia de amplo espectro) não estão mais limitados aos pacientes de cuidados intensivos.

Lembre-mos de que, provavelmente, a verdadeira incidência pode ser o dobro das taxas publicadas, dado que a sensibilidade das hemoculturas para candidemia situa-se em torno de 50-60% (Ellepolar et al., 2005).

1.3. Impacto da candidemia

A candidemia está ainda associada com uma mortalidade bruta muito alta, da ordem de 40 a 50% na maioria das séries sem diminuição por várias décadas (Arendrup et al., 2005; Almirante et al., 2005; Pappas et al., 2005). Há grandes variações na mortalidade bruta, refletindo, principalmente, a gravidade das doenças de base. A mortalidade atribuída a candidemia, definida como a proporção de mortes diretamente relacionadas à infecção, pode ser determinada em estudos caso-controle, nos quais os ajustamentos são feitos para os fatores de confusão considerados mais apropriados (Fallaas et al., 2006).

A mortalidade atribuída por candidemia em um centro médico nos Estados Unidos entre 1997 e 2001 foi de 49% (95% CI, 38%-60%) (Gudlaugsson et al., 2003) o que foi 11% maior do que o observado no mesmo hospital entre 1983 e 1986 (Wey et al., 1988). Em outro estudo, utilizando dados de um caso-controle pareado de base populacional realizado em Baltimore, Morgan et al.(2005) estimaram a mortalidade atribuída em 19 a 24%, dependendo da idade do paciente.

Outro aspecto relevante a ser considerado, em relação aos episódios de candidemia, é o custo decorrente do atendimento ao paciente. Estudo realizado nos Estados Unidos da América definiu como sendo de US\$ 66.000 o custo relacionado à atenção a cada paciente com candidemia, sendo que a maior parte dos gastos está relacionada ao maior tempo de internação necessário para o atendimento destes pacientes (Morgan et al., 2005).

A partir destes dados, é possível concluir que a candidemia é um problema de saúde pública em hospitais terciários de todo mundo.

1.4. Distribuição das espécies de *Candida* relacionadas a candidemia e sua implicação clínica

Mais de 200 espécies de *Candida* já foram descritas, mas somente algumas estão relacionadas a doenças nos seres humanos.

Aproximadamente 95% de todas as ICS no mundo são causadas por quatro espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* (Colombo et al., 2006; Hajjeh et al., 2004; Takakura et al., 2004; Sandven et al., 2006). O restante das infecções são causadas por outras espécies, incluindo *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. norvengensis*, *C. pelliculosa*, e *C. rugosa* entre outras (Pfaller et al., 2004).

A *Candida albicans* é, sem dúvida alguma, a espécie mais freqüentemente isolada em infecções superficiais e invasivas em diferentes sítios anatômicos e em casuísticas de todas as partes do mundo. Mas, a freqüência com que esta e outras espécies de *Candida* são isoladas das hemoculturas, varia com a localização geográfica e a população estudada.

Na América do Norte, *C. albicans* foi responsável por 45-55% das candidemias durante a década de 90 (Rangel-Frausto et al., 1999; Kao et al., 1999; Diekema et al., 2002; Laupland et al., 2005; Pfaller et al. 2001) e na Europa por 50-70% (Almirante et al., 2005; Eloy et al., 2006). Em contraste, esta espécie foi a etiologia de apenas 40% das candidemias (Takakura et al., 2004; Colombo et al., 2006) em relatos recentes de vigilância de base-hospitalar no Japão e Brasil.

Esta levedura tem um potencial patogênico conhecido, apresentando como principais fatores de patogenicidade e virulência a capacidade de aderência a diferentes mucosas e epitélios, o dimorfismo com produção de estruturas filamentosas que auxiliam a invasão tissular, a termotolerância significativa, e a

produção de enzimas como proteinases e fosfolipases (Dignanni et al., 2003). Esta espécie é naturalmente sensível a todas as drogas fúngicas de uso sistêmico, mas casos de resistência adquirida a azólicos são conhecidos em pacientes que foram expostos prolongadamente a estes medicamentos. Resistência à anfotericina B é anedótica (Sanglard et al., 2002). Recentemente, *C. dubliniensis* foi reconhecida como uma nova espécie cujas características morfológicas e bioquímicas são muito semelhantes à *C. albicans*, sendo necessária a utilização de métodos moleculares para diferenciá-las (Sullivan et al., 1998).

Candida tropicalis possui considerável potencial biológico como agente oportunista quando o hospedeiro encontra-se neutropênico, quando há supressão da flora bacteriana pelo uso de antimicrobianos e danos na mucosa gastrointestinal (Goldani et al., 2003). *C. tropicalis* tem sido relatada como o segundo ou terceiro agente etiológico mais comum de candidemia em pacientes com neoplasias sendo sua frequência maior em leucemias e menor em tumores sólidos (Wingard et al., 1995). Os isolados clínicos desta espécie são sensíveis à anfotericina B e, na grande maioria das vezes, aos triazólicos (Diekema et al., 2002). Em países da América Latina, particularmente o Brasil, esta espécie é extremamente freqüente, mesmo entre pacientes não portadores de câncer, constituindo-se na segunda ou terceira principal causa de candidemia nas principais séries publicadas (Costa et al., 2000; Colombo et al., 1999; Godoy et al., 2003; Goldani et al., 2003).

Candida glabrata surge como um importante patógeno hospitalar, constituindo-se na segunda ou terceira espécie mais comum na maioria das séries de candidemia relatada nos EUA e Europa (Abi-Said et al., 1997). Em uma série de pacientes em unidades de cuidados intensivos nos Estados Unidos (Trick et al., 2003) entre 1989

e 1999, foi observado um aumento isolado da infecção da corrente sanguínea por *C. glabrata*. Entretanto, por razões pouco compreendidas, *C. glabrata* permanece como uma causa pouco comum de candidemia na América Latina onde *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são o segundo e terceiro agentes etiológicos mais freqüentes (Colombo et al., 2006; Pfaller et al., 2001). Outro aspecto interessante sobre a epidemiologia deste patógeno é sua maior ocorrência em pacientes idosos. Em estudo avaliando casuística de candidemia em 17 centros médicos do Estado de Iowa, observou-se que *C. glabrata* apresenta maior prevalência em pacientes idosos, sendo responsável por 25% de todas as fungemias documentadas em pacientes maiores de 65 anos (Diekema et al., 2002).

Isolados clínicos de *C. glabrata* apresentam menor sensibilidade ao fluconazol, sendo que a avaliação de diferentes publicações mostra que 5-10% das amostras de *C. glabrata* recuperadas no sangue apresentam-se resistentes ao fluconazol (Takakura et al., 2004). Apesar do crescente uso de fluconazol possa ter contribuído para a emergência de *C. glabrata*, é provável que outros fatores do hospedeiro de relacionados com os cuidados de saúde tenham tido um papel neste fato (White et al., 1997; Lin et al., 2005). Além dos problemas terapêuticos de infecções por *C. glabrata* associados aos azólicos, Pfaller e cols. (2001) tem documentado a menor susceptibilidade de isolados desta espécie em relação à anfotericina.

C. parapsilosis é mais comum que a *C. glabrata* na Europa e América Latina (Godoy et al., 2003; Pfaller et al., 2004; Costa et al., 2000; Colombo et al., 2006). Sua ocorrência é ainda maior em crianças e recém-nascidos prematuros internados em unidades de terapia intensiva, onde a prevalência de candidemias por *C. parapsilosis* é de 17 a 50% dos casos (Almirante et al., 2006; Fridkin et al., 2006;

Saiman et al., 2000). Caracteristicamente, *C. parapsilosis* prolifera-se em soluções contendo glicose, tem grande capacidade de produzir biofilme (Branchini et al., 1994; Kuhn et al., 2002) e freqüentemente coloniza a pele (Clark et al., 2004; Kuhn et al., 2004; Bonassolia et al., 2005). Vários estudos estabelecem claramente uma associação entre a utilização de cateter venoso em posição central e maior ocorrência de fungemia por *C. parapsilosis* (Brito et al., 2006; Diekema et al., 1997; Levin et al., 1998) e disseminação nosocomial através da colonização das mãos dos profissionais de saúde (Silva et al., 2003; Lupetti et al., 2003). Isolados clínicos desta espécie são sensíveis a anfotericina e aos triazólicos (Sanglard et al., 2002).

Candida krusei tem-se mostrado como um patógeno hospitalar ocasional, particularmente em pacientes portadores de doenças hematológicas malignas e/ou submetidos a transplante de medula óssea (Iwen et al., 1995). Alguns autores relataram aumento da ocorrência de fungemias causadas por *C. krusei* em pacientes neutropênicos expostos prolongadamente ao fluconazol (Wingard et al., 1995). Esta levedura é naturalmente resistente ao fluconazol e talvez isso explique seu aumento em pacientes neutropênicos expostos a este antifúngico.

Candida lusitanae é uma levedura pouco freqüente como agente causador de doença invasiva, mas tem sido relatada como agente de candidemia em pacientes imunocomprometidos. De um total de 86 casos de doença invasiva por esta espécie, 70 foram identificadas em pacientes com câncer. Frequentemente, isolados clínicos de *C. lusitanae* têm resistência natural à anfotericina B, mas são sensíveis a triazólicos (Merz et al., 1994).

Infecções invasivas por *C. guilliermondii* são ainda pouco freqüentes, mas esta espécie vem sendo reconhecida por diferentes autores como agente emergente. A

maioria dos casos descritos relaciona-se a pacientes com câncer. Em relação a seu tratamento, apesar do número limitado de informações disponíveis na literatura, há relatos de resistência *in vitro* de amostras clínicas a anfotericina B, assim como documentação de má resposta clínica de pacientes tratados com este poliênico (Hazen et al., 1995).

1.5. Fatores de risco

Dentre as admissões hospitalares, determinados indivíduos são bem conhecidos pelo risco aumentado em adquirir candidemia durante a hospitalização: pacientes com malignidades hematológicas ou neutropenia, aqueles submetidos à cirurgia gastrointestinal, prematuros e pacientes acima de 65 anos de idade (Abi-Said et al., 1997; Blumberg et al., 2001; Eggimann et al., 2003; Marr et al., 2000).

Os fatores de risco independentes estabelecidos para a candidemia não mudaram substancialmente nas duas últimas décadas (Diekema et al., 2004; Ostrosky-Zeichner et al., 2006; Pfaller et al., 2003; Prentice et al., 2000; Puzniak et al., 2004). São eles: agentes antimicrobianos de amplo espectro, quimioterapia contra o câncer, colonização por *Candida* spp. em mucosas, cateter vascular (especialmente cateter venoso central), nutrição parenteral total, neutropenia, cirurgia prévia (especialmente gastrointestinal) e insuficiência renal ou hemodiálise. Cada um destes fatores pode aumentar risco de candidemia nosocomial em 1,7 a 18 vezes sobre os controles sem estes fatores específicos ou exposições.

Principais estudos sobre fatores de risco

Existem vários estudos sobre fatores de risco que foram desenvolvidos nas últimas décadas.

A partir de sua leitura atenta, observa-se que, apesar do possível papel sugerido para cada fator de risco, não está clara uma relação causal com a candidemia. Em alguns casos é mais razoável considerar que tais fatores de risco são apenas marcadores associados à gravidade da doença de base e de outras condições predisponentes (Ostrosky-Zeichner et al., 2004).

Por isso escolhemos cinco destes estudos, que consideramos os mais representativos, para fazermos breves considerações sobre a forma particular pela qual a candidíase é por eles abordada.

O primeiro trabalho é o clássico de Wey e Pfaller (1989), em que fizeram um estudo caso-controle pareado, no qual avaliaram 28 fatores de risco em 88 pares hospitalizados no período de 1983 a 1986.

O fator de risco mais importante encontrado na análise univariada foi o uso prévio de antibióticos. O grupo que recebeu 3-5 antibióticos, quando comparado com o dos que recebem de 0-2 antibióticos, teve uma OR (*odds ratio*) de 12.5.

Na análise multivariada, os resultados apontaram como fatores de risco o número de antibióticos prévios à infecção (OR=1,73 para cada aumento de uma unidade no número de antibióticos), colonização (OR=10,37), hemodiálise prévia (OR=18,13) e uso prévio de cateter de Hickman (OR=7,23).

Outro estudo, também clássico, de autoria de Abi-Said (1997), avaliou retrospectivamente 491 casos, no período de 1988 a 1992. Os fatores de risco identificados na análise multivariada foram: neutropenia, gravidade da doença, esteróides, cirurgia, quimioterapia.

Pitet et al. (1994), por sua vez, estudaram 650 indivíduos, incluindo recém-nascidos, submetidos a procedimentos cirúrgicos. Foram colhidas amostras para pesquisa de

colonização em orofaringe, traquéia e estômago. Na análise multivariada, os fatores de risco para candidemia foram a densidade de colonização e a gravidade da doença (Apache II).

O *National Epidemiology of Mycosis Survey* (NEMIS) foi uma coorte em 6 UTIs cirúrgicas durante 2 anos – 4.276 pacientes acompanhados. Foram observados como fatores de risco na análise multivariada: cirurgia prévia, insuficiência renal, nutrição parenteral total, cateter de triplo lúmen. A colonização (coletas de cultura de reto e urina semanalmente) não foi identificada como fator de risco na análise univariada e multivariada (Blumberg et al., 2001).

O uso de quinolona e a colonização por *Candida* foram fatores de risco entre 585 indivíduos com câncer (Marr et al., 2000).

No Brasil, foram analisados 270 casos de candidemia em dois hospitais universitários. Na análise multivariada, os fatores de risco foram: neutropenia grave (OR=9,14), uso de corticosteróides (OR=3,17), exposição intensa a antibiótico – uso prévio de ≥ 2 antibióticos por no mínimo 14 dias (OR=2,93) (Nucci et al., 2002). Em estudo de caso-controle a análise multivariada apresentou associação entre candidemia e candidúria. Entretanto, não foi possível definir se a candidúria era fonte de candidemia (Binelli et al., 2006).

A fim de criar um escore “*Candida score*” e definir uso precoce de antifúngicos (em pacientes de UTI) em indivíduos não-neutropênicos foram avaliados alguns fatores de risco em estudo multicêntrico, prospectivo espanhol (73 UTIs clínico-cirúrgicas espanholas – 1699 pacientes). A colonização por *Candida* (secreção traqueal, urina e fluido gástrico) foi avaliada semanalmente até a alta. Um modelo de regressão logística permitiu aos autores identificar fatores de risco independentes.

O “Candida score” foi obtido somando o peso estatístico de cada um deles: sepse clínica (2 pontos), cirurgia (1 ponto), nutrição parenteral total (1 ponto) e colonização por *Candida* de múltiplos sítios -2 ou mais sítios (1 ponto). Qualquer paciente com pontuação igual ou maior a 2,5 pontos tinha indicação de iniciar antifúngico (Leon et al., 2006).

Há poucos estudos sobre a fonte de candidemia (Nucci et al., 2001). O principal reservatório endógeno de espécies de *Candida* tem sido considerado o trato gastrointestinal (TGI) (Mellado et al., 2000; Pfaller et al., 1996) entretanto aumentam as evidências de aquisição exógena de espécies de *Candida* (Sanchez et al., 1993; Isenberg et al., 1989; Posteraro et al., 2004; Lupetti et al., 2002).

Há relatos da transmissão de espécies patógenas de *Candida* a pacientes de alto-risco via infusões contaminadas, instrumentos biomédicos ou as mãos dos trabalhadores de saúde (Levin et al., 1998; Moro et al., 1990; Sherertz et al. 1992).

Os dados existentes sugerem que o trato gastrointestinal é a fonte de infecção em pacientes neutropênicos (Pitet et al., 1994; Uzun et al., 2001). Por outro lado, a fonte de infecção na população cirúrgica (Abi-Said et al., 1997) e nos pacientes cirúrgicos é escassamente estudada (Santucci et al., 2003).

A identificação da fonte desta infecção é importante pelas implicações nas estratégias de prevenção e controle. Estratégias para prevenção da candidíase endógena devem focalizar, em parte, os métodos para diminuir a colonização das mucosas, incluindo o uso racional de antibióticos de amplo espectro (Pfaller et al., 1995). O uso de agentes antifúngicos para diminuir a colonização de mucosas é questionável devido à possibilidade do desenvolvimento de resistência e seleção de espécies menos sensíveis a estas drogas (Wingard et al., 1991). Nos casos em que

uma fonte exógena está envolvida, medidas rigorosas de controle de infecção hospitalar são uma exigência a fim de prevenir a transmissão cruzada.

1.6. Identificação de *Candida*

A identificação do gênero *Candida* baseia-se inicialmente na morfologia das colônias.

Do ponto de vista macroscópico, em sua maioria, as leveduras são evidenciadas nos meios de cultura, como o Sabouraud, como colônias de aspecto cremoso, às vezes intensamente mucóides, com variações de tons que vão do branco ao creme.

O exame microscópico de uma colônia, através de preparações com solução salina — lactofenol azul de algodão ou corante de Gram —, permite sua caracterização definitiva, classificando-a em fungo filamentoso ou levedura. A *Candida*, sendo uma levedura, apresenta-se caracteristicamente à microscopia pelo achado de estruturas redondas ou ovais em brotamento (blastoconídeos), associadas ou não à presença de hifas e pseudo-hifas (Abi-Said et al., 2004).

Até esta etapa, pode-se ter a certeza de que o isolado em estudo é uma levedura, mas não se pode ainda definir sua espécie.

Em alguns casos, certos achados podem orientar quanto ao gênero ou espécie em questão, podendo-se, por exemplo, estabelecer a identificação presuntiva de *Rhodotorula* spp e *Cryptococcus* spp. pelo aspecto da colônia.

Prosseguindo-se na identificação, seguem-se novas provas morfológicas e bioquímicas:

Prova do tubo germinativo:

É um método simples de triagem que permite a distinção entre *C. albicans* ou *C. dubliniensis* (tubo germinativo positivo) de outras espécies de levedura (tubo

germinativo negativo). Mais de 90% dos isolados de *C. albicans* provenientes de material clínico produzem tubo germinativo quando incubados em condições adequadas.

O tubo germinativo é uma projeção alongada, que emerge da levedura, quando esta entra em contato com soro humano ou de outros animais, à temperatura de 37°C, durante 2 a 3 horas.

Prova do microcultivo:

A prova do microcultivo possibilita o estudo micromorfológico das leveduras em meio de agar-fubá-Tween80 ou agar-arroz-Tween80. A técnica baseia-se no princípio de que a incubação das leveduras, em meio com Tween 80 e sob baixa tensão de oxigênio, estimula a produção de conídios e filamentação, sendo possível sugerir o gênero, ou até mesmo a espécie, através do estudo da presença e disposição dos blastoconídeos, artroconídeos, hifas verdadeiras e pseudo-hifas.

A presença de blastoconídeos sem hifas ou pseudo-hifas induz à suspeita de *Cryptococcus* spp., *C. glabrata*, *Rhodotorula* spp. ou *Saccharomyces* spp.

A morfologia característica de cada isolado auxilia muito na determinação da espécie. No entanto, em geral, é preciso realizar provas bioquímicas adicionais para confirmar a identificação.

CHROMagar Candida®:

Na década de 90 foi lançado o CHROMagar Candida® (Microbiology) (Pfaller et al., 1996), meio de isolamento cromogênico capaz de fazer a identificação presumtiva das espécies de levedura mais comumente isoladas de material clínico. O meio CHROMagar Candida é valioso para diferenciar culturas mistas que poderiam se perder durante a semeadura convencional em meio sólido) (Powell et al., 1998).

Seu princípio é a produção de cor nas colônias por reações enzimáticas espécie-específicas, com um substrato cromogênico do meio.

A sensibilidade e especificidade do método excedem 99% para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, que geram, respectivamente, colônias de coloração verde, azul e rosa-pálida. A leitura do teste é realizada após 72 a 96 horas do crescimento do cultivo.

Assimilação de carboidratos:

A assimilação de carboidratos é a habilidade que uma levedura tem de crescer aerobicamente na presença de determinado carboidrato fornecido como única fonte de energia.

O ID 32C® (BioMérieux) é um sistema de identificação comercial. Este *kit* consiste em galerias plásticas contendo microcúpulas com carboidratos desidratados. Nestas se inocula a suspensão da levedura e incuba-se sob temperatura adequada ($29^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) por 24-48 horas.

Seus resultados são baseados na assimilação de 29 açúcares como fonte de carbono para *Candida*, associado à resistência a cicloeximida e à capacidade de metabolizar a esculina. As provas positivas podem ser traduzidas pela turvação da microcúpula. Os perfis bioquímicos obtidos nas reações são transformados em perfil numérico. Os resultados obtidos são transcritos e comparados com os perfis listados no índice (padrão) (Deak et al., 1993; Gutierrez et al., 1994).

Tipagem molecular

Define-se tipagem epidemiológica como a caracterização mais detalhada de um microrganismo com a finalidade de evidenciar a sua possível relação genética com outros isolados clínicos pertencentes à mesma espécie.

É utilizada para responder à questão sobre se dois ou mais isolados clínicos de uma mesma espécie são “iguais” ou “diferentes” (Sader et al., 1995).

Esta pergunta pode surgir em investigação de surtos hospitalares, no manejo de pacientes, ou em estudos de patogênese. Várias técnicas laboratoriais têm sido empregadas com este objetivo e constituem ferramentas valiosas para profissionais clínicos e epidemiologistas.

Em geral, se os isolados são classificados como diferentes por pelo menos um método de tipagem, eles são considerados como cepas diferentes. Cepas de uma mesma espécie que possuam características genéticas idênticas são classificadas como pertencentes a um mesmo clone, indicando uma origem comum.

A sensibilidade e a especificidade são parâmetros empregados na avaliação da performance de testes laboratoriais. Porém, estes parâmetros não se aplicam às técnicas de tipagem. São aplicados os critérios de performance (eficácia): tipabilidade, reprodutibilidade, poder discriminatório e concordância entre os sistemas de tipagem (Gales et al., 2004).

A tipabilidade avalia a capacidade de o método proporcionar resultados bem definidos para cada um dos isolados clínicos avaliados, enquanto a reprodutibilidade se refere à habilidade do sistema de tipagem em produzir resultados idênticos, quando um mesmo isolado é tipado diversas vezes. O poder discriminatório é a capacidade da técnica em diferenciar cepas não relacionadas epidemiologicamente.

Os métodos de tipagem epidemiológica podem ser divididos em métodos fenotípicos e genotípicos. Os fenotípicos detectam características expressas pelos

microrganismos. Já os métodos genotípicos, que são os que envolvem análise direta do DNA cromossômico ou extracromossômico.

Devido aos problemas com relação a tipabilidade, à reprodutibilidade e ao poder discriminatório associado aos métodos fenotípicos, diversos métodos genotípicos foram desenvolvidos nas últimas décadas.

Neste estudo, daremos ênfase a dois métodos genotípicos de tipagem molecular:

- Amplificação de segmentos polimórficos do DNA – RAPD (*Random Amplified Polymorphic of DNA*);
- Eletroforese em campo pulsado – PFGE (*pulsed-field eletrophoresis*).

Estes métodos baseiam-se na análise do DNA cromossômico.

Adicionalmente, observemos que o número de cromossomas em algumas espécies de *Candida* foi determinado: *C. albicans*, 8; *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, 14; *C. tropicalis*, 12.

O tamanho dos cromossomas varia de 0,5 a 4,5 Mb.

Amplificação de segmentos polimórficos do DNA – RAPD

O PCR (*polymerase chain reaction*) é uma técnica que permite a síntese enzimática de seqüências específicas de DNA, amplificando-as exponencialmente.

Já o RAPD (Gil-Lamaignere, et al., 2003), embora baseado nessa reação em cadeia da polimerase, pode ser aplicado universalmente. É uma técnica randômica, ou seja, através dela obtemos diversos pequenos segmentos arbitrários, não exigindo conhecimento prévio do organismo examinado.

Ambas as técnicas requerem *primers* (iniciadores) que são oligonucleotídeos sintéticos, com cerca de dez a vinte bases, com orientação oposta, e seqüências de bases complementares a sítios presentes em cada fita do DNA.

O procedimento, em ambas as técnicas, consiste de três etapas:

- 1) desnaturação do DNA a altas temperaturas, na qual a cadeia dupla DNA separa-se em duas fitas simples;
- 2) pareamento (anelamento), com ligação dos *primers*;
- 3) extensão dos *primers* por reação em cadeia da polimerase do DNA, produzindo duas hélices que são cópias do DNA original. Este pequeno trecho é amplificado milhões de vezes (Saunders et al., 1996).

O método do RAPD envolve a amplificação aleatória de segmentos do DNA alvo usando um *primer* pequeno (10 bases) de sequência arbitrária de nucleotídeos, ou seja, que não tem nenhuma homologia conhecida com a sequência alvo.

Este *primer* leva à amplificação de uma ou mais seqüências de DNA, gerando um conjunto de fragmentos que funcionam como marcadores genéticos. O método não requer clivagem dos fragmentos amplificados (*amplicons*), pois são gerados vários fragmentos de diversos tamanhos. O número e o tamanho destes fragmentos são a base da tipagem de um isolado.

A vantagem deste método sobre os outros é sua relativa rapidez e simplicidade, além de apresentar boa reprodutibilidade intralaboratorial.

O poder discriminatório é variável e depende do número e seqüência de nucleotídeos dos *primers* empregados. Quando um único *primer* é utilizado o poder discriminatório é baixo; a utilização de dois ou mais *primers* aumenta o seu poder discriminatório, porém, aumenta o tempo necessário para a realização do teste.

Eletroforese em campo pulsado – PFGE

Esta técnica proporciona a separação de moléculas de DNA maiores que 2000 kilobases, com excelente resolução (Schwartz et al., 1984; Kaufmann et al., 1996).

Para a realização da PFGE, a levedura pode ser cultivada em meio sólido ou líquido. As colônias são misturadas com agarose com ponto de fusão baixo e esta mistura é distribuída em pequenos moldes. Como resultado, obtemos pequenos blocos de agarose (*plugs*), que contém toda a levedura. Desta forma o DNA fica protegido de quebras e degradação.

Na etapa seguinte, estes blocos de agarose são submetidos, primeiramente, à lise celular com enzimas que vão romper a parede e a membrana celular, e, em seguida, a lavagens com detergentes que eliminarão os resíduos das células.

Os blocos de agarose com as leveduras são então colocados em géis de agarose e submetidos à corrente elétrica que se alterna periodicamente de acordo com a programação estipulada, sendo que a migração do DNA ocorre do polo positivo, para o polo negativo.

Existem diferentes sistemas de PFGE para resolução de moléculas de grande peso molecular, com diferença na velocidade de separação de moléculas, e na resolução de bandas de tamanho específico. O aparelho mais comumente usado é o CHEF (*contour clamped homogeneous electric field*), com alternância dos ângulos do campo elétrico. Vinte e quatro eletrodos são dispostos de forma hexagonal em uma cuba de eletroforese, a 120° um do outro, sendo a voltagem distribuída através destes. O gradiente de voltagem incide de forma constante no gel em angulação específica e intervalos previamente determinados (Chu et al., 1986). O tempo requerido para os fragmentos de DNA de diferentes tamanhos se reorientarem no novo campo elétrico é proporcional ao seu peso molecular, permitindo a separação dos fragmentos de DNA. Fragmentos maiores gastam um maior tempo de reorientação no novo campo elétrico, ao passo que fragmentos menores migram

mais rápido. A maior vantagem deste método, seria a capacidade de separar um grande número de amostras de DNA, com excelente poder discriminatório, sensibilidade, e alta reprodutibilidade.

No final da eletroforese o gel é corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

Análise do DNA genômico utilizando enzimas de restrição seguida por eletroforese em campo pulsado – REAG

Após extração do DNA genômico segue-se a digestão com enzimas de restrição, que cortam o DNA em sítios comuns, gerando fragmentos de diferentes tamanhos. A seguir, as amostras são submetidas à eletroforese em campo pulsado, e visualizam-se as bandas formadas após a digestão do DNA. Esta técnica identifica espécies não relacionadas epidemiologicamente como diferentes, e é capaz de identificar isolados epidemiologicamente relacionados de um surto hospitalar. Um dos problemas deste método, é a quantidade de bandas obtidas no gel, que pode dificultar a interpretação (Doebbeling et al., 1993; Zhang et al., 1997).

1.7. Desenhos de estudo epidemiológicos

O estudo da relação entre candidemia e suas correlações coloca-nos frente a desafios e paradoxos que exigem do pesquisador plasticidade e acuidade em sua investigação.

No caso específico do estudo a que se refere este trabalho, esta questão se apresentou desde o seu início.

A abordagem que, à primeira vista, nos parecia a mais recomendada de um ponto de vista tradicional, seria a de um estudo de coorte, que nos permitisse o

acompanhamento de uma clara seqüência temporal de causa-efeito, já que o fator de risco (colonização) seria medido previamente à detecção do efeito (candidemia). Este tipo de desenho de estudo, no entanto, manifestava-se evidentemente inviável, dadas as disponibilidades de recursos e de pessoal disponíveis e pouco adequado para condições com baixa incidência. Necessitaria de um elevado número de participantes seguidos durante um longo período de tempo, com coletas semanais de culturas de vigilância de cada paciente.

Pesados prós e contras, a opção foi por um modelo de desenho de estudo transversal, muito mais viável do ponto de vista das disponibilidades existentes e mais direcionado à identificação de informações qualitativas sobre o quadro.

Do ponto de vista metodológico, essa opção pelo desenho — no nosso caso, pelo estudo transversal — merece consideração especial, já que é a ferramenta fundamental para respondermos às perguntas propostas na investigação (Fernández et al., 2005).

Bloch e Coutinho (2004) observam que uma pesquisa epidemiológica se constitui em uma “coleta sistemática de informações sobre eventos relacionados à saúde numa população definida e sua quantificação”.

Segundo esses autores, são três os procedimentos através dos quais é feito o tratamento numérico das informações obtidas:

- a) mensuração de variáveis aleatórias,
- b) estimação de parâmetros populacionais,
- c) testes estatísticos de hipóteses.

São os desenhos de estudo que permitirão a operacionalização do teste de hipóteses.

Os desenhos de estudos epidemiológicos diferem entre si pelo modo como selecionam as unidades de observação, mensuram os fatores de risco ou de prognóstico, identificam as variáveis de desfecho e garantem a comparabilidade entre os grupos que fazem parte do estudo.

Através deles se obtém a observação sistemática dos fenômenos de interesse, a partir de um referencial teórico definido, o que nos permite a utilização de métodos estatísticos para a análise dos dados e a interpretação dos achados, incluindo a comparação de informações provenientes de diferentes grupos investigados, com o objetivo de identificar associações estatísticas entre variáveis.

O modo pelo qual os indivíduos são alocados nos grupos a serem investigados e comparados, assim como o tipo de controle que o investigador mantém sobre a exposição dos mesmos ao fator de risco ou de prognóstico, permite a classificação dos desenhos de estudo em três amplas categorias:

1. Experimentais – a chave dos estudos experimentais é a alocação aleatória dos indivíduos em diferentes grupos de exposição aos fatores julgados de risco ou de prognóstico. A alocação com base no acaso garante a todos os indivíduos a mesma probabilidade de pertencer a qualquer um dos grupos que serão comparados. Outra característica desses estudos é que o investigador controla a exposição ao fator de interesse. Questões éticas fazem com que tais estudos se restrinjam a fatores considerados com potencial influência positiva (protetores) sobre a saúde. Os ensaios clínicos (terapêuticos ou profiláticos) constituem os estudos experimentais mais comuns em epidemiologia.
2. *Quase*-Experimentais – nos quais a alocação dos indivíduos nos grupos a serem comparados não é aleatória, embora o investigador continue exercendo controle

sobre o fator em estudo. São estudos direcionados mais freqüentemente a uma ou mais populações, ao invés de indivíduos.

3. Observacionais – não há controle nem sobre a alocação dos indivíduos nem sobre a exposição aos fatores investigados, por parte do investigador, que se utiliza de uma situação existente a partir da qual observa os resultados.

A investigação a que se refere o presente trabalho se insere entre os estudos observacionais.

Cabe, então, considerarmos suas características e particularidades.

Os estudos observacionais são, classicamente, classificados em três grandes grupos, a saber:

1. Estudos de coorte. São estudos que seguem um desenho de observação longitudinal, nos quais indivíduos não portadores da doença de interesse são classificados em grupos segundo o grau de exposição a um possível fator de risco ou de prognóstico. São, então, acompanhados, para se aferir a ocorrência da doença em cada grupo, realizando-se pelo menos duas observações em momentos diferentes.

2. Estudos de caso-controle. São aqueles nos quais partimos da identificação dos doentes e os classificamos conforme o grau de exposição ao fator de risco ou prognóstico de interesse. Também é um estudo longitudinal, dado que a informação sobre a exposição e a doença se refere a momentos diferentes. Os estudos de caso-controle têm como característica fundamental uma amplitude de investigação mais estreita, já que são focados sobre portadores da doença investigada.

3. Estudos seccionais ou transversais (Klein et al., 2004). Caracterizam-se pela observação direta de uma amostra previamente calculada de indivíduos em uma

única oportunidade. A expressão estudo transversal, que também adotamos no presente trabalho, vem se consolidando como denominação alternativa para as estratégias de delineamento seccionais (Fernández et al., 2005).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Verificar se a espécie de *Candida* isolada do sangue de indivíduos com candidemia de aquisição hospitalar é da mesma linhagem daquelas obtidas em outros sítios.

2.2. Objetivos específicos

Identificar as espécies de *Candida* envolvidas na infecção sistêmica e na colonização de diversos sítios.

Correlacionar as espécies *Candida* isoladas nas hemoculturas e nos sítios de colonização, incluindo as características clínicas e demográficas dos pacientes com candidemia nesta correlação.

3. Métodos

Locais de estudo

O estudo foi desenvolvido nas seguintes instituições:

- ❖ Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo (IC-HC). É um hospital universitário de nível terciário de complexidade, com 948 leitos, 12 UTIs, aproximadamente 36.000 internações/ano, sendo 13.000 oncológicas.
- ❖ Hospital Geral de Itapecerica da Serra – OSS, hospital de nível secundário com 201 leitos e 17 leitos de UTI.
- ❖ Instituto de Infectologia Emílio Ribas com 200 leitos.

Desenho do estudo

Estudo transversal.

População do estudo

Todo paciente com candidemia admitido há mais de 48 horas em qualquer das instituições nas quais o estudo foi desenvolvido.

A candidemia foi definida como o isolamento de *Candida* em uma ou mais hemoculturas obtidas de veia periférica após 48 horas da admissão (Garner et al., 1988).

Apenas o primeiro episódio de candidemia foi considerado para cada paciente.

Microbiologia

A solicitação e coleta de hemoculturas atenderam à investigação diagnóstica de rotina dos médicos assistentes de cada paciente. O processamento (Anexo A) foi

realizado no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo ou nos laboratórios de microbiologia das demais instituições.

Através de vigilância ativa no Laboratório de Microbiologia, observava-se o crescimento de *Candida* nas hemoculturas. Quando esta se apresentava, o paciente-fonte da hemocultura era identificado. Caso atendesse aos critérios de inclusão no estudo e após o consentimento do paciente ou responsável (Anexo B) foram coletadas amostras de vigilância: urina, *swabs* de reto, cavidade oral, pele ao redor do cateter e pele (Anexo A).

No período de aproximadamente dez dias após a inclusão do paciente no estudo, caso houvesse outras amostras clínicas (ponta de cateter, biópsia), estas também eram incluídas no estudo.

Os isolados clínicos (hemocultura, ponta de cateter e biópsia) e as amostras de vigilância eram então encaminhadas ao Laboratório de Investigação Médica em Bacteriologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo (LIM 54) e semeados imediatamente em meio CHROMagar *Candida*.

As amostras eram incubadas à temperatura de 30°C, sendo consideradas negativas caso não ocorresse crescimento em até 21 dias.

Ocorrendo crescimento, estas colônias eram submetidas à identificação pelo ID 32C® (BioMérieux). No caso da visualização de colônias de cores diferentes, era realizada identificação fenotípica de uma amostra de cada cor do isolado.

Quando os isolados da cultura de vigilância ou amostra clínica eram da mesma espécie do isolado do sangue, realizava-se a tipagem molecular.

As cepas de *Candida* isoladas só foram utilizadas para os objetivos propostos no presente estudo.

Tipagem molecular

Como já salientamos, a tipagem molecular dos aglomerados de *Candida* isolados em sangue e sítios de vigilância só foi realizada quando os fungos obtidos eram da mesma espécie.

Optou-se pelas seguintes técnicas:

- ❖ Amplificação de segmentos polimórficos do DNA – RAPD (Aoki et al., 1999; Binelli et al., 2006) (Anexo C)
- ❖ Eletroforese em campo pulsado – PFGE, incluindo cariotipagem eletroforética (EK) (Shin et al., 2001) (Anexo D) e análise do DNA genômico utilizando enzimas de restrição seguida por eletroforese em campo pulsado – REAG (Shin et al., 2005; Chen et al., 2005) (Anexo E).

A análise dos perfis foi realizada por dois investigadores de forma independente e cega, através da inspeção visual das fotografias dos géis, tingidos com brometo de etídio. Cada banda foi identificada e a distância à origem do gel relacionada com o peso molecular padrão. As cepas foram consideradas diferentes quando ao menos uma banda não coincidia (Rho et al., 2004).

Os padrões eletroforéticos de isolados de sangue de *C. albicans* e *C. tropicalis* também foram analisados por um dendograma utilizando o *software* AlphaEase FC (Alpha Innotech, San Leandro, CA, EUA). Nesta análise, os isolados foram considerados diferentes quando a similaridade entre cepas foi menor que 95%.(Shin et al., 2005).

Coleta de dados

Foram coletadas as seguintes informações dos prontuários, sempre conforme descrição do médico assistente neles registradas:

1. Dados demográficos:
2. Sexo: masculino, feminino.
3. Idade: anos completos (quando paciente tiver mais de um ano de vida), meses completos (quando não completou um ano de vida), dias (recém-nascido).
4. Idoso: indivíduo com idade igual ou maior a 65 anos.
5. Unidade de internação: em razão dos critérios de inclusão, foi considerada a unidade em que o paciente se encontrava internado por, pelo menos, 48 horas. No caso de pacientes transferidos e com permanência inferior a este limite, considerou-se como local de coleta da hemocultura o setor anterior de internação.
6. Tempo de internação: dias prévios à hemocultura positiva.
7. Destino: alta, transferência ou óbito, nos primeiros 30 dias após a positividade da hemocultura, conforme anotações no prontuário.
8. Condições clínicas do paciente:
9. Queimadura: superfície de área queimada relatada.
10. Prematuridade: nascimento antes de 37 semanas (menos de 259 dias).
11. Neutropenia: contagem de neutrófilos menor $500/\text{mm}^3$ nas últimas duas semanas prévias à fungemia (Abi-Said et al., 1997).

12. *Diabetes mellitus*, SIDA, lupus: conforme registro.
13. Neoplasias: conforme registro, com sua localização correspondente.
14. Transplante de medula óssea ou transplante de órgãos: conforme registro.
15. Gravidade da doença: Avaliação pelo APACHE II (Knaus et al., 1985), do dia da hemocultura positiva.
16. Procedimentos:
17. Cateter venoso central: uso prévio em até 30 dias antes da hemocultura positiva.
18. Procedimento cirúrgico: ocorrência em até 30 dias antes da hemocultura positiva.
19. Cateter urinário: uso prévio em até 30 dias da hemocultura positiva.
20. Hemodiálise e diálise peritoneal: uma sessão nos últimos 30 dias da hemocultura positiva.
21. Nutrição parenteral total: ocorrência no período até 30 dias antes da hemocultura positiva.
22. Medicamentos:
23. Antibióticos: Número de dias exposto a vários antibióticos (β -lactâmicos, aminoglicosídeos, vancomicina, sulfa-trimetoprim, rifampicina, metronidazol). O número total de classes de antibióticos administrados. O número total de dias que todos os antibióticos foram administrados. Somente aqueles antibióticos administrados pelo menos por um período de 24 horas foram considerados.

24. Corticoterapia: Administração de dose maior igual 15 mg de prednisona diariamente por pelo menos uma semana, previamente a fungemia (Ang et al., 1993).
25. Quimioterápicos: uso nos últimos 30 dias prévios a fungemia.
26. Antifúngico: uso nos últimos 30 dias, com informação da droga, data de início e duração da terapia.

Análise de dados

Foram utilizadas variáveis categóricas e contínuas na descrição da população estudada. Foram avaliados os padrões de distribuição por meio de porcentagem, média, desvio padrão e mediana.

A análise dos resultados de tipagem molecular deve permitir a avaliação de quais sítios foram colonizados por fungos de mesma espécie e mesma origem clonal que aquela isolada de sangue, sugerindo a fonte da candidemia. Para todos os métodos de tipagem, os isolados foram considerados iguais, se os perfis eletroforéticos fossem idênticos, e diferentes, quando o perfil de corrida eletroforética tinha mais que uma banda detectável diferente na inspeção visual.

Ética

Este projeto foi avaliado e aprovado nas Comissões de Ética das três instituições: Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo (IC-HC) - número do parecer 422/03; Hospital Geral de Itapetecica da Serra – OSS aprovado em 25 de abril de 2003; e Instituto de Infectologia Emílio Ribas – número do parecer 265/04.

4. Resultados

Dados clínico-demográficos

No período de maio de 2004 a outubro de 2005 os critérios de inclusão foram preenchidos por 76 pacientes consecutivos no HC-FMUSP, sendo excluídos 17 (11 óbitos recentes, não obtenção do consentimento informado em dois pacientes e outros quatro pacientes por perda de isolados de hemoculturas). Foram incluídos dois pacientes de cada uma das outras unidades hospitalares, IIER e HGIS.

Foram obtidas 63 hemoculturas. A distribuição das candidemias é apresentada na tabela 1. As espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* foram as mais frequentes.

O tempo médio de internação, entre admissão e a data da coleta da hemocultura positiva, foi de 34 dias $\pm$ 46 dias (média $\pm$ desvio padrão), mediana de 23 dias com variação de 3 a 330 dias.

As características demográficas, clínicas e destino dos pacientes são apresentados na tabela 2.

A distribuição por faixa etária foi a que segue: 18 crianças (29%) e 14 indivíduos acima de 65 anos (22%). Entre os recém-nascidos (RNs), 14 (93%) eram prematuros.

Houve predomínio de RNs entre os 22 pacientes com candidemia por *C. parapsilosis*, sendo que com a exceção de uma criança, todos foram prematuros de muito baixo peso (mediana 1.125 g; variação de 620 a 2.790 g).

Dentre as condições clínicas associadas à candidemia, a presença de neoplasia foi a mais comum (29%), seguida por prematuridade (22%) e diabetes (10%).

Foi observado que 23 (37%) pacientes tiveram pelo menos um procedimento cirúrgico: abdominal 16 (25%), neurológico 7 (11%), torácico 6 (10%) e vascular 2 (3 %).

A letalidade foi alta (tabela 2): entre os RNs a proporção foi de 53%, entre crianças (> 1 mês) e adultos foi, respectivamente, de 0 e 39% e entre os idosos de 50%.

Sete (60%) RNs com candidemia por *C parapsilosis* faleceram. Destes RNs, cinco apresentavam cateter venoso central (CVC) no dia da hemocultura. A mediana do intervalo de tempo entre o diagnóstico e a retirada do dispositivo foi de 8 dias (variação de 2 a 11 dias).

A quantidade de antibióticos prévios por paciente teve uma mediana de três (variação de 0 a 6 antibióticos). Em média, os pacientes foram expostos aos antibióticos por 40 ± 32 dias.

Tabela 1 - Resultados de identificação de 63 hemoculturas com *Candida* sp. isoladas em pacientes no período de maio de 2004 a outubro de 2005

Espécie de <i>Candida</i>	N (%)
<i>Candida albicans</i>	26 (42)
<i>Candida parapsilosis</i>	22 (35)
<i>Candida tropicalis</i>	11 (16)
<i>Candida guilliermondii</i>	1 (2)
<i>Candida krusei</i>	1 (2)
<i>Candida glabrata</i>	1 (2)
<i>Candida holmii</i>	1 (2)

Tabela 2- Características de 63 pacientes com isolamento de *Candida* sp. em hemocultura no período de maio de 2004 a outubro de 2005

Característica	Número (%) de pacientes			
	<i>Candida</i> sp (N=63)	<i>C. albicans</i> (N=26)	<i>C. parapsilosis</i> (N=22)	<i>C. tropicalis</i> (N=11)
Sexo masculino	28 (44)	13 (50)	7 (32)	5 (46)
Recém-nascido	15 (24)	1 (4)	12 (55)	2 (18)
Idade (mediana)	42	49	0	55
Apache II (mediana)	16	16	14	20
Terapia intensiva	21 (33)	7 (27)	11 (50)	3 (27)
Óbito	28 (44)	9 (35)	11 (50)	7 (64)
Condição clínica				
Neoplasia	18 (29)	10 (39)	3 (14)	3 (27)
Prematuridade	14 (22)	1 (4)	11 (50)	2 (18)
Diabetes <i>mellitus</i>	6 (10)	1 (4)	2 (18)	2 (18)
Neutropenia	1 (2)	1 (4)	-	-
Aids	2 (3)	2 (8)	-	-
Queimadura	1 (2)	-	1 (5)	-
LES	1 (2)	-	1 (5)	-
Procedimento invasivo				
Cateter venoso central	54 (92)	22 (85)	20 (90)	10 (91)
Nutrição parenteral total	31 (53)	12 (46)	15 (68)	4 (36)
Sondagem vesical	29 (49)	16 (62)	4 (18)	7 (63)
Cirurgia	23 (37)	14 (54)	5 (23)	3 (27)
Díalise	5 (1)	-	-	1 (10)
Medicamento prévio				
Antibióticos	57 (97)	25 (96)	20 (91)	10 (91)
Vancomicina	35 (57)	13 (52)	15 (68)	7 (64)
Carbapenem	24 (39)	9 (36)	11 (50)	4 (36)
Cefalosporina de 3ª geração	22 (36)	13 (50)	5 (23)	3 (27)
Cefalosporina de 4ª geração	19 (31)	8 (31)	3 (14)	7 (64)
Metronidazol	18 (29)	12 (48)	3 (14)	3 (27)
Aminoglicosídeo	16 (26)	5 (20)	10 (46)	2 (18)
Antifúngicos	10 (17)	3 (12)	3 (14)	3 (27)
Corticóide	5 (8)	2 (8)	1 (5)	2 (18)
Quimioterapia	4 (7)	2 (8)	1 (5)	1 (9)

LES: Lupus eritematoso sistêmico.

O intervalo entre a data da hemocultura e a data da coleta de vigilância foi em média de cinco dias e mediana de quatro dias, com um intervalo de um a dez dias.

A colonização por ao menos uma espécie de *Candida* ocorreu entre 58 (92%) dos pacientes. O reto e a orofaringe foram os sítios anatômicos mais frequentemente colonizados (tabela 3).

Em 15 culturas de vigilância ocorreu crescimento de mais de uma espécie: cavidade oral (seis pacientes), reto (quatro pacientes), urina (três pacientes), pele (dois pacientes).

Tabela 3 - Resultados de culturas de vigilância de 63 pacientes com candidemia no período de maio de 2004 a outubro de 2005

Sítios de vigilância (número de coletas)	Espécie isolada	N (%)
Reto (62)	<i>C. albicans</i>	33 (53)
	<i>C. glabrata</i>	6 (10)
	<i>C. parapsilosis</i>	4 (6)
	<i>C. guilliermondii</i>	1 (2)
	Não cresceu	18 (29)
Cavidade oral (63)	<i>C. albicans</i>	35 (56)
	<i>C. tropicalis</i>	9 (14)
	<i>C. glabrata</i>	5 (7)
	<i>C. parapsilosis</i>	3 (5)
	Não cresceu	20 (32)
Urina (50)	<i>C. albicans</i>	16 (32)
	<i>C. tropicalis</i>	7 (14)
	<i>C. parapsilosis</i>	4 (8)
	<i>C. glabrata</i>	3 (6)
	Não cresceu	23 (46)
Pele (63)	<i>C. albicans</i>	17 (27)
	<i>C. parapsilosis</i>	5 (8)
	<i>C. glabrata</i>	1 (2)
	Não cresceu	42 (67)
Ponta de cateter (25)	<i>C. parapsilosis</i>	10 (40)
	<i>C. albicans</i>	6 (24)
	<i>C. tropicalis</i>	5 (20)
	<i>C. guilliermondii</i>	1 (4)
	Não cresceu	3 (12)
Pele ao redor do cateter (35)	<i>C. glabrata</i>	2 (6)
	<i>C. albicans</i>	1 (3)
	Não cresceu	32 (91)

Entre os pacientes com *C. albicans* identificadas nas hemoculturas ocorreu crescimento da mesma espécie: seis pacientes em um sítio, sete pacientes em dois sítios e 12 pacientes em três ou mais sítios de vigilância.

Entre os pacientes com *C. parapsilosis* identificadas nas hemoculturas ocorreu crescimento da mesma espécie: nove em um sítio, dois pacientes em dois sítios e três pacientes em três ou mais sítios de vigilância.

Entre os pacientes com *C. tropicalis* identificadas no sangue ocorreu crescimento da mesma espécie: quatro em um sítio, dois pacientes em dois sítios e três pacientes em três ou mais sítios de vigilância.

A colonização de um ou mais sítios de vigilância com isolados da mesma espécie do sangue ocorreu em 51 (81%) dos pacientes (tabela 4).

Tabela 4– Colonização dos sítios de vigilância com a mesma espécie de *Candida* isolada no sangue de 63 pacientes no período de maio de 2004 a outubro de 2005

Isolamento de hemocultura (N)	Crescimento em qualquer sítio de vigilância N (%)	Concordância por sítio de coleta N						
		Reto	C. oral	Urina	Pele	Ponta de cateter	Pele ao redor do cateter	Biópsia
<i>C. albicans</i> (26)	25 (96)	19	22	10	8	6	1	1
<i>C. parapsilosis</i> (22)	14 (64)	4	2	4	3	10	-	NC
<i>C. tropicalis</i> (11)	9 (82)	2	4	5	-	5	-	1
<i>C. guilliermondii</i> (1)	1 (100)	-	-	-	-	1	-	NC
<i>C. krusei</i> (1)	-	-	-	-	-	NC	NC	NC
<i>C. glabrata</i> (1)	1 (100)	-	1	-	-	NC	1	NC
<i>C. holmii</i> (1)	1 (100)	1	-	1	-	NC	-	NC

NC: Não colheu

Tipagem molecular

Foi realizada tipagem molecular das cepas derivadas dos 51 pacientes em que algum sítio de vigilância apresentava a mesma espécie isolada em sangue, à exceção dos pacientes com candidemia por *C. holmii* e *C. guilliermondii*.

A análise dos perfis genotípicos apresentados pelas cepas foi realizada por inspeção visual comparativa das fotografias dos géis, observando-se o poder discriminatório

de cada método. Todas as técnicas foram repetidas, para garantir a reprodutibilidade dos métodos, como também foram testados controles negativos para o RAPD.

Para todos os métodos de tipagem os isolados foram considerados iguais, se os perfis migratórios dos isolados eram idênticos (mesmo número de bandas, todas localizadas nas mesmas posições, ou seja, 100% de similaridade) e diferentes, quando o perfil de corrida eletroforética tivesse mais que uma banda detectável diferente à inspeção visual.

Os perfis moleculares dos isolados de sangue de *C. albicans* e *C. tropicalis* também tiveram análise e comparação de similaridade através de software.

Foi considerada como identidade genotípica de um isolado do sítio de vigilância com o isolado do sangue correspondente quando ocorreu concordância no perfil eletroforético em todos os métodos de tipagem molecular utilizados para cada espécie.

C. albicans:

Foram obtidos 25 isolados de sangue e de 68 sítios de vigilância com identificação de *C. albicans*, que foram tipadas por quatro métodos diferentes, com os seguintes resultados:

Eletroforese em campo pulsado - PFGE

Cariotipagem eletroforética – EK:

Não discriminou bem as cepas, notando-se pouca variabilidade genotípica entre os isolados quatro cariótipos foram observados. Na avaliação de 16 hemoculturas e seus respectivos sítios de vigilância, a concordância genotípica ocorreu entre 15 hemoculturas e um ou mais sítios de vigilância.

Análise do DNA genômico utilizando enzima de restrição, seguida por eletroforese em campo pulsado – REAG:

O REAG de 16 isolados de sangue utilizando a enzima *PauI* gerou nove perfis eletroforéticos. No dendograma visualizaram-se três clusters com 100% de similaridade (figura 1).

Os isolados de sangue foram idênticos a um ou mais sítios de vigilância em 22 pacientes.

A análise com a enzima *SfiI* não discriminou bem as cepas, notando-se pouca variabilidade genotípica entre os isolados.

Figura 1 - REAG *C. albicans*: dendograma dos perfis eletroforéticos de isolados de sangue. Colunas de 1 a 16: hemoculturas; escala de 0 a 100% de similaridade (coeficiente de Dice)

Amplificação dos segmentos polimórficos do DNA (RAPD)

Os *primers* oligo 2 e oligo 3 discriminaram sete perfis genotípicos diferentes a partir da análise de dezoito isolados de sangue. Dezesseis isolados de hemoculturas foram idênticos a um ou mais sítios de vigilância (figura 2).

Figura 2 - RAPD *C. albicans*: perfis de isolados de sangue e sítios de vigilância. Coluna 1: peso molecular 100 bp *Ladder*; colunas 2 a 6: isolados do paciente 34 (sangue, reto, cavidade oral, cateter, pele); colunas 7 a 10: isolados do paciente 37 (sangue, reto, cavidade oral, cateter); colunas 11 e 12: isolados do paciente 42 (sangue, cavidade oral); colunas 13 e 14: isolados do paciente 47 (sangue, cateter); colunas 15 a 17: controles negativos

Os perfis moleculares de vários isolados de *C. albicans* de sangue e sítios de vigilância gerados por REAG-*Paul* e RAPD foram idênticos, em ambos os métodos (tabela 5).

Tabela 5 - Sítios de vigilância de pacientes com candidemia por *C. albicans* com mesmo genótipo em dois métodos de tipagem molecular (REAG e RAPD)

Sítios de vigilância	Pacientes N
Reto e cavidade oral	7
Reto e urina	1
Reto	1
Reto, cavidade oral e pele	1
Reto, cavidade oral, urina e ponta de cateter	1
Reto e ponta de cateter	1
Cavidade oral e ponta de cateter	1
Pele	1
Ponta de cateter	1

***C. parapsilosis*:**

Foi realizada a tipagem molecular dos 37 isolados (14 hemoculturas e 23 sítios de vigilância correspondentes) por dois métodos diferentes, com os seguintes resultados:

1. Eletroforese em campo pulsado – PFGE:

Cariotipagem eletroforética – EK:

Na tipagem molecular unicamente seis isolados de pontas de cateter, apresentaram perfil eletroforético idêntico aos isolados de *C. parapsilosis* do sangue, cinco destas hemoculturas eram oriundas de RNs (figura 3).

Figura 3 - EK *Candida parapsilosis*: cariótipos de isolados de sangue e sítios de vigilância. Coluna 1: peso molecular *Hansenula wingei* (170-3635 kb); coluna 2: *Candida parapsilosis* ATCC 220198; coluna 3 a 5: isolados do paciente 19 (sangue, cateter e reto); colunas 6 a 8: isolados do paciente 28 (sangue, reto e pele); colunas 9 a 11: isolados do paciente 29 (sangue, boca e reto); colunas 12 e 13: isolados do paciente 31 (sangue e cateter).

Dentre as 12 hemoculturas provenientes dos RNs observamos oito perfis eletroforéticos: dois *clusters* com isolados de sangue iguais entre dois neonatos e um *cluster* com isolados idênticos entre três RNs (figura 4).

Figura 4 - EK *C. parapsilosis*: perfis de isolados de sangue de recém-nascidos. Coluna 1: peso molecular *Hansenula wingei* (170-3635 kb); coluna 2: *C. parapsilosis* ATCC 22019; as colunas 3 a 14 correspondem às hemoculturas

***C. tropicalis*:**

Foram obtidos nove isolados de sangue de *C. tropicalis* e 17 isolados de sítios de vigilância correspondentes, que foram tipados por dois métodos diferentes, com os seguintes resultados:

Análise do DNA genômico utilizando enzima de restrição, seguida por eletroforese em campo pulsado – REAG

Foram discriminados quatro perfis eletroforéticos com a enzima *Sfi*I (figura 5).

Notou-se que todos os isolados de sangue e seus respectivos sítios de vigilância apresentaram padrões genotípicos idênticos.

Figura 5 - REAG *C. tropicalis*: dendograma dos perfis eletroforéticos de isolados de sangue. Colunas de 1 a 9: hemoculturas; escala de 0 a 100% de similaridade (coeficiente de Dice)

Amplificação dos segmentos polimórficos do DNA (RAPD)

Os *primers* oligo 2 e oligo P5 detectaram cinco perfis genotípicos diferentes (figura 6). À exceção de um paciente, os isolados dos sítios de vigilância foram idênticos aos isolados do sangue.

Figura 6 - RAPD *C. tropicalis*: perfis de isolados de sangue. Coluna PM: peso molecular 100 bp *Ladder*; colunas de 1 a 11: hemoculturas

***C. glabrata*:**

Foi realizada a cariotipagem eletroforética de isolados de hemocultura de *C. glabrata* e dos dois sítios de vigilância com a mesma espécie (cavidade oral e pele ao redor do cateter). O perfil genotípico do isolado do sangue foi diferente dos isolados de sítios de vigilância (figura 7).

Figura 7 - EK *C. glabrata*: cari6tipos de isolados de sangue e s6itos de vigil6ncia. Coluna 1: peso molecular *Hansenula wingei* (170-3635 kb); coluna 2: ATCC 80030 *C. glabrata*; colunas 3 a 5: sangue, cavidade oral e pele ao redor do cateter; coluna 6: peso molecular

5. Discussão

A fonte de candidemia é objeto de considerável debate na literatura especializada. Alguns autores enfatizam o comprometimento do trato gastrointestinal (fonte endógena) (Taylor et al., 2003; Mellado et al., 2000) como origem das candidemias, enquanto outros ressaltam a importância da origem exógena (Shin et al., 2005) para elas.

A identificação da origem da candidemia é fundamental para a escolha de estratégias de prevenção.

Se o intestino é a fonte primária, meios que reduzam a colonização intestinal por espécies de *Candida* podem ter impacto favorável na diminuição da incidência de candidemia: por exemplo, controle da exposição a antibióticos de amplo espectro (Pfaller et al., 2001; Lin et al., 2005), e uso de profilaxia com antifúngicos (Charlier et al., 2006).

Por outro lado, quando a fonte é exógena, recomenda-se a implementação de programas intensivos para aumentar a aderência à higienização das mãos. Produtos anti-sépticos como álcool e clorexedina apresentam ação antimicrobiana contra as espécies de *Candida* que colonizam as mãos dos profissionais da saúde (Boyce et al., 2002). Sua utilização diminui o risco da colonização por *Candida* spp. nos pacientes e, subsequentemente, reduz a incidência de infecção hospitalar. Além disso, é medida prioritária de controle de candidemia relacionada a cateter, a promoção de maior rigor no cumprimento das recomendações de prevenção na inserção e manutenção de dispositivos venosos centrais (Fridikin et al., 2005; O'Grady et al., 2002).

A análise dos achados resultantes de nosso trabalho e relacionados às variedades de *Candida*, demonstra que a patogênese da candidemia diferiu entre as várias espécies, o que remete à consideração da fonte para a definição de estratégias de controle da infecção.

Se acrescentarmos a estes achados a consideração dos dados demográficos, clínicos e microbiológicos do grupo de 63 pacientes com candidemia objeto do presente estudo, de um modo geral, podemos construir um quadro de referência mais amplo para situar as informações provenientes da tipagem molecular que realizamos.

Como veremos, nossos achados se apresentaram sem grandes distanciamentos do relatado na literatura nacional e internacional.

No entanto, certas particularidades merecem discussão mais detalhada.

É o que faremos a seguir.

Ponto de vista demográfico

Como já foi visto, nosso estudo envolveu 63 pacientes, incluídos na investigação a partir do critério de terem manifestado candidemia após 48 horas de internação em três unidades hospitalares de São Paulo.

Do ponto de vista demográfico, a mediana da idade desses pacientes foi de 42 anos. Semelhante àquela (40 anos) encontrada por Arnaldo e colaboradores (2006) em 11 hospitais brasileiros de assistência terciária, e baixa em comparação com estudo de Pappas et al.(2003) (55 anos) realizado nos Estados Unidos.

Nosso estudo comporta significativa proporção de crianças (29%), sendo que somente os recém-nascidos representam 24% da totalidade de pacientes investigados.

A proporção de crianças e lactentes foi próxima aos valores encontrados em uma série brasileira (32% e 21%, respectivamente) (Colombo et al., 2006) e distante da realidade de uma grande série americana (29% versus 9%) (Pappas et al., 2003).

A contribuição dos menores de 1 ano foi significativamente maior quando comparada à série americana de Hajjej et al (2004) (com 7% menores de um ano e 5% de recém-nascidos) e a uma série norueguesa (Sandven et al., 2006) de base populacional com 804 casos de candidemia (onde 10% dos casos de candidemia eram de lactentes).

Ponto de vista clínico e microbiológico

Do ponto de vista clínico e microbiológico, numa perspectiva coletiva e mais genérica, as *Candida* não *albicans* foram predominantes em nosso estudo, representando 58% dos isolamentos identificados nas hemoculturas. De outra parte, individualmente, a espécie mais isolada no sangue foi a *C. albicans* (42%), seguida pela *C. parapsilosis* (35%) e a *C. tropicalis* (16%).

Estes dados, em si mesmos, já merecem atenção em função de convergências e divergências com os de outros estudos sobre o mesmo tema.

Num trabalho realizado anteriormente no HC-FMUSP (Costa et al., 2000) — um dos locais também por nós estudado e de onde provieram a maioria dos pacientes —, no período de dezembro de 1994 a dezembro de 1996, a percentagem de *Candida* não *albicans* foi de 50%, inferior aos 58% por nós identificados.

Em outro estudo, realizado em onze centros médicos brasileiros (Colombo et al., 2006) no período de março de 2003 a dezembro de 2004, comportando 712 isolados de *Candida* no sangue, a incidência de *Candida* não *albicans* foi de 60%, valor muito próximo do encontrado em nosso estudo.

Já Pfaller e Diekema (2007), analisando dados do ARTEMIS DISK *Surveillance Program* – que reúne informações referentes a 134.715 isolados clínicos de candidíase invasiva oriundos de 127 instituições de 39 países, no período de 1997 a 2003, observaram um incremento na participação das espécies *Candida* não *albicans* de 26,7% para 37,7%.

Se correlacionarmos estes três estudos aos achados de nosso trabalho, podemos ressaltar, de um lado, que também aqui se confirma a tendência à diminuição de isolamento de *C. albicans*, já que os dados do estudo do HC-FMUSP, colhidos na década de 1990, comparados com os dados que recolhemos dez anos depois, apontam para esta diminuição. De outro lado, os três estudos realizados no Brasil comparados com os dados de Pfaller e Diekema confirmam mais uma vez a maior relevância das *Candida* não *albicans* em nosso meio.

Dentre as espécies não *albicans*, nosso estudo evidencia consistência com os demais trabalhos brasileiros, na medida em que também constata a importância da *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* como agentes etiológicos nas candidemias que ocorrem entre nós.

Entre os recém-nascidos (RNs), que representaram 55% dos casos de candidemias por *C. parapsilosis* que estudamos, a prevalência desta espécie foi de 80 %, confirmando mais uma vez sua importância nas ocorrências em nosso meio.

Em um estudo prospectivo espanhol em 5 unidades neonatais, no período de 2002-2003, ocorreram 24 candidemias, sendo que 16 (67%) por *C. parapsilosis* (Rodríguez et al., 2006). Já em outro estudo multicêntrico americano, em 128 unidades neonatais de terapia intensiva — no período de 1995 a 2004, com 1997

candidemias diagnosticadas —, ocorreu predomínio de *C. albicans* (58%) seguido por *C. parapsilosis* (34%) (Fridkin et al., 2006).

No nosso estudo, a mediana do tempo entre admissão e diagnóstico de candidemia foi de 23 dias.

Este intervalo de tempo foi semelhante a séries nacionais e internacionais (Colombo et al., 2006; Fridkin et al., 2006; Almirante et al., 2004) que variaram de 20 a 23 dias.

Gravidade

A gravidade no momento do diagnóstico de candidemia entre pacientes adultos, avaliada pelo índice Apache II, obteve um escore mediano de 16.

Este valor foi semelhante ao encontrado em outras séries nacionais (Colombo et al., 2007; Pasqualotto et al., 2005) e internacionais (Pappas et al., 2003) relativas a pacientes com candidemias.

Os pacientes com maior gravidade (Apache II igual a 20) estavam entre os infectados por *C. tropicalis*, dado também muito próximo ao encontrado no trabalho de Abi-Said et al (1997).

Letalidade

A letalidade geral, em nosso estudo, foi de 44%.

Esse número foi semelhante ao encontrado na cidade de Barcelona (Almirante et al., 2005) em 2002-2003, e menor que a percentagem de 61% encontrada em um estudo de 282 casos de candidemia oriundos de quatro hospitais terciários de São Paulo (Colombo et al., 2007), também no período entre 2002-2003.

Em relação ao tema da letalidade, considerando-se a literatura existente e as práticas clínicas de atendimento em unidades hospitalares, a expectativa de óbitos é normalmente tida como maior que 50% em várias séries (Eggimann et al., 2003).

A mais alta taxa de letalidade (64%) por nós apontada ocorreu em consequência de infecção por *C. tropicalis*, proporção semelhante (62%) à encontrada por Nucci et al. (2007) entre 188 episódios de candidemia por esta espécie.

Até aqui, nada de surpreendente.

O inesperado em nosso estudo foi a inversão na importância de *C. albicans* e *C. parapsilosis* nos desenlaces fatais.

Em geral, na literatura médica, a letalidade esperada é maior para os casos de infecção por *C. albicans* (43%) do que para os casos de *C. parapsilosis* (23%) (Almirante et al., 2006). Os prematuros, juntamente com os mais idosos (Smith et al., 2005; Almirante et al., 2005; Pappas et al., 2006) apresentam as maiores taxas de letalidade em comparação com os adultos e crianças (Zaoutis et al., 2005; Pappas et al., 2003).

Em nosso estudo a importância maior foi da letalidade entre os pacientes com candidemia causada por *C. parapsilosis* (50%), acima dos casos de *C. albicans* (35%). Consideradas as faixas etárias, entre RNs a proporção foi de 53%, entre crianças de 0 %, entre adultos de 39% e entre idosos de 50%.

O grande número de recém-nascidos prematuros, no grupo com candidemia por *C. parapsilosis*, poderia justificar a maior proporção de casos dessa natureza na letalidade geral por nós encontrada.

Em nosso estudo, chama a atenção um dado complementar: o retardo na retirada de CVC (retirada após 8 dias do diagnóstico) no grupo neonatal com candidemia por *C. parapsilosis*.

Há estudos que demonstraram que no período neonatal a retirada tardia do CVC comprometeu o prognóstico final.

Por exemplo, em um estudo multicêntrico prospectivo de unidades neonatais americanas (Benjamin et al., 2006) com 98 candidemias por *C. parapsilosis* entre RNs de peso ao nascimento menor de 1000g, observou-se maior letalidade quando a remoção do CVC foi tardia (>1 dia após o início do tratamento antifúngico). No grupo de 30 RNs em que a retirada foi precoce, 3 (10%) evoluíram para óbito e entre os 68 RNs em que a retirada foi tardia, 21 (31%) faleceram.

Achado semelhante encontrou Karlowicz et al. (2000), que observou um aumento da letalidade entre RNs com candidemia neonatal por *C. albicans* com retirada tardia do acesso venoso central (>3 dias após a positividade da hemocultura).

Apesar de não se tratar de objeto do presente estudo, nossos achados sugerem que a retirada tardia do CVC é, em si mesma, um fator de risco. Ao mesmo tempo, a ordem de importância assumida pela letalidade por *C. parapsilosis* mereceria uma investigação mais detalhada, inclusive quanto à hipótese de um surto na unidade neonatal.

Fatores de risco

Freqüentemente associamos candidemia à internação em terapia intensiva, mas esta idéia não encontra confirmação nos fatos, considerados os estudos realizados tanto no Brasil quanto no exterior.

Em nosso estudo, da totalidade dos pacientes reconhecidos com candidemia, somente 33% se encontravam internados em unidades de cuidados intensivos.

Consistentemente com nosso trabalho, em estudo realizado em hospitais terciários brasileiros, 35% dos indivíduos com candidemia encontravam-se em UTI. Em trabalhos nos Estados Unidos (Hajjeh et al., 2004), Suíça (Marchetti et al., 2004) e Espanha (Almirante et al., 2005), também somente um terço dos pacientes estavam internados em UTI.

Isso permite afirmar que, claramente, os fatores de risco efetivamente associados com candidemia (por exemplo, uso de cateter venoso central e uso de antibióticos de amplo espectro) não estão limitados somente aos pacientes de UTI.

Acrescentemos que há outros fatores de risco (Eggimann et al., 2003) que são tão ou mais importantes que as internações em UTI.

No nosso estudo, foi significativa a proporção de indivíduos submetidos a procedimentos cirúrgicos (37%).

Esse valor é próximo aos 39,5% de 210 pacientes com candidemia submetidos a algum procedimento cirúrgico previamente à infecção, de acordo com uma coorte retrospectiva brasileira desenvolvida na Santa Casa de Porto Alegre (Pasqualotto et al., 2006). Porém, menor que uma série espanhola de 345 casos de candidemia com 46% de cirurgias prévias à infecção (Almirante et al., 2005).

A cirurgia abdominal foi a mais freqüente (25%) em nossos achados, valor maior que o encontrado em um estudo de Abi-Said et al. (1997), realizado nos Estados Unidos, entre 479 pacientes com candidemia, em que 17% haviam sido submetidos à cirurgia abdominal antes da infecção.

Na nossa série, 29% dos pacientes apresentaram diagnóstico de câncer (sólido ou hematológico).

Em estudos nacionais e estrangeiros esta porcentagem variou de 26% a 30% (Colombo et al., 2006; Laupland et al., 2005; Pappas et al., 2003).

Dentre os fatores de risco, a prematuridade (22%) foi também uma constatação importante em nosso estudo. Entre os 15 casos neonatais, 14 eram de prematuros (93%).

Esta alta frequência de prematuros também foi relatada em outros estudos.

Em uma série de candidemia neonatal oriunda de cinco unidades neonatais da cidade de Barcelona (Rodríguez et al., 2006), do total de 24 casos de candidemia, 92% das infecções ocorreram entre prematuros.

O que converge com os achados de um estudo caso-controle (Shetty et al., 2005) em sete unidades de terapia neonatal em Baltimore, em que a prematuridade foi um fator de risco independente na análise multivariada (*odds ratio* igual a 6,5).

No nosso estudo 10% dos pacientes apresentaram diagnóstico de diabetes associado. Proporção muito próxima à de um estudo sobre 282 episódios de candidemia em quatro centros médicos da cidade de São Paulo, no qual diabetes ocorreu em 9% dos casos (Colombo et al., 2007).

Os valores observados entre nós situaram-se abaixo do relatado em uma série americana de 10.067 casos de candidemia do ano de 2000, quando Zaoutis et al. (2005) encontraram este fator de risco em 17% do total dos casos.

Outro fator de risco a ser destacado em nosso estudo é o da utilização de acesso venoso central (92%) nos trinta dias anteriores ao diagnóstico e nutrição parenteral total (53%).

Achados próximos aos encontrados por Trick et al (2002) entre os casos derivados de UTIs que participam do NNIS (*National Nosocomial Surveillance System*), onde 93% utilizaram CVC e 56% receberam NPT.

Em estudo desenvolvido em 34 hospitais de assistência terciária nos EUA por Pappas et al. (2003) os valores foram 95% e 53%, respectivamente.

Merece inclusão entre os fatores de risco a quantidade de antibióticos ministrados aos pacientes. Em nosso estudo, a mediana de antibióticos utilizados por paciente foi de três diferentes medicamentos, sendo que 97% fizeram uso deles.

Os antibióticos mais utilizados foram: vancomicina (57%), carbapenem (39%), cefalosporina de 3^a. geração (36%), cefalosporina de 4^a. geração (31%).

Nossos dados são muito próximos de um estudo publicado em 2005 sobre a Santa Casa de Porto Alegre, envolvendo 191 casos de candidemia. Nele, a mediana de número de antibióticos foi de 4, sendo que 97% dos pacientes utilizaram antibióticos (Pasqualotto et al., 2005).

Os antibióticos mais utilizados também foram semelhantes aos encontrados em nosso estudo: vancomicina (58%), carbapenem (28%), cefalosporina de 3^a. geração (40%) e cefalosporina de 4^a. geração (30%).

Outro fator de risco que merece especial consideração é a presença de colonização pelas diversas espécies de *Candida*. Por se tratar do tema central de nosso estudo, será abordado separadamente no item que se segue.

Sítios de colonização e *Candida* spp. isoladas

Nosso estudo teve a característica principal de permitir uma ampla investigação, nos pacientes nele incluídos, das espécies de *Candida* presentes tanto no sangue

quanto nos sítios de vigilância (reto, orofaringe, urina, pele, pele ao redor do cateter, ponta de cateter e biópsia).

O isolamento de *Candida* spp., em pelo menos um sítio de vigilância, foi significativo, ocorrendo em 92% dos pacientes.

Esse elevado isolamento fala da eficácia da metodologia adotada em nosso estudo, muito especialmente no que se refere à escolha dos sítios de vigilância, ao cuidado no resgate das pontas de cateter e ao meio de cultura utilizado.

O estudo em que a proporção de colonização por *Candida* spp. (89%) mais se aproximou do nosso valor, foi uma investigação prospectiva em unidades de terapia intensiva espanholas (Leon et al., 2006).

Seguindo metodologia diferente da adotada em nosso estudo, as amostras de vigilância (orofaringe, aspirados gástricos e traqueais e urina) dos 97 indivíduos que desenvolveram candidemia eram coletadas na admissão e semanalmente, até a saída (alta ou óbito) e semeadas em meio Sabouraud.

A identificação mais elevada de *Candida* spp. em nosso estudo pode ser atribuída à maior variedade de sítios que submetemos a vigilância, além da eficácia do meio de cultura utilizado.

A utilização do meio CHROMagar Candida foi decisiva para o elevado isolamento de *Candida* spp. nas culturas de vigilância que investigamos em nosso estudo, já que permitiu 15 oportunidades de identificação de culturas mistas, não detectáveis em outros meios como o Sabouraud. Este meio permitiu a fácil visualização do crescimento de diferentes espécies de *Candida*, especialmente aquelas oriundas do trato gastrointestinal (Odds et al., 1994; Beighton et al., 1995) e urina (Binelli et al., 2006).

Se tomarmos como foco de análise os sítios de vigilância, observamos que ocorreu maior positividade nas culturas provenientes do reto (71%), seguidas pelas de orofaringe (68%) e urina (54%). No entanto, como veremos, esta alta positividade nas culturas não apontou para uma correspondência automática entre espécies na confrontação com a hemocultura.

Nas culturas identificadas em nosso estudo, a espécie mais isolada foi a *C. albicans*, sendo também a que mais freqüentemente ocorreu em múltiplos sítios (12 pacientes em três ou mais sítios de vigilância).

Observação semelhante relativa à colonização em múltiplos sítios por *C. albicans* foi relatada em recente estudo entre prematuros realizado por Kaufman et al. nos Estados Unidos (Kaufman et al., 2006).

Em contrapartida da elevada proporção de colonização por *C. albicans*, quando excluímos os sítios de ponta de cateter, observamos baixo número de culturas de vigilância com isolamento de *C. parapsilosis*, apesar de se tratar da segunda mais freqüente etiologia de candidemia por nós estudada. Este dado nos remete à relação preferencial entre *C. albicans* e fontes endógenas (sítios gastrointestinais).

A menor proporção de colonização dos sítios gastrointestinais por *C. parapsilosis* também é descrita em outros estudos (Huang et al., 2004; Hedderwick et al., 2000).

Quando consideramos os sítios de ponta de cateter, a *C. parapsilosis* foi isolada em 42% dos casos, e somente nos pacientes com candidemia por esta mesma espécie. Este achado relaciona fortemente a candidemia por *C. parapsilosis* a fontes exógenas e pode ser explicado pela propriedade que apresenta esta espécie de produzir biofilme nos dispositivos invasivos, facilitando aderência e crescimento, propiciando colonização (Branchini et al., 1994; Shin et al., 2002).

Candidúria, quando avaliada, ocorreu em 54% dos indivíduos, com 11% de isolamento de duas espécies concomitantes. Em ordem decrescente, as espécies mais presentes na urina foram *C. albicans* e *C. tropicalis*. A *C. glabrata* foi isolada somente em três pacientes.

Conforme relatado na literatura (Kauffman, 2005) estas três espécies são as mais prevalentes na urina.

Sobel et al. (2000) conseguiu isolar duas espécies em até 10% das amostras, utilizando a coleta de duas amostras seriadas de urina.

Binelli et al. (2006), utilizando o meio CHROMagar Candida como nós, no período de 1999 e 2001, estudando um dos locais também por nós pesquisado e de onde provieram a maioria dos nossos pacientes, encontrou candidúria entre 21% dos indivíduos com candidemia e 4% de isolamentos de duas espécies.

Fonte de candidemia segundo as espécies

É muito enriquecedora a consideração particularizada das espécies e de seus sítios de colonização.

De fato, a abordagem da questão da fonte das candidemias passa, necessariamente, pela compreensão mais detalhada da patogênese resultante de cada espécie nelas envolvidas.

É o que faremos a seguir, levando em conta a ordem decrescente de suas freqüências nas coletas por nós estudadas.

C. albicans

Dos 63 pacientes estudados, 26 (41%) apresentaram candidemia por *C. albicans*. Em 24 destes pacientes constatamos colonização pela mesma espécie no trato gastrointestinal (reto e/ou orofaringe).

Esta ocorrência é bastante conhecida na literatura (Taylor et al., 2003). Em geral, as candidemias por *C. albicans* são precedidas por evento de colonização pela mesma espécie. Por esta razão, a colonização por esta levedura é, em si mesma, considerada fator de risco independente para o desenvolvimento de candidemia.

No nosso estudo, ocorreram 15 casos de identidade genotípica das cepas no sangue e nos sítios de vigilância: 13 oriundos de trato gastrointestinal, isoladamente ou acompanhados por outros sítios (urina e ponta de cateter), apontando para a provável origem endógena da maioria das infecções por este patógeno.

Qualquer variável que provoque desequilíbrio da microbiota ou lesão da mucosa gastrointestinal pode ser um agente facilitador de translocação de *Candida* spp. até os capilares mesentéricos (Mellado et al., 2000). Sendo assim, fatores que aumentem a colonização intestinal por *Candida* (uso de antibióticos, íleo, oclusão intestinal) ou determinem atrofia ou lesão de mucosa intestinal (jejum prolongado, nutrição parenteral total, hipotensão, quimioterapia) podem potencializar o fenômeno de translocação no tubo gastrointestinal (Alexander et al., 1990).

Existem evidências de que candidemia por *C. albicans* é preferencialmente adquirida por via endógena, pela translocação do patógeno através do trato gastrointestinal, onde há rica colonização por *Candida* spp. (Cole et al., 1996).

Sem qualquer surpresa, também ocorreu a necessária exceção em um paciente com a constatação de isolado de ponta de cateter de perfil idêntico ao encontrado na cepa do sangue, não acompanhado por outro sítio de vigilância. Na literatura há relatos deste tipo de evento, apesar de em menor número, associados a provável fonte exógena (Chen et al., 2005).

C. parapsilosis

A grande maioria das infecções por *C. parapsilosis* é descrita como de origem exógena (Welbel et al., 1996; Clark et al., 1997), geralmente com associação a dispositivos invasivos ou próteses (Diekema et al., 1997; Weems et al., 1997).

Os fatores de risco a elas mais relacionados são a nutrição parenteral (Marais et al., 1994; Zancopé-Oliveira et al., 2000) e o uso de cateter venoso central (Levin et al., 1998).

A associação entre dispositivos invasivos e infecção por *C. parapsilosis* é influenciada pela habilidade desta levedura de produzir biofilme e aderir, assim, ao material plástico introduzido no organismo (Branchini et al., 1994; Shin et al., 2002).

Informações sobre possível fonte endógena de candidemia por *C. parapsilosis* na literatura são escassas e incompletas.

El Mohandes et al. (1994) estudou 82 admissões numa unidade intensiva neonatal através de coorte prospectiva. Os sítios de vigilância coletados foram: fezes, aspirado gástrico e pele (retroauricular) em três diferentes ocasiões.

Dos pacientes estudados, quatro desenvolveram candidemia por *C. parapsilosis*, apresentando crescimento de *C. parapsilosis* nas fezes.

O limite deste estudo está em que não precisou as cepas dos microorganismos isolados — já que não foi realizada tipagem molecular —, o que impossibilita afirmar a existência de relação necessária entre o achado da mesma espécie no sítio de colonização e no sangue.

Saiman et al. (2001), prospectivamente, avaliaram 2847 neonatos com *swabs* semanais em períneo e reto.

Dentre 35 pacientes com candidemia — *C. albicans* (63%), *C. parapsilosis* (29%) —, a colonização gastrointestinal precedeu a infecção hematogênica em 15 pacientes. Foi realizada tipagem molecular de 14 amostras oriundas de sangue e de colonização, mostrando perfil eletroforético idêntico; no entanto, os autores não informam quais as espécies submetidas à investigação.

Em nosso estudo, entre os RNs, existe forte suspeita de transmissão nosocomial.

A tipagem molecular das cepas de hemoculturas oriundas dos neonatos evidenciou oito diferentes perfis eletroforéticos. Dentre eles, por duas vezes foram detectadas semelhanças no cariótipo entre dois pacientes e por uma vez, concordância entre três. Acrescente-se que só houve concomitância temporal de internação entre dois pacientes.

Embora exista a suspeita, os dados fornecidos por nosso estudo são insuficientes para esclarecer como se deu a transmissão nosocomial. Podem, no entanto, precisar, que o cateter venoso central é ponto crítico neste processo.

Elenquemos os argumentos que, ao nosso ver, a partir de nossos achados, suportam a tese de fonte exógena (colonização da ponta de cateter) na patogênese da candidemia por *C. parapsilosis*:

Identificamos 22 pacientes com candidemia por *C. parapsilosis*, de 10 dos quais conseguimos resgatar pontas de cateter. Desses 22 pacientes, também, em 14 identificamos colonização por *C. parapsilosis* em algum sítio de vigilância — incluídas essas pontas de cateter — e em 8 não identificamos colonização por esta espécie em quaisquer das coletas realizadas.

Em todos os 10 pacientes cujas pontas de cateter conseguimos resgatar, nelas identificamos *C. parapsilosis*.

Em 6 dos 14 pacientes (43%) a tipagem molecular confirmou cepas iguais no sangue e no cateter.

Nos 22 pacientes não ocorreu nenhum caso de semelhança de genótipos de *C. parapsilosis* no sangue e em qualquer dos outros sítios de vigilância, excluídos os cateteres.

São esses os dados que fundamentam nossa hipótese de fonte exógena na candidemia por *C. parapsilosis*, sendo importante considerar, adicionalmente, que pelo fato de não ter sido possível o resgate de todas as pontas de cateter dos pacientes estudados, é possível que os dados por nós levantados estejam aquém da realidade.

Falhas na aderência à higienização das mãos podem permitir a contaminação/colonização dos CVC (Levin et al., 1998; Posteraro et al., 2004; Bonassolli et al., 2005) por *C. parapsilosis* através dos profissionais de saúde. Por isso nosso estudo, apesar de seus limites, aponta para o reforço de intervenções que previnam esta situação, reforçando as práticas de controle de infecção hospitalar, especialmente a higienização das mãos antes da manipulação dos acessos venosos.

C. tropicalis

A *C. tropicalis* apresenta uma característica que dificulta sua identificação genotípica, impossibilitando a identificação da fonte da infecção sanguínea.

Na tipagem molecular, os nucleotídeos, ao se distribuírem segundo seu peso molecular na formação das bandas do perfil eletroforético, não oferecem segurança quanto à sua diferenciação. Somente um sequenciamento genético poderia permitir esta discriminação e tipabilidade próximas de 100% (Gales et al., 2004).

Este preâmbulo é necessário para a consideração do dado recolhido por nosso estudo, quando identificamos somente cinco diferentes perfis eletroforéticos entre os isolados provenientes de 10 pacientes.

Com essa limitação metodológica, torna-se inviável qualquer afirmação a respeito da fonte dessa candidemia, já que seria temerário afirmar qualquer semelhança entre as leveduras presentes no sangue ou nos sítios de vigilância.

C. glabrata

Neste estudo, houve apenas um caso de candidemia por *C. glabrata*.

Pouco há a comentar sobre este caso.

Sua particularidade, foi a impossibilidade de identificação da fonte da infecção sanguínea: após tipagem molecular, ficou demonstrado que a cepa do sangue é diferente das encontradas na orofaringe e pele.

Neste caso específico, foram avaliados todos os sítios de vigilância relacionados com fontes endógenas. No entanto, não foi possível resgatar a ponta de cateter utilizada neste paciente, o que permitiria ampliar nossa avaliação, incluindo fonte exógena.

Em decorrência destas limitações, toda tentativa de identificação de fonte de infecção, neste caso, seria mera especulação.

C. guilliermondii*, *C. holmii* e *C. krusei

Essas três espécies, embora tenham surgido em três dos pacientes incluídos neste estudo, não foram objeto de tipagem molecular.

No caso da *C. krusei*, não ocorreu crescimento desta espécie em nenhum dos sítios de vigilância, ressaltando-se que o paciente não foi submetido a procedimento de acesso venoso central.

Nos outros dois casos, de *C. guilliermondii* e *C. holmii*, foram isoladas as mesmas espécies no sangue e em outros sítios de vigilância. No entanto, por se tratarem de espécies de menor importância epidemiológica, não consideramos significativo, para os efeitos do presente estudo, submetê-las à tipagem molecular.

Tipagem molecular

A questão subjacente, de fundamental importância, que nosso estudo propõe, é a da utilização que fizemos da valiosa ferramenta metodológica que é a tipagem molecular. Como veremos, esta técnica apresenta muitas vantagens mas, também, algumas limitações, de acordo com a espécie considerada.

A necessidade de estabelecer a relação genética entre isolados clínicos de uma mesma espécie é muito importante na investigação epidemiológica das infecções nosocomiais (Singh et al., 2006; Espinel-Ingroff et al., 1999).

A relação genética das cepas de *Candida* spp. pode ser investigada por diversos métodos moleculares, tais como cariotipagem eletroforética (EK), análise do DNA genômico utilizando enzimas de restrição seguida por eletroforese em campo pulsado (REAG) (Kanellopoulo et al., 2001; Riederer et al., 1998) e amplificação de segmentos polimórficos do DNA (RAPD) (Valério et al., 2006).

Nenhuma dessas abordagens, isoladamente, pode assegurar a identidade (Nantel et al., 2006) entre cepas. De fato, é a combinação de abordagens que pode conduzir a uma probabilidade maior de detecção de semelhanças e diferenças, caso elas existam, aumentando o poder discriminatório sobre nosso objeto de estudo.

A utilização de métodos de seqüenciamento genético, mais caros e mais trabalhosos, poderia reduzir as incertezas inerentes aos procedimentos habitualmente utilizados nas investigações epidemiológicas. No entanto, a relação custo-benefício não

justifica, na maioria dos casos, esse uso, razão pela qual a preferência recai sobre a combinação de diferentes testes para a avaliação do grau de similaridade entre cepas.

Consideremos, então, o comportamento dos diversos métodos na sua aplicação sobre as diferentes espécies que estudamos.

C. albicans

Na investigação sobre a *C. albicans* utilizamos quatro diferentes métodos para a comparação entre cepas. Iniciamos pela cariotipagem (EK), em seguida utilizamos duas enzimas de restrição (*SfiI* e *PauI*) e, finalmente, o RAPD.

O EK para *C. albicans* teve baixo poder discriminatório. Por este método, isolados de sangue derivados de diferentes pacientes apresentaram somente quatro cariótipos. A utilização das enzimas de restrição produziu melhores resultados. Entretanto o número de bandas foi grande, criando dificuldades para sua interpretação. O uso do dendograma para análise dos perfis gerados pelo REAG *PauI* facilitou a observação dos isolados relacionados ($\geq 95\%$ de analogia).

A utilização da enzima *SfiI* não resultou em discriminação das cepas, apresentando escassa variabilidade genotípica entre os isolados.

Já o uso da enzima *PauI*, apresentou maior capacidade de discriminação genotípica, observado por Shin et al. (2005). Nos isolados de sangue de 25 pacientes, em 22 casos ocorreu identidade entre um ou mais sítios de vigilância. As 16 cepas de sangue que pudemos avaliar em separado, geraram nove perfis eletroforéticos.

O RAPD apresentou melhor poder discriminatório, permitindo maior discriminação entre isolados do mesmo paciente.

Com base nestes resultados da utilização da enzima *PauI* e do RAPD, optamos pela combinação desses métodos para determinar a identidade dos isolados obtidos das culturas de vigilância e sangue. Foram consideradas como cepas idênticas as que apresentavam similaridade genotípica por ambos os métodos. O aumento do poder discriminatório com a combinação de métodos de tipagem também foi observado por Chen et al. (2005).

C. parapsilosis

Este estudo corroborou os achados de Zancopé et al. (2000) e San Miguel et al. (2004).

EK discriminou múltiplos isolados de *C. parapsilosis* de 14 pacientes e foi capaz de diferenciar entre isolados oriundos do mesmo paciente. Entretanto, o perfil eletroforético obtido/gerado após digestão com a enzima *SfiI* padrões que permitissem a diferenciação dos isolados e foi de valor limitado (Shin et al., 2001).

C. tropicalis

Como já expusemos anteriormente, a *C. tropicalis* constitui um desafio à tipagem molecular, já que apresenta grandes dificuldades para a identificação genotípica de suas diferentes cepas.

Em nosso estudo da *C. tropicalis* utilizamos dois métodos na tentativa de discriminação dos isolados investigados.

O primeiro desses métodos foi a análise do DNA genômico utilizando a enzima de restrição *SfiI*, seguida por eletroforese em campo pulsado (REAG). O segundo foi o do RAPD com os *primers* oligo 2 e oligo P5.

A dificuldade fundamental é que em ambos os métodos, formam-se poucas bandas, não oferecendo segurança quanto à diferenciação entre isolados. Esta dificuldade é

ainda maior quando as cepas provêm de um mesmo paciente, fato observado também por outros autores no que tange ao RAPD (Ergon et al. 2005)

Recentemente, Chou et al. (2007) obtiveram maior poder discriminatório através da análise do DNA genômico com a enzima de restrição *NaeI* seguida por eletroforese em campo pulsado – REAG. Este achado abre possibilidades futuras para a pesquisa da *C. tropicalis*.

C. glabrata

A utilização do EK apresentou um alto poder discriminatório, não sendo necessária a aplicação de outro método de tipagem. Esta boa performance confirmou o que é relatado na literatura (Shin et al., 2007).

Limitações

Para finalizar este capítulo de discussão de nossos achados, cabe abordar a questão das limitações que encontramos no desenvolvimento de nossa investigação.

Por se tratar de um estudo transversal, a coleta de isolados de vigilância de *Candida* spp. foi posterior ao diagnóstico da infecção. Em razão disso, não era possível acompanhar com rigor a relação causa-efeito na sua sequência temporal.

Por isso mesmo, as suspeitas que se levantam a partir de nossos achados quanto às fontes da infecção devem ser vistas a partir desta perspectiva. Isso não significa, no entanto, que não sejam suspeitas sólidas que merecem ser consideradas e investigadas através de métodos que permitam melhor caracterização da sequência temporal de causa e efeito.

Duas espécies, particularmente, desafiaram nossa investigação e insistiram em apresentar resultados pouco conclusivos: *C. glabrata* e a *C. tropicalis*.

No caso da *C. glabrata* o imponderável se instalou na medida em que não houve coincidência entre os genótipos de sangue e dos sítios de vigilância, tornando impossível qualquer consideração quanto à origem da infecção.

Já a *C. tropicalis* resistiu bravamente a se deixar conhecer. Por isso, ficamos devendo melhores hipóteses sobre a fonte das infecções por esta espécie.

6. Conclusões

- ❖ O desenho transversal da investigação limita as afirmações sobre seqüência temporal de causa e efeito entre candidemia e colonização nos pontos de vigilância, mas permite afirmação sobre relação entre elas.
- ❖ A candidemia por *C. albicans* tem forte relação com colonização do trato gastrointestinal (origem endógena).
- ❖ A candidemia por *C. parapsilosis* se relaciona à colonização do cateter venoso central (origem exógena).

Anexo A

Descrição dos procedimentos de coleta de culturas

Coleta e manejo da hemocultura

O sangue coletado (10ml) era colocado em frascos de hemocultura para aeróbios e anaeróbios. A seguir, os frascos eram levados aos aparelhos BACTEC 9240 (Becton Dickinson, USA), onde permaneciam por até cinco dias. Nesse período, se não houvesse positividade, as culturas eram consideradas negativas.

Nas amostras que apresentavam positividade, era semeado e inoculado uma ou duas gotas de sangue nos respectivos meios de cultura: Ágar Sabouraud, Ágar sangue a 5%, Ágar chocolate, e Ágar MacConkey. Era realizado exame microscópico com corante de Gram e, se positivo para leveduras, também era semeado uma placa de Ágar CHROMagar Candida.

As placas de Ágar sangue e Ágar chocolate eram incubadas na estufa de gás carbônico (CO₂), ao passo que placas MacConkey eram incubadas na estufa comum, ambas entre 35 e 37°C. As placas de Ágar Sabouraud e Ágar CHROMagar Candida eram incubadas a 30°C. Para amostras de frascos anaeróbios, eram semeadas duas placas de Ágar sangue. Uma delas era colocada em jarra de anaerobiose, e outra na estufa entre 35 e 37°C, por 48 horas. Ocorrendo crescimento de colônias, realizava-se a identificação.

As leveduras com crescimento no Ágar Sabouraud e que na lâmina apresentavam morfologia sugestiva de *Cryptococcus* spp. ou *Rhodotorula* spp. eram encaminhadas para identificação do fungo pelo sistema automatizado (VITEK).

As demais leveduras, colônias obtidas de 24 a 48 horas de crescimento, eram submetidas à prova do tubo germinativo. As leveduras com positividade a esta prova e com crescimento de colônias verdes no Ágar CHROMagar Candida eram identificadas como *C. albicans*.

Se ocorresse crescimento de colônias de outras cores no Ágar CHROMagar Candida e não houvesse positividade da prova do tubo germinativo, era realizado microcultivo, acompanhado da identificação do fungo pelo sistema automatizado (VITEK). A identificação >94% e a macromorfologia compatível era considerada finalizada. Quando a identificação era <94% (independentemente de se a macromorfologia era ou não compatível) o procedimento de identificação era repetido através do sistema API 20C AUX (BioMerieux-Vitek) e avaliação da micromorfologia do cultivo em Ágar Fubá Tween80.

Coleta de culturas de vigilância

A coleta das culturas de vigilância obedeceu aos seguintes procedimentos:

a) Coleta de urina: Por jato médio ou, nos pacientes em uso de sonda vesical de demora, a coleta de urina seguiu as seguintes recomendações:

1. Higienização das mãos do profissional de saúde.
2. Clampear o tubo de extensão logo abaixo do adaptador próprio para coleta de material.
3. Desinfecção do “látex” com álcool etílico a 70%.
4. Colher a urina usando agulha e seringa estéreis após 30 minutos do clampeamento.
5. Passar a amostra de urina da seringa para o frasco estéril.

- b) A amostra de colonização retal era obtida com a inserção de 2 cm de *swab* umedecido em soro fisiológico;
- c) *Swab* umedecido com soro fisiológico aplicado em mucosa oral;
- d) *Swab* umedecido com soro fisiológico aplicado na pele ao redor do cateter venoso central;
- e) *Swab* umedecido com soro fisiológico era aplicado nas regiões inguinal, cervical e axilar do paciente.

Coleta de outros isolados clínicos

A ponta do cateter era semeada pela técnica de rolagem em placa de Ágar sangue e lida conforme a técnica de Maki no Laboratório Central (Maki et al., 1977).

Tecido obtido por biópsia era colhido assepticamente e colocado em recipiente estéril, com salina. Não era adicionado líquido fixador.

Anexo B

Termo de consentimento livre e esclarecido

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº

SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:

ENDEREÇO:

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:..... SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: /..... /.....

ENDEREÇO: Nº.....

APTO:

BAIRRO :.....CIDADE:

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Colonização por Candida em indivíduos com candidemia.

PESQUISADOR: Anna Sara S Levin

CARGO/FUNÇÃO: Docente FM-USP.

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL: CRM-SP 4796.

UNIDADE DO HC-FMUSP: Grupo de Controle de Infecção Hospitalar.

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ☒ RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

CARTA DE CONSENTIMENTO

As pessoas podem ter a sua pele e mucosas habitadas por germes, incluindo os fungos. A *Candida* é um tipo de fungo e quando há diminuição das defesas do indivíduo este germe pode causar doença.

A razão principal para este estudo é avaliar se o fungo que causou a doença é o mesmo que se encontrava na sua pele, urina, boca e intestino.

Nosso laboratório nos informou da descoberta de fungos no sangue. Será solicitada a você a coleta de material com uso de *swab*, é um tipo de cotonete, que será aplicado na pele, boca e ânus. Um profissional treinado (médico, enfermeiro) fará esta coleta sem riscos para você.

O maior conhecimento que se obterá com este estudo não favorecerá diretamente a você, mas ajudará a compreender qual a origem do fungo que causou a doença.

A recusa em participar deste estudo não trará qualquer prejuízo no seu atendimento, já que haverá o mesmo tipo de assistência com a mesma equipe e com o mesmo grau/nível de atenção.

Uma vez aceito inicialmente participar deste estudo, em qualquer momento poderá suspender sua participação sem modificação/comprometimento na assistência médica.

O sigilo será garantido e você não terá seu nome divulgado em qualquer publicação.

Lourdes das Neves Miranda – Tel: (11) 4666-6066 ramal 1075

III. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

IV - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de 20 .

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Assinatura do pesquisador

(carimbo ou nome legível)

Anexo C

Protocolo para caracterização molecular por RAPD

Os isolados de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* foram semeados em 20 mL de caldo YEPD (extrato de levedura 1%, peptona 1%, dextrose 2%; Difco, USA), e incubados a 30°C por 18 a 20 horas, sob agitação. A extração e purificação do DNA foram realizadas utilizando-se GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham BioSciences, England). O DNA extraído foi quantificado em aparelho GeneQuant (Amersham BioSciences, England) e posteriormente submetido à reação de amplificação em termociclador DNA Engine MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler (Massachusetts, USA).

Os passos adotados, descritos em detalhe a seguir, foram os seguintes: Extração do DNA; Quantificação do DNA; Amplificação do DNA e Análise do DNA.

Extração do DNA

Foram observados os seguintes procedimentos:

1. Semeadura dos isolados, previamente identificados, em Agar Sabouraud e incubação por 48 horas a 30°C;
2. Semeadura de 5 a 6 colônias isoladas em caldo YEPD e incubação por 18 a 20 horas a 30°C, sob agitação;
3. Transferência de 30U da cultura em caldo YEPD para um microtubo de capacidade de 2,0 mL (1U equivale à massa de células que produzirá uma absorbância de 1.0 a 600 nm por cada mililitro da cultura);
4. Centrifugação a 13000 rpm por 30 segundos e descarte do sobrenadante;

5. Acréscimo de 1,0 mL de solução salina estéril e agitação com auxílio do vortex;
6. Centrifugação a 13000 rpm por 1 minuto e descarte do sobrenadante;
7. Adição de 45 µL de Lyticase Buffer (0,9 M sorbitol, 0,1 M Tris-HCl pH 8,0, 0,1 M EDTA) e mistura em agitador (vortex) até ressuspensão total do sedimento;
8. Adição de 5 µL de Lyticase (2,5 U/µL; Sigma) e mistura em agitador (vortex);
9. Incubação da suspensão de células a 37°C por uma hora;
10. Dispersão das células com auxílio do agitador (vortex) e adição de 10 µL de proteinase K (20 mg/mL diluídas em Tris-HCl 10 mM pH 8,0; Sigma);
11. Incubação a 55°C por 15 minutos, agitando ocasionalmente durante o processo;
12. Adição de 500 µL de Extration Solution (Amersham BioSciences, England) e mistura com auxílio de agitador (vortex);
13. Incubação à temperatura ambiente por 10 minutos, com agitação ocasional;
14. Centrifugação a 13000 rpm por 2 minutos e recuperação do sobrenadante (o sedimento corresponde a debris celulares); durante a centrifugação colocação na coluna GFX (Amersham BioSciences) em um tubo coletor e aquecimento em água ultrapura estéril a 70°C;
15. Transferência do sobrenadante para coluna GFX (sem retirada do sedimento) e centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto;
16. Remoção da coluna GFX e descarte da solução do tubo coletor;
17. Retorno da coluna GFX para tubo coletor e adição de 500 µL de Extration Solution;
18. Centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto;
19. Remoção da coluna GFX e descarte da solução do tubo coletor;

20. Retorno da coluna GFX ao tubo coletor e adição de 500 µL de Wash Solution (Amersham BioSciences, England);
21. Centrifugação a 13.000 rpm por 3 minutos;
22. Descarte do tubo coletor e transferência da coluna GFX para um microtubo de capacidade de 1,5 mL;
23. Adição de 100 µL de água ultrapura estéril pré-aquecida (70oC) diretamente sobre a coluna;
24. Incubação por 1 minuto à temperatura ambiente;
25. Centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto para recuperação do DNA purificado; o volume recuperado é de 80 a 100% do volume de eluição acrescentado.

Quantificação do DNA

Após a extração, o DNA extraído é diluído em água na proporção 1:50 e submetido à quantificação em aparelho GeneQuant. O DNA dosado é então novamente diluído até atingir a concentração final de 10 ng/µL, dos quais 10 µL são aplicados na reação de amplificação do DNA (100 ng de DNA).

Amplificação do DNA

Para as reações de amplificação de DNA seguiu-se o protocolo de RAPD (*Random Amplified Polymorphic of DNA*) adotado por Aoki et al. (1999) utilizando um volume final de 50 µL.

Os ingredientes utilizados na reação foram: 100 ng de DNA; 1,0 µM de iniciador (*primer*) Oligo 2 (5' TCACGATGCA 3'; InVitrogen); iniciador (*primer*) Oligo 3 (5'-ATC-GAT-CSS-C-3'); 200 µM de cada dNTP (InVitrogen, USA); 1,5 mM de cloreto de magnésio (InVitrogen); 2,5 U de *Platinum Taq* polimerase (InVitrogen) em tampão 10X para PCR fornecido pelo mesmo fabricante.

As reações de amplificação são realizadas em termociclador DNA Engine MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler nas seguintes condições: 4 minutos a 94°C; 35 ciclos de 2 minutos a 94°C; 2 minutos a 32°C e 2 minutos a 72°C cada; 10 minutos a 72°C e um ciclo final a 4°C.

Análise do DNA

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão TBE 0,5X (Tris-Borato-EDTA) a 100 volts por aproximadamente 120 minutos. Foi incorporado ao gel, 10 µL de *Sybr Safe*TM DNA gel stain (Invitrogen) para posterior digitalização do gel em equipamento de fotodocumentação (AlphaImager 2200 Systems, Alpha Innotech, CA, EUA).

Como marcador de peso molecular, foi utilizado 100 bp *Ladder* (Invitrogen) em todas as corridas eletroforéticas, permitindo visualizar 15 bandas entre os pesos moleculares de 100 e 1500 quilobases (kb).

Após a corrida eletroforética, os perfis de cada isolado foram determinados de acordo com a quantidade, posição e peso molecular das bandas. Classificaram-se os isolados como iguais (quando o número e posição das bandas no gel em relação à origem de aplicação eram idênticos) ou diferentes (quando apresentaram uma ou mais bandas diferentes em relação à origem de aplicação).

Anexo D

Gel de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)

A realização do processo de gel de eletroforese em campo pulsado — PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) — é desenvolvida em três fases, a saber:

- ❖ Extração e preparo dos blocos de DNA: Durante a extração do DNA, para evitar a quebra mecânica do mesmo, as amostras são envolvidas em blocos de agarose, que serão inseridos posteriormente no gel.
- ❖ Preparo do gel para corrida: O gel contendo o DNA extraído é submetido à corrente elétrica que se alterna periodicamente de acordo com a programação estipulada, sendo que a migração do DNA ocorre do pólo positivo, para o pólo negativo.
- ❖ Análise do DNA: O tempo requerido para os fragmentos de DNA de diferentes tamanhos se reorientarem no novo campo elétrico é proporcional ao seu peso molecular, permitindo a separação dos fragmentos de DNA. Fragmentos maiores gastam um maior tempo de reorientação no novo campo elétrico, ao passo que fragmentos menores migram mais rápido.

A seguir, relacionamos os passos adotados no desenvolvimento de cada fase do processo.

Extração e preparo dos blocos de DNA

PRIMEIRO DIA:

1. Separação das cepas a serem extraídas;
2. Semeadura em ágar Sabouraud com cloranfenicol por 48 horas à 35°C.

TERCEIRO DIA:

3. Retirada de algumas colônias (cerca de cinco) e seu cultivo em 7 mL de caldo YEPD, durante 12-15 horas à 30°C.

QUARTO DIA:

4. Colocação dos tubos contendo as leveduras cultivadas em agitador mecânico;
5. Centrifugação por 10 minutos a 3000 rpm;
6. Separação de duas baterias de tubos *eppendorf* de 1,5 mL, tampados e numerados;
7. Pesagem da primeira bateria de tubos *eppendorf*;
8. Feitura de quadro de identificação das amostras (conforme exemplo a seguir);

Nº Amostra	Código	Eppendorf vazio (g)	Eppendorf cheio (g)	Peso de células	EDTA 50 mM (µL)	Volume real de EDTA 50 mM (µL)
1	N 3 pele	0,9974	1,1086	0,1112	111,2	101,0
2	N 3 hemocultura	0,9971	1,1043	0,1072	107,2	97,0

9. Dissolução da agarose low melt e colocação no banho-maria à 58°C;
10. Descarte do sobrenadante dos tubos;
11. Adição de 1 mL de água destilada, agitação no *vortex* para suspensão das células e centrifugação por 10 minutos à 3000 rpm;
12. Adição de 150 µL de EDTA 50 mM (pH 8,0) a cada *eppendorf* da bateria 2;
13. Descarte do sobrenadante dos tubos centrifugados, deixando só o *pellet*;

14. Suspensão das células do *pellet* em 1mL de água destilada, agitação no vortex e transferência para os *eppendorfs* pré – pesados (bateria 1) virando o tubo até a última gota;
15. Centrifugação por 15 segundos a 13000 rpm e remoção de toda água por aspiração;
16. Pesagem dos *eppendorfs* contendo o *pellet* e anotação na tabela do peso do obtido;
17. Adição de EDTA 50 mM pH8,0 em volume equivalente ao peso das células do *pellet* em mg [(peso do *eppendorf* cheio)—(peso do *eppendorf* vazio)X1000];
18. Agitação no *vortex* para padronização da quantidade de DNA nos *plugs* para os volumes não ficarem desproporcionais e facilitar sua comparação;
19. Pipetagem de 50 µL da suspensão de leveduras nos *eppendorfs* da bateria 2 e agitação no *vortex*;
20. Adição de 40 µL de solução de Lyticase a cada tubo;
21. Adição de 240 µL de agarose *low melt* a 2% à 50°C a cada tubo, homogeneizando com a ponteira (troca de ponteira a cada tubo);
22. Numeração dos moldes e colocação de fita adesiva na base para evitar a queda dos *plugs*;
23. Preenchimento cuidadoso dos moldes com a solução: 4 pocinhos para cada levedura, evitando a formação de bolhas. Deste modo, o cromossoma completo fica protegido dentro do bloco de gel de agarose solidificado;
24. Colocação dos moldes num depósito de plástico em câmara úmida – incubação à 5°C por 15 minutos e incubação à 37°C por 2 horas (em banho-maria seco);
25. Numeração dos poços na placa de cultura de células e adição de 2,0 mL de NET e 75 µL de proteinase K em cada poço;
26. Remoção dos *plugs* dos moldes, com o auxílio de uma lingueta apropriada e seu depósito nos pocinhos contendo NET + proteinase K. Estes procedimentos exigem manipulação cuidadosa e atenção para não ocorrer misturar de amostras;

27. Cobertura da placa com tampa e sua vedação com fita crepe com a finalidade de evitar evaporação do líquido e infiltração de água do banho-maria, seguida de incubação *overnight* a 50°C.

QUINTO DIA:

28. Aspiração do NET e proteinase K dos pocinhos e adição de 2 mL de CHEF TE 1X;
29. Lavagem por 3 vezes com CHEF TE 1X à temperatura ambiente, deixando em repouso por 1 hora entre as lavagens;
30. Adição de CHEF TE 1X mais uma vez e incubação *overnight* a 5°C, cobrindo a placa com a tampa ou filme plástico.

SEXTO DIA:

31. Colocação de 1 mL de CHEF TE 1X, em *eppendorfs* numerados de modo correspondente ao dos números das amostras extraídas;
32. Guarda dos bloquinhos contidos na placa de cultura de células nos *eppendorfs* de numeração correspondente para conservação a 5°C.
33. Preparo do gel para a corrida

SÉTIMO DIA:

34. Definição do rol de pacientes a serem analisados;
35. Determinação da sequência segundo a qual os bloquinhos serão posicionados no pente, por exemplo: PM (Peso Molecular), ATCC (Cepa de referência para comparação), HEMOCULTURA 1 (Amostra de hemocultura do paciente 1 do rol), VIGILÂNCIA(S) 1 (Amostra(s) de vigilância do paciente 1 do rol), HEMOCULTURA 2 (Amostra de hemocultura do paciente 2 do rol), VIGILÂNCIA(S) 2 (Amostra(s) de vigilância do paciente 2 do rol), etc;
36. Corte de um bloquinho de cada amostra e colocação nos pocinhos de uma placa de ELISA previamente preparados com 200 µL de TBE 0,5 X, segundo a sequência estabelecida nos dois itens anteriores;

37. Lavagem com TBE 0,5 X logo após o término da colocação de todos os bloquinhos na placa de ELISA: substituição do TBE 0,5 X mediante aspiração e reposição de igual quantidade de nova solução de TBE 0,5 X com a finalidade de retirada de resíduo do CHEF TE nos quais os bloquinhos estavam armazenados. Os bloquinhos permanecem por uma hora nesta nova solução;
38. Preparação do aparelho de eletroforese CHEF-DR II com a colocação de tampão de 2000 mL de TBE 0,5 X;
39. Acionamento do *no-break* e da bomba do sistema de refrigeração acoplado ao aparelho CHEF-DR II para resfriamento do tampão de 2000 mL de TBE 0,5 X. e obtenção de temperatura entre 12°C e 14°C;
40. Montagem do suporte para moldagem do gel de agarose;
41. Pesagem do pó de agarose ultrapura para o preparo do gel a 0,8% (0,8 g de pó para 100 mL de TBE 0,5 X), dissolvendo-o em microondas;
42. Colocação nas pontas do pente dos bloquinhos (que permaneceram imersos em TBE 0,5 X nos pocinhos da placa de ELISA), soldando-os com pequenas gotas da agarose ultrapura recém preparada;
43. Encaixe do pente no suporte montado, vertendo agarose ultrapura, aguardando-se 20 minutos para sua solidificação;
44. Após a solidificação do gel de agarose, retirada cuidadosa do pente do suporte e preenchimento das cavidades resultantes também com agarose ultrapura;
45. Desmonte do suporte, utilizando luvas, com limpeza dos resíduos nas bordas e na base metálica sob o gel; Colocação do gel na cuba do aparelho e em seguida digitação da programação (ver box na próxima página);
46. Espera de 1 hora para igualar a temperatura do tampão e do gel;
47. Acionamento do início da corrida (botão START).

NONO DIA:

48. Retirada cuidadosa do gel do suporte – utilizando luvas - após o aparelho sinalizar o final das 48 horas de corrida;

49. Coloração do gel, durante 30 minutos, com uma solução de brometo de etídio (250 mL de água destilada e 15 µL de Brometo de etídio);
50. Retirada do excesso de brometo de etídio do gel em banho de água destilada durante 30 minutos;
51. Fotografia do gel sob iluminação ultravioleta no aparelho Alphaimage AlphaEase Digital Imaging System (Alpha Innotech, San Leandro, CA, EUA).

<p>Programação do aparelho CHEF-DR II C. parapsilosis e C. glabrata: Temperatura: 12°C; Voltagem: 4,6 V/cm; Tempo de corrida: 40 horas; Tempo inicial: 120 segundos; Tempo final: 280 segundos. C. albicans: Temperatura: 12°C; Voltagem: 4,5 V/cm; Tempo total de corrida: 50 horas; Bloco 1: Tempo inicial e tempo final: 120 segundos; Tempo: 20 horas. Bloco 2: Tempo inicial e tempo final: 240 segundos; Tempo: 30 horas.</p>

Anexo E

Eletroforese Em Campo Pulsado Com Utilização De Enzima De Restrição

A realização do processo de análise do DNA genômico utilizando enzimas de restrição seguida por eletroforese em campo pulsado – REAG é desenvolvida da seguinte forma:

Colocação do DNS (200 μ L);
Colocação dos blocos de DNA em poços de uma placa ELISA de 96;
Remoção do DNS, logo que o último bloco tenha sido colocado na placa;
Substituição por DNS fresco e incubação em temperatura ambiente por 1 hora;
Repetição desta lavagem mais 4 vezes, trocando o DNS a cada hora;
Colocação de 100 μ L de TSE (Tampão Sem Enzima) em cada poço;
Colocação da placa ELISA em refrigerador, mantendo-a a 5°C por 30-60 minutos;
Retirada da placa ELISA do refrigerador.
Retirada do TSE dos poços da placa ELISA.
Colocação de 100 μ L de TCE (Tampão Com Enzima) em cada poço da placa ELISA;
Incubação em estufa durante 15-18 horas, SfiI (500C) e PvuII (37°C).
Retirada do TCE;
Lavagem com TBE 200 μ L. Remoção do TBE, logo que o último bloco tenha sido colocado na placa. Substituição por TBE fresco e incubação em temperatura ambiente ou geladeira por 20 minutos.
Repetição desta lavagem 2 vezes, trocando o TBE a cada 20 minutos.
Proceder a preparação do gel a 1% , conforme o anexo D.

TAMPÃO DNS

- Trisma base 1M, pH 8,0
5,0ml
- Cloreto de magnésio 1M
250 μ l H2O

Referências

- Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Pinzcowski H, Vartivarian S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. Clin Infect Dis. 1997; 24: 1122-8.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica - Módulo VII. . Brasília: Ministério da Saúde; 2004.
- Alexander JW, Boyce ST, Babcock, GF. The process of microbial translocation. Ann Surg. 1990; 212:496-510.
- Almirante B, Rodríguez D, Cuenca-Estrella M, Almela M, Sanchez F, Ayats J, Alonso-Tarres, Rodriguez-Tudela JL, Pahissa A, Barcelona Candidemia Project Study Group. 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. J Clin Microbiol. 2006; 44:1681-5.
- Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayats J, Jiménez M, Saballs P, Fridkin SK, Morgan J, Rodríguez-Tudela JL, Warnock DW, Pahissa A. Barcelona Candidemia Project Study Group. Epidemiology and Predictors of Mortality in Cases of *Candida* Bloodstream Infection: Results from Population-Based Surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. J Clin Microbiol. 2005; 43:1829-35.

- Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayats J, Gimenez M, Saballs P, Fridkin SK, Morgan J, Rodriguez-Tudela JL, Warnock DW, Pahissa A, Barcelona Candidemia Project Study Group. Epidemiology and Predictors of Mortality in Cases of *Candida* Bloodstream Infection: Results from Population-Based Surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. J Clin Microbiol. 2005; 43:1829-35.
- Ang BSP et al. Candidemia from a Urinary tract source: Microbiological aspects and clinical significance. Clin Infect Dis. 1993; 17: 662-6.
- Aoki FH, Imai T, Tanaka R, Mikami Y, Taguchi H, Nishimura NF, Nishimura K, Miyaji M, Schreiber AZ, Branchimi MLM. New primer pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotype A or B prepared on the basis of random amplified polymorphic DNA fingerprint pattern analyses. J Clin Microbiol. 1999; 37:315-20.
- Arendrup MC, Fuusd K, Gahrn-Hansen B, Jensen IM, Knudsen JD, Lundgren B, Schonheyder HC, Tvede M. Seminal surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers isolates with reduced azole susceptibility. J Clin Microbiol. 2005; 43:4434-40.
- Beck-Sagué CM, Jarvis WR. Secular trends in the epidemiology nosocomial infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. J Infect Dis. 1993; 167:1247-51.
- Beighton D, Ludford R, Clark DT, Brailsford SR, Pankhurst CL, Tiresley GF, Fiske J, Lewis D, Daly B, Khalifa N, et al. Use of CHROMagar

Candida medium for isolation of yeasts from dental samples.

J Clin Microbiol. 1995; 33:3025-7.

Benjamin DK, Stoll BJ, Fanaroff AA, McDonald AS, Oh W, Higgins RD, Duara S, Poole K, Laptook A, Goldberg R; National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Neonatal candidiasis among extremely low birth weight infants: risk factors, mortality rates, and neurodevelopmental outcomes at 18 and 22 months. Pediatrics. 2006; 117:84-92.

Binelli CA, Moretti ML, Assis RS, Sauaia N, Menezes PR, Ribeiro E, Geiger DCP, Mikami Y, Miyaji M, Oliveira MS, Barone AA, Levin AS. Investigation of the possible association between nosocomial candiduria and *Candidaemia*. Clin Microbiol Infect. 2006; 12:538-43.

Bloch KV, Coutinho ESF. Fundamentos da Pesquisa Epidemiológica. In: Medronho RA, Carvalho DM, Bloch KV, Luiz RR, Werneck GL. Epidemiologia. São Paulo: Editora Atheneu; 2004. p. 107-14.

Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM, Edwards JE, Patterson JE, Pfaller MA, Rangel-Frausto MS, Rinaldi MG, Saiman L, Wiblin RT, Wenzel RP. Risk factors for *Candida* bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. Clin Infect Dis. 2001; 33:177-86.

Bonassoli LA, Bertoli M, Svidzinski TIE. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. J Hosp Infect. 2005; 59:159-62.

- Boyce JM, Pittet D. Guideline for hand hygiene in health-care settings. Morb Mortal Wkly. Rep. 2002; 51(RR-16):1-45.
- Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Frempong T, Isenberg HD. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol. 1994; 32:452-6.
- Brito LR, Guimaraes T, Nucci M, Rosas RC, Almeida LP, Da Matta DA, Colombo AL. Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. Med Mycol. 2006; 44:261-6.
- Centers for Disease Control and Prevention: National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report: data summary from January 1992-June 2001. Am J Infect Control. 2001; 29:404-21.
- Charlier C, Hart E, Lefort A, Ribaud P, Dromer F, Denning DW, Lortholary O. Fluconazole for the management of invasive candidiasis: where do we stand after 15 years? J Antimicrob Chemother. 2006; 57:384-410.
- Chen KW, Lo HJ, Lin YH, Li SY. Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of *Candida albicans* clinical isolates in Taiwan. J Med Microbiol. 2005; 54:249-58.
- Chou HH, Chiou CS, Chen KW, Li SY. Suitable restriction enzymes for pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Candida tropicalis*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007; 57:451-4.
- Chu G, Vollrath D, Davis RW. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. Science. 1986; 234:1582-5.

- Clark TA, Slavinski SA, Morgan J, Lott T, Arthington-Skaggs BA, Brandt ME, Webb MC, Flowers RH, Fridkin SK, Hajjeh RA. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. J Clin Microbiol. 2004; 42:4468-72.
- Cole GT, Halawa AA, Anaisse EJ. The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside. Clin Infect Dis. 1996; 22 (suppl 2):73-88.
- Colombo AL, Guimarães T, Silva LR, de Almeida Monfardini LP, Cunha AK, Rady P, Alves T, Rosas RC. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. Infect Control Hosp Epidemiol. 2007; 28:570-6.
- Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouer AS, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, Wannock D, Morgan J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. J Clin Microbiol. 2006; 44:2816-23. .
- Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouer AS, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, Wannock D, Morgan J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. J Clin Microbiol. 2006; 44:2816-23.
- Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouer AS, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, Wannock D, Morgan J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a

- nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. J Clin Microbiol. 2006; 44:2816-23.
- Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouer AS, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, Wannock D, Morgan J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. J Clin Microbiol. 2006; 44:2816-63.
- Colombo AL, Nucci M, Salomão R, Branchini, Richtmann, Derossi A, Wey SB. High rate of non-*albicans* candidemia in brazilian tertiary care hospitals. Diag Microbiol Infect Dis. 1999; 34:281-6.
- Costa SF, Marinho I, Araújo EAP, Manrique AEI, Medeiros EAS, Levin AS. Nosocomial fungaemia: a 2-year prospective study. J Hosp Infect. 2000; 45:69-72.
- Deak T, Beuchat LR. Comparison of the SIM, API 20 C and ID 32 C systems for identification of yeasts isolated from fruit juice concentrates and beverages. J Food Prot. 1993; 56:585-92.
- Diekema DJ, Messer SA, Brueggemann AB, Goffman SL, Doern GV, Herwaldt LA, Pfaller MA. Epidemiology of candidemia: 3 year results from emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. J Clin Microbiol. 2002; 40:1298-302.
- Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, Wenzel RP, Pfaller MA. An outbreak of *Candida parapsilosis* prosthetic valve endocarditis. Diagn Microbiol Infect Dis. 1997; 29:147-53.
- Diekema DJ, Pfaller MA, Jones RN. Age-related trends in pathogen frequency and antimicrobial susceptibility of bloodstream isolates in North

- America. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2000. *Int J Antimicrob Agents*. 2002; 20:412-8.
- Diekema DJ, Pfaller MA. Nosocomial candidemia: an ounce of prevention is better than a pound of cure. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004; 25:624-6.
- Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie EJ. *Candida*. In: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA (eds). *Clinical Mycology*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2003. p. 195-239.
- Doebbeling BN, Lehmann PF, Hollis RJ, Wu L, Widner AF, Voss A, Pfaller MA. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis with isoenzyme profiles as a typing system for *Candida tropicalis*. *Clin Infect Dis*. 1993; 16:377-83.
- Edmond MB, Wale E, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections in United State hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis*. 1999; 29:239-44.
- Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3:685-702.
- Ellepolar ANB, Morrisom CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol*. 2005; 43:65-84.
- El-Mohandes AE, Johnson-Robbins L, Keiser JF, Simmens SJ, Aure MV. Incidence of *Candida parapsilosis* colonization in an intensive care nursery population and its association with invasive fungal disease. *Pediatr Infect Dis J*. 1994; 13:520-4.

- Eloy O, Blanc V, Pina P, Gaudart A, Bressolle ML, Plainvert C, Decousser JW, Pagon B, Allouch PY; Le College de bacteriologie virology hygiene (ColBVH). Epidemiology of candidemia: results of a one month French hospitals-based surveillance study in 2004. *Pathol Biol (Paris)*. 2006; 54:523-30.
- Ergon MC, Gülay Z. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from urine at an intensive care unit. *Mycoses*. 2005; 48:126-31.
- Espinel-Ingroff A, Vazquez JA, Boikov D, Pfaller MA. Evaluation of DNA-based typing procedures for strain categorization of *Candida* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1999; 33:231-9.
- Falaas ME, Apostolou KE, Pappas VD. Attributable mortality of candidemia: a sistematic review of matched cohort and case-control studies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006; 25:419-25.
- Fernández E. Estudios epidemiológicos (STROBE). *Med Clin (Barc)*. 2005; 125(Supl. 1):43-8.
- Fridkin SK, Kaufman D, Edwards JR, Shetty S, Horan T, National Nosocomial Infections Surveillance System Hospitals. Changing incidence of *Candida* bloodstream infections among NICU patients in the United States: 1995-2004. *Pediatrics*. 2006; 117:1680-7.
- Fridkin SK. The changing face of fungal infections in health care settings. *Clin Infect Dis*. 2005; 41:1455-60.
- Gales AC, Mamizuka EM. Tipagem epidemiológica de microorganismos. In: Levy CE (coord.). *Manual de Microbiologia Clínica Aplicada ao Controle*

- de Infecção Hospitalar. 2ª ed. São Paulo: Associação Paulista de Estudos e Controle de Infecção Hospitalar; 2004. p. 158-68.
- García San Miguel L, Pla J, Cobo J, Navarro F, Sánchez-Sousa A, Alvarez MA, Martos I, Moreno S. Morphotypic and genotypic characterization of sequential *Candida parapsilosis* isolates from an outbreak in a pediatric intensive care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004; 49:189-96.
- Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control*. 1988; 16:128-40.
- Gil-Lamaignere C. , Roilides E. ,Hacker J. , Müller FMC . Molecular typing for fungi-a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. *Clin Microbiol Infect*. 2003; 9:172-85.
- Godoy P, Tiraboschi IN, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, Da Matta DA, Colombo AL. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003; 98:401-5.
- Goldani LZ, Mario PS. *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. *J Infect*. 2003; 46:150-60.
- Gudlaugsson O, Gillespi S, Lee K, Berg JV, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D. Attributable Mortality of Nosocomial Candidemia, Revisited. *Clin Infect Dis*. 2003; 37:1172-7.
- Gutierrez J, Lozano C, Coronilla J, Nogales C. Evaluation of the ABT 32 C, Automicrobic system and API 20 C using clinical yeast isolates. *Ann Biol Clin*. 1994; 50: . 443-6.

- Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA, Phelan M, Morgan J, Lee-Yang W, Ciblak MA, Benjamin LE, Sanza LT, Huie S, Yeo SF, Brandt ME, Warnocki DW. Incidence of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species and In Vitro Susceptibilities of Isolates Collected from 1998 to 2000 in a Population-Based Active Surveillance Program. J Clin Microbiol 2004; 42:1519-27.
- Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA, Phelan M, Morgan J, Lee-Yang W, Ciblak MA, Benjamin LE, Sanza LT, Huie S, Yeo SF, Brandt ME, Warnocki DW. Incidence of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species and In Vitro Susceptibilities of Isolates Collected from 1998 to 2000 in a Population-Based Active Surveillance Program. J Clin Microbiol. 2004; 42:1519-27.
- Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. Clin Microbiol Rev. 1995; 8:462-78.
- Hedderwick SA, Lyons MJ, Liu M, Vazquez JA, Kauffman CA. Epidemiology of Yeast Colonization in the Intensive Care Unit. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000; 19:663-70.
- Huang YC, Su LH, Wu TL, Lin TY. Genotyping analysis of colonizing *Candida* isolates from very-low-birth weight infants in a neonatal intensive care unit. J Hosp Infect. 2004; 58:200-3.

- Iseberg HD, Tucci V, Cintron F, Singer C, Weinstein GS, Tyras DH. Single-source outbreak of *Candida tropicalis* complicating coronary bypass surgery. J Clin Microbiol. 1989; 27:2426-8.
- Iwen PC, Kelly DM, Reed EC, Hinrichs SH. Invasive infection due to *Candida krusei* in immunocompromised patients not treated with fluconazole. Clin Infect Dis. 1995; 20:342-7.
- Kanellopoulou M, Stamos G, Petinnelli I, Savala M, Tzimogianni A, Legakis NJ, Foustoukou M, Papafragas EV, Velegraki A. Subtyping and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. in the intensive care unit of a Greek general hospital. Int J Antimicrob Agents. 2001; 18:179-83.
- Kao AS, Brandt ME, Pruitt WR, Conn LA, Perkins BA, Stephens DS, Baughman WS, Reingold AL, Rothrock GA, Pfaller MA, Rinner RW, Hajjeh RA. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. Clin Infect Dis. 1999; 29:1164-70.
- Karlowicz MG, Hashimoto LN, Kelly RE, Buescher ES. Should central venous catheters be removed as soon as candidemia is detected in neonates? Pediatrics. 2000; 106:E63.
- Kauffman CA. Candiduria. Clin Infect Dis. 2005; 41:S371-6.
- Kaufman DA, Gurka MJ, Hazen KC, Boyle R, Robinson M, Grossman LB. Patterns of fungal colonization in preterm infants weighing less than 1000 grams at birth. Pediatr Infect Dis J. 2006; 25:733-7.

- Kaufmann ME. Field Gel Electrophoresis. In: Woodford N, Johnson AP. Methods in molecular medicine: molecular bacteriology: protocols and clinical applications. Totowa, NJ, 1996. v. 15, p. 33-49.
- Klein CH, Bloch KV. Estudos seccionais. In: Medronho RA, Carvalho DM, Bloch KV, Luiz RR, Werneck GL. Epidemiologia. São Paulo: Editora Atheneu; 2004. p. 125-50.
- Knaus WA, et al. APACHE II: A severity of disease classification system. Crit Care. Med. 1985; 13:818-29.
- Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. Infect. Immun. 2002; 70:878-88.
- Kuhn DM. , Mukherjee PK, Clark TA, Pujol C, Chandra J, Hajjeh RA, Warnock DW, Soll DR, Ghannoum MA. *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. Emerg Infect Dis. 2004; 10:1074-81.
- Laupland KB, Gregson DB, Church DL, Ross T, Elsayed S. Invasive *Candida* species infections: a 5 year population-based assessment. J Antimicrob Chemother. 2005; 56:532-7.
- Leon C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Almirante B, Nolla-Salas J, Álvarez-Lerma F, Garnacho-Montero J, León MA, EPCAN Study Group A bedside scoring system (“*Candida* score”) for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with *Candida* colonization. Crit Care Med. 2006; 33:730-7.

- Levin AS, Costa SF, Mussi NS, Basso M, Sinto SI, Machado C, Geige DC, Villares MCB, Schreiber AZ, Barone AA, Branchini MLM. *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semi-implantable central venous catheters and the hands of healthcare workers. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998; 30:243-9.
- Lin MY, Carmeli Y, Zumsteg J, Flores EL, Tolentino J, Sreeramoju P, Weber SG. Prior Antimicrobial Therapy and Risk for Hospital-Acquired *Candida glabrata* and *Candida krusei* Fungemia: a Case-Case-Control Study. *Antimicrob Agents Chemoth*. 2005; 49:4555-60.
- Lupetti A, Tavanti A, Davini P, Ghelardi E, Corsini V, Merusi I, Boldrini A, Campa M, Senesi S. Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol*. 2002; 40:2363-9.
- Maki DG et al . A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med* 1977; 296: 1305-9.
- Mandell. GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th edition. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005.
- Marais E, Stewart R, Duse AG, Rosekilly IC, Jong G, Aithma N. *Candida parapsilosis* detected in TPN using the BacT/Alert system and characterized by randomly amplified polymorphic DNA. *J Hosp Infect*. 2004; 56:291-6.
- Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, Eggimann P, Ruef C, Garbino J, Calandra T, Glauser MP, Täuber MG, Pittet D, Fungal Infection Network of Switzerland (FUNGINOS). Epidemiology of Candidemia in Swiss

- Tertiary Care Hospitals: Secular Trends, 1991-2000. Clin Infect Dis 2004; 38:311-20.
- Marr KA, Seidel K, White TC, Bowden RA. Candidemia in allogeneic blood and marrow transplant recipients: evolution of risk factors after the adoption of prophylactic fluconazole. J Infect Dis. 2000; 181:309-16.
- Mellado E, Cuenca-Estrella M, Regadera J, González M, Díaz-Guerra TM, Rodríguez-Tudela JL. Sustained gastrointestinal colonization and systemic dissemination by *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis* in adult mice. Diagn Microbiol Infect Dis. 2000; 38:21-8.
- Merz WG. *Candida lusitanae*: frequency of recovery, colonization, infection and amphotericin B resistance. J Clin Microbiol. 1984; 20:1194-5.
- Milan EP, Zaror L. Leveduras: Identificação laboratorial. In: Sidrim JJC, Rocha MFG. Micologia Médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 89-100.
- Morgan J, Meltzer MI, Plikaytis BD, Sofair AN, Huie-White S, Wilcox S, Harrison LH, Scaberg EC, Hajjeh RA, Teutsch SM. Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. Infect Control Hosp Epidemiol. 2005; 26:540-7.
- Moro ML, Maffei C, Manso E, Morace G, Polonelli L, Biavasco F. Nosocomial outbreak of systemic candidosis associated with retrograde medication administration in a neonatal intensive care unit. Infect Control Hosp Epidemiol. 1990; 11:27-35.

- Nantel A. The long hard road to a completed *Candida albicans* genome. Fungal Genet Biol. 2006; 43:311-5.
- Nucci M, Anaissie E. Revisiting the source of candidemia: skin or gut? Clin Infect Dis. 2001; 33:1959-67.
- Nucci M, Colombo AL. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007; 58:77-82.
- Nucci M, Colombo AL. Risk factors for breakthrough candidemia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002; 21:209-11.
- O'Grady NP, Alexander M, Dellinger EP, Gerberding JL, Heard SO, Maki DG, Masur H, McCormick RP, Mermel LA, Pearson ML, Raad II, Randolph A, Weinstein RA. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. Morb Mortal Wkly Rep. 2002; 51:1-29.
- Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J Clin Microbiol. 1994; 32:1923-9.
- Ostrosky-Zeichner L, Pappas PG. Invasive candidiasis in the intensive care unit. Crit. Care Med. 2006; 34:857-63.
- Ostrosky-Zeichner L. Prophylaxis and treatment of invasive candidiasis in the intensive care setting. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004; 23:739-44.

Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamil RJ, Larsen RA, Powderly W, Kauffman CA, Hyslop N, Mangino JE, Chapman S, Horowitz HW, Edwards JE, Dismukes WE, NIAID Mycoses study group. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis.* 2003; 37:634-43.

Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, Kauffman CA, Hyslop N, Mangino JE, Chapman S, Horowitz HW, Edwards JE, Dismukes WE, NIAID Mycoses Study Group. A Prospective Observational Study of Candidemia: Epidemiology, Therapy, and Influences on Mortality in Hospitalized Adult and Pediatric Patients. *Clin Infect Dis.* 2003; 37:634-43.

Pappas PG. Invasive Candidiasis. *Infect Dis Clin N Am.* 2006; 20:485-506.

Pasqualotto AC, Rosa DD, Medeiros LR, Severo LC. Candidaemia and cancer: patients are not all the same. *BMC Infect Dis.* 2006; 6:50.

Pasqualotto AC, Nedel WL, Machado TS, Severo LC. A comparative study of risk factors and outcome among outpatient-acquired and nosocomial Candidaemia. *J Hosp Infect.* 2005; 60:129-34.

Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ, Messer SA. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:3254-9.

- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20:133-63.
- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20:133-63.
- Pfaller MA, Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 2004; 42:4419-31.
- Pfaller MA, Diekema DJ. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin Microbiol Infect.* 2004; 10(Suppl 1):11-23.
- Pfaller MA, Houston A, Coffman NS. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol.* 1996; 34:58-61.
- Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin. Infect. Dis.* 2006; 43:S3-S14.
- Pfaller MA, Rangel-Frausto MS, Rinaldi MG, Saiman L, Wiblin RT, Wenzel RP, NEMIS Study Group. Risk factors for *Candidal* bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. *Clin Infect Dis.* 2001; 33:177-86.
- Pfaller MA, Wenzel RP. The epidemiology of fungal infections. *Candida*. In: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA (eds). *Clinical Mycology*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2003. p. 3-19. .

- Pfaller MA. Epidemiology of candidiasis. *J Hosp Infect.* 1995; 30:S329-38.
- Pfaller MA. Nosocomial candididasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin Infect Dis.* 1996; 22:S89-94.
- Pitet D, Monod M, Suter P, Frenk E, Auckenthalar R. *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg.* 1994; 220:751-8.
- Posteraro B, Bruno S, Boccia S, Ruggiero A, Sanguinetti M, Spica VR, Ricciardi G, Fadda G. *Candida parapsilosis* bloodstream infection in pediatric oncology patients: results of an epidemiologic investigation. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004; 25:641-5.
- Powell HL, Sand CA, Rennie RP. Evaluation of CHROMagar *Candida* for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998; 32:201-4.
- Prentice HG, Kibbler CC, Prentice AG. Towards a targeted, risk-based, antifungal strategy in neutropenic patients. *Br J Haematol.* 2000; 110:273-84.
- Puzniak L, Teutsch S, Powderly W, Polish L. Has the epidemiology of nosocomial candidemia changed? *Infect Control Hosp. Epidemiol.* 2004; 25:628-33.
- Rangel-Frausto MS, Wiblin T, Blumberg HM, Saiman L, Patterson J, Rinaldi M, Pfaller M, Edwards JE, Jarvis R, Dawson J, Wensel RP, NEMIS Study Group. National Epidemiology of Mycoses Survey (NEMIS): Variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. *Clin Infect Dis.* 1999; 29:253-8.

- Rho J, Shin JH, Song JW, Park MR, Kee SJ, Jang SJ, Park YK, Suh SP, Ryang DW. Molecular investigation of two consecutive nosocomial clusters of *Candida tropicalis* using pulsed-field gel electrophoresis. J Microbiol. 2004; 42:80-6.
- Richet H, Roux P, Des Champs C, Esnault Y, Andreumont A. Candidemia in French hospitals: incidence rates and characteristics. Clin Microbiol Infect. 2002; 8:405-12.
- Riederer K, Fozo P, Khatib R. Typing of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*: species-related limitations of electrophoretic karyotyping and restriction endonuclease analysis of genomic DNA. Mycoses. 1998; 41:397-402.
- Rodriguez D, Almirante B, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Sanchez F, Gene A, Xercavins M, Fontanals D, Rodriguez-Tudela JL, Warnock DW, Pahissa A - Barcelona Candidemia Project Study Group. Candidemia in Neonatal Intensive Care Units Barcelona, Spain. Pediatr Infect Dis J. 2006; 25:224-9.
- Sader HS, Hollis RJ, Pfaller MA. The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases. Clin Lab Med. 1995; 15:407-31.
- Saiman L, Ludington E, Pfaller M, Rangel-Frausto S, Wiblin T, Dawson J, Blumberg HM, Patterson JE, Rinaldi M, Edwards JE, Wenzel RP, Jarvis W, The National Epidemiology of Mycosis Survey Study Group. Risk factors for candidemia in neonatal intensive care unit patients. Pediatr Infect Dis J. 2001; 19:1119-24.

- Saiman L, Ludington E, Pfaller MA, Rangel-Frausto S, Wiblin RT, Dawson J, Blumberg HM, Patterson JE, Rinaldi M, Edwards JE, Wenzel RP, Jarvis W. Risk factors for candidemia in neonatal intensive care unit patients. *Pediatr Infect Dis. J.* 2000; 19:319-24.
- Sanchez V, Vasquez JA, Barth-Jones D, Dembry L, Sobel JD, Zervos MJ. Nosocomial acquisition of *Candida parapsilosis*: an epidemiologic study. *Am J Med.* 1993; 94:577-82.
- Sandven P, Bevanger L, Digraanes A, Haukland HH, Mannsaker T, Gaustad P. Norwegian Yeast Study Group. Candidemia in Norway (1991 to 2003): results from a nationwide study. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:1977-81.
- Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis.* 2002; 2:73-85.
- Santucci SG, Gobara S, Santos CR, Fontana C, Levin AS. Infections in a burn intensive care unit: experience of seven years. *J Hosp Infect.* 2003; 53:6-13.
- Saunders NA, Clewley JP. DNA amplification. In: Woodford N, Johnson AP. *Methods in molecular medicine: molecular bacteriology: protocols and clinical applications.* Totowa, NJ, 1996. v. 15, p. 63-79.
- Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome sized DNAs by pulsed field electrophoresis. *Cell.* 1984; 37:67-75.
- Sherertz RJ, Gledhill KS, Hampton KD, Pfaller MA, Givner LB, Abramson JS, Dillard RG. Outbreak of *Candida* blood-stream infections associated

with retrograde medication administration in a neonatal intensive care unit. *J Pediatr*. 1992; 120:455-61.

Shetty SS, Harrison LH, Hajjeh RA, Taylor T, Mirza SA, Schmidt AB, Sanza LT, Shutt KA, Fridkin SK. Determining risk factors for candidemia among newborn infants from population-based surveillance Baltimore, Maryland, 1998-2000. *Pediatr Infect Dis J*. 2005; 24:601-4.

Shin JH, Chae MJ, Song JW, Jung SI, Cho D, Kee SJ, Kim SH, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Changes in karyotype and azole susceptibility of sequential bloodstream isolates from patients with *Candida glabrata* candidemia. *J Clin Microbiol*. 2007; 45:2385-91.

Shin JH, Kee SJ, Shin MG, Kim SH, Shin DH, Lee SK, Suh SP, Ryang DW. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol*. 2002; 40:1244-8.

Shin JH, Og YG, Cho D, Kee SJ, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Molecular epidemiological analysis of bloodstream isolates of *Candida albicans* from a university hospital over a five-year period. *J Clin Microbiol*. 2005; 43:546-54.

Shin JH, Shin DH, Song JW, Kee SJ, Suh SP, Ryang DW. Electrophoretic karyotype analysis of sequential *Candida parapsilosis* isolates from patients with persistent or recurrent fungemia. *J Clin Microbiol*. 2001; 39:1258-63.

- Sidrim JJC, Rocha MFG. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
- Silva V, Zepeda G, Rybak ME, Febré N. Portación de levaduras en manos de estudiantes de Medicina. Rev Iberoam Micol. 2003; 20:41-5.
- Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. Clin Microbiol Rev. 2006; 19:512-30.
- Smith PB, Steinbach WJ, Benjamin DK. Neonatal Candidiasis. Infect Dis Clin N Am. 2005; 19:603-15.
- Sobel JD, Kauffman CA, McKinsey D, Zervos M, Vazquez JA, Karchmer AW, Lee J, Thomas C, Panzer H, Dismukes WE, National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Mycoses Study Group. Candiduria: a randomized, double-blind study of treatment with fluconazol and placebo. Clin Infect Dis. 2000; 30:19-24.
- Sullivan D, Coleman D. Candid dubliniensis: characteristics and identification. J Clin Microbiol. 1998; 36:329-34.
- Takakura S, Fujihara N, Sairo T, Kudo T, Iinuma Y, Ichiyama S. National surveillance of species distribution in blood isolates of *Candida* species in Japan and their susceptibility to six antifungal agents including voriconazole and micafugin. J Antimicrob Chemother. 2004; 53:283-9.
- Taylor BN, Harrer T, Pscheidl E, Schweizer A, Rölinghoff M, Schröppel K. Surveillance of nosocomial transmission of *Candida albicans* in an

intensive care unit by DNA fingerprinting. J Hosp Infect. 2003; 55:283-9.

Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, Hajjeh RA, Gaynes RP. Secular trends of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. Clin Infect Dis. 2002; 35:627-30.

Uzun O, Ascioğlu S, Anaissie EJ, REx JH. Risk factors and predictors of outcome in patients with cancer and breakthrough candidemia. Clin Infect Dis. 2001; 32:1713-7.

Valério HM, Weikert-Oliveira RC, Resende MA. Differentiation of *Candida* species obtained from nosocomial candidemia using RAPD-PCR technique. Rev Soc Bras Med Trop. 2006; 39:174-8.

Weems JJ, Chamberland ME, Ward J, Willy M, Padhye AA, Solomon SL. *Candida parapsilosis* fungemia associated with parenteral nutrition and contaminated blood pressure transducers. J Clin Microbiol. 1987; 25:1029-32.

Welbel SF, Mcneil MM, Kuykendall RJ, Lott TJ, Pramanik A, Silberman R, Oberle AD, Bland LA, Agüero S, Arduino M, Crow S, Jarvis WR. *Candida parapsilosis* bloodstream infections in neonatal intensive care unit patients: epidemiologic and laboratory confirmation of a common source outbreak. Pediatr Infect Dis J. 1996; 15:998-1002.

Wey SB, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel RP. Hospital-acquired candidemia: the attributable mortality and excess length of stay. Arch Intern Med. 1988; 148:2642-5.

- Wey SB, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel RP. Risk factors for hospital acquired candidemia: a matched case-control study. *Arch Intern Med.* 1989; 149:2349-53.
- White MH. Editorial response: the contribution of fluconazole to the changing epidemiology of invasive *Candida* infections. *Clin Infect Dis.* 1997; 24:1129-30.
- Wingard JR, Merz WG, Rinaldi MG, Johnson TR, Karp JE, Saral R. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated with fluconazole. *N Engl J Med.* 1991; 325:1274-7.
- Wingard JR. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis.* 1995; 20:115-25.
- Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis.* 2004; 39:309-17.
- Zancopé-Oliveira RM, James MJ, Derossi AP, Sampaio JL, Muniz MM, Li RK, Nascimento AS, Peralta JM, Reiss E. Strain characterization of *Candida parapsilosis* fungemia by molecular typing methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000; 1:514-20.
- Zaoutis TE, Argon J, Chu J, Berlin JA, Walsh TJ, Feudtner C. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. *Clin Infect Dis.* 2005; 41:1240-1.

- Zaoutis TE, MD, Coffin SE, Chu JH, MHS, Heydon K, Zhao H, Greves HM, Walsh TJ. Risk factors for mortality in children with candidemia. *Pediatr Infect Dis J*. 2005; 24:736-9.
- Zhang J, Hollis RJ, Pfaller MA. Variations in DNA subtype and antifungal susceptibility among clinical isolates of *Candida tropicalis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1997; 27:63-7.