

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE  
LEVEDURAS ISOLADAS EM UM HOSPITAL DO MATO GROSSO  
DO SUL**

**LUANA MIRELI CARBONERA RODRIGUES**

**DOURADOS- MS**

**2015**

**LUANA MIRELI CARBONERA RODRIGUES**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE  
LEVEDURAS ISOLADAS EM UM HOSPITAL DO MATO GROSSO  
DO SUL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados – Faculdade de Ciências da Saúde, para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira.

**DOURADOS- MS  
2015**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

R685c	<p>Rodrigues, Luana Mireli Carbonera. Caracterização fenotípica e molecular de leveduras isoladas em um hospital do Mato Grosso do Sul. / Luana Mireli Carbonera Rodrigues. – Dourados, MS : UFGD, 2015. 52f.</p> <p>Orientador: Profa. Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Candida. 2. CHROMagar Candida. 3. VITEK 2.4. Análise da sequência de DNA. 5. Susceptibilidade antifúngica. I. Título.</p> <p>CDD –664.68</p>
-------	--

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.**

**©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.**

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, amor e grandiosa bondade para com seus filhos. Que sempre me concede forças e me guia pelos caminhos do bem. Confio em teus planos Senhor.

Ao meu anjo da guarda, Dr. Eduardo Henrique Carbonera Ramos (in memoriam) por ser meu espelho e minha força, por cuidar tão bem de nossa família e nos proteger ai de cima. Amo-te meu Irmão. Sempre te amarei, Eternamente.

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Kelly Mari Pires de Oliveira pela amizade, carinho e atenção para comigo durante toda a realização deste trabalho. Por sua dedicação e pelos sábios ensinamentos que levarei para a vida.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFGD por todos os ensinamentos passados durante as disciplinas ministradas.

À minha família, meu tudo. Obrigada por me apoiarem em tudo e me dar forças para continuar. Longe de seus cuidados aprendi o real valor de seus ensinamentos e o quão são essenciais em minha vida. Minha base, meu viver.

Ao meu namorado Leandro Urbano Marquezim por aguentar todo o meu estresse, reclamações, por me acalmar e cuidar de mim. A distância nunca nos separou, sempre estivemos unidos e sempre com muito amor. Muito Obrigada anjo, não sei se conseguiria sem você!

As companheiras de mestrado e mais novas amigas que levarei para sempre, pelas risadas e momentos de descontrações. Luciana, Maísa, Kesia, Flora, Débora e Natália.

Ao meu anjo protetor aqui de Dourados, Laís, por sempre estar se preocupando e me dando forças em todos os momentos. Por me alegrar e me devolver a paz em dias ruins e por ter se tornado uma irmã. Te amo amiga!

Aos colegas de graduação Danielle, Louise, Mariany e Adriane por estar comigo até hoje e por ter se tornado grandes irmãs, minhas fofas, presente que Dourados e a vida me concedeu.

Aos colegas de laboratório de microbiologia aplicada da UFGD pela ajuda, companheirismo e momentos felizes, em especial a Mestre Adriana, por todos os ensinamentos, ajudas e por me apresentar este mundo da microbiologia.

À Mestre e Microbiologista Flávia Patussi por toda a ajuda durante a realização do projeto, pela paciência e ajuda no isolamento das leveduras.

A todos os funcionários do HU-UFGD e da FCBA-UFGD que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo.

À Mestre Danielly Beraldo por toda a ajuda e suporte na biologia molecular.

À UFGD pelo suporte dado durante a realização do trabalho.

À banca pelas sugestões e trabalho dedicado a avaliação do presente estudo.

À CAPES e a FUNDECT pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## Dedicatória

*Á Deus, por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos,  
coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.  
A minha família pelo amor, apoio, confiança e motivação incondicional. Que sempre  
me impulsiona em direção as vitórias dos meus desafios.*

*Combati o bom combate, terminei a minha carreira, guardei a fé. “II Timóteo 4,7.*

## Sumário

Agradecimentos .....	ii
Dedicatória.....	iv
Lista de Abreviaturas.....	vii
Resumo .....	viii
Abstract.....	ix
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Histórico e biologia do gênero <i>Candida</i> .....	3
2.2 <i>Candida albicans</i> e <i>Candida</i> não <i>Candida albicans</i> (CNCA).....	4
2.3 Principais infecções hospitalares causadas por <i>Candida</i> .....	7
2.4 Prevalência e distribuição de <i>Candida</i> .....	9
2.5 Métodos de identificação de <i>Candida</i> spp.....	11
2.6 Mecanismos de ação dos antifúngicos .....	14
2.7 Resistência a drogas antifúngicas .....	16
3 OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo geral .....	18
3.2 Objetivos específicos .....	18
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	19
5 ARTIGO CIENTÍFICO.....	34
6 ANEXOS.....	51
6.1 Anexo 1: Normas para publicação do periódico.....	51
6.2 Anexo 2: Carta de Submissão .....	52



## Lista de Abreviaturas

RAPD	Análise por DNA polimórfico amplificado ao acaso – <i>randomly amplified polymorphic DNA analysis</i>
CNCA	<i>Candida</i> não <i>Candida albicans</i>
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
EUA	Estados Unidos da América
RFLP	Análise de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição - <i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado- <i>Pulsed-field Gel Electrophoresis</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
HU-UFGD	Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados

## Resumo

A correta identificação dos isolados e a determinação do perfil de susceptibilidade são fatores necessários para uma terapia adequada. O estudo avaliou as diferentes técnicas de identificação de espécies de *Candida* por meio do VITEK 2, CHROMagar *Candida* e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O sistema automatizado VITEK 2 também foi avaliado para a determinação da susceptibilidade antifúngica, em conjunto com o método da microdiluição em caldo. 81 amostras de *Candida* foram coletadas de março de 2013 a março de 2014. A identificação das leveduras foi realizada pelo VITEK 2, CHROMagar *Candida* e PCR. O VITEK 2 apresentou 34,6% de identificação incorreta. O CHROMagar *Candida* não identificou 14,8% dos isolados até nível de espécie e apresentou 8,6% de erros em sua identificação. A PCR identificou corretamente 100% dos isolados e os dados foram confirmados pelo sequenciamento da região ITS. O perfil de susceptibilidade antifúngica foi determinado pelo VITEK 2 e microdiluição em caldo (MIC). 11,1% dos isolados apresentaram resistência a anfotericina B (AMB), 4,9% ao fluconazol (FLC) e 2,4% ao voriconazol (VRC). Pelo MIC, 7,4% dos isolados apresentaram resistência e a apenas ao VRC. Um isolado apresentou resistência ao VRC nos dois métodos de susceptibilidade testados. 50% dos isolados de *Candida krusei* não foi identificado pelo VITEK 2 e 50% dos isolados desta espécie apresentaram como susceptível ao FLC, o que demonstra a importância de avaliar os dois resultados antes da terapêutica. Portanto, a PCR é uma ferramenta rápida, útil e precisa para a identificação de leveduras, mas, ainda não é viável para a rotina hospitalar. O VITEK 2 é uma ferramenta de grande valia para a identificação e determinação da susceptibilidade antifúngica, mas, considerando centros hospitalares onde há baixa disponibilidade de recursos, o CHROMagar *Candida* para a identificação laboratorial das espécies de leveduras apresentou como uma alternativa viável, pois seus resultados são tão bons como o sistema automatizado, com um menor custo-benefício.

Palavras-chave: *Candida*, CHROMagar *Candida*, VITEK 2, análise da sequência de DNA, susceptibilidade antifúngica.

## Abstract

The correct identification of the isolates and determining the susceptibility profile are factors necessary for adequate therapy. The study evaluated the different techniques for identification of *Candida* species using the VITEK 2, CHROMagar *Candida* and Reaction Polymerase Chain (PCR). The automated system VITEK 2 was also evaluated for the determination of antifungal susceptibility together with the microdilution broth method. 81 samples of *Candida* were collected from March 2013 to March 2014. The identification of yeasts was performed by VITEK 2, CHROMagar *Candida* and PCR. The VITEK 2 showed 34.6% of misidentification. The CHROMagar *Candida* did not identify 14.8% of the isolates to the species level and 8.6% had errors in their identification. The PCR correctly identified 100% of the isolates and data were confirmed by sequencing the ITS region. The susceptibility profile antifungal was determined by the VITEK 2 and microdilution (MIC). 11.1% of isolates were resistant to amphotericin B (AMB), 4.9% to fluconazole (FLC) and 2.4% to voriconazole (VRC). The MIC, 7.4% of the isolates showed resistance and just the VRC. One isolate showed resistance VRC susceptibility in the two tested methods. 50% of isolates of *Candida krusei* was not identified by VITEK 2 and 50% of the isolates of the species presented as susceptible to CRF, which shows the importance of evaluating the two results before therapy. Therefore, the PCR is a fast, useful and accurate tool for identifying yeasts, but is not yet feasible for the hospital routine. The VITEK 2 is a valuable tool for identification and determination of antifungal susceptibility, but considering hospitals where there is low availability of resources, the CHROMagar *Candida* for laboratory identification of yeast species presented as a viable alternative because their results are as good as the automated system, with a lower cost-effective.

Keywords: *Candida*, CHROMagar *Candida*, VITEK 2, analysis of the DNA sequence, antifungal susceptibility.

## 1 INTRODUÇÃO

Infecções hospitalares fúngicas têm aumentado em todo o mundo, não somente em ocorrência, mas também na gravidade da doença provocada por elas, principalmente em pacientes imunocomprometidos, destacando aquelas causadas pelo gênero *Candida*. Estas são responsáveis pela maioria das infecções fúngicas, sendo considerado um patógeno oportunista, causando desde infecções superficiais de pele e mucosa até infecções invasivas, principalmente no ambiente hospitalar (ZAUGG et al., 2001; PAPPAS et al., 2004; CLEVELAND et al., 2012; COSTA et al., 2015).

*Candida albicans* é a espécie mais frequente no ambiente hospitalar, porém, nas últimas décadas outras espécies de *Candida* não-*Candida albicans* (CNCA) como *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. glabrata* estão sendo comumente isoladas. Infecções causadas por estas leveduras são relevante em estudos de vigilâncias de infecções hospitalares, pois possuem patogenicidade e perfil de sensibilidade a antifúngicos variáveis, com registros de resistência aos principais antifúngicos utilizados na clínica médica (COLOMBO et al., 1999; CHI et al., 2011; ORTEGA et al., 2011).

As espécies de leveduras diferem em sua suscetibilidade aos antifúngicos. Estudos descrevem a ocorrência de sensibilidade diminuída para azóis entre espécies de CNCA como *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. O uso crescente de anfotericina B em hospitais pode estar associado com o aparecimento de CNCA resistentes a drogas, principalmente *C. glabrata*, *C. lusitanae* e *C. guilliermondii* (COLLIN et al., 1999; FURLANETO et al., 2011; SCHMALRECK et al., 2012; TORTORANO et al., 2012).

Por conta das peculiaridades apresentadas por diferentes espécies de *Candida* como epidemiologia, distribuição, resistência a antifúngicos, emergência de novas espécies que causam infecção, é importante a identificação dessas leveduras em nível de espécie, principalmente quando relacionadas a doenças sistêmicas (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010; NEMCOVA et al., 2015).

Sendo assim, a identificação em nível de espécies e a determinação do perfil de susceptibilidade são importantes tanto para conhecer a prevalência dos agentes envolvidos como para monitorar e detectar resistência, podendo contribuir para a escolha terapêutica adequada (ALAM et al., 2014). Devido à importância da

identificação das espécies de *Candida* envolvidas em infecções hospitalares e a crescente resistência aos antifúngicos, este estudo visou caracterizar as leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes internados em um hospital público de Dourados, Mato Grosso do Sul.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Histórico e biologia do gênero *Candida*

Os primeiros relatos de lesões causadas por *Candida* no homem foram feitos por Hipócrates (460 a 337 a.C.) por observação de placas esbranquiçadas presentes na cavidade bucal de recém-nascidos e pacientes debilitados. Também Galeno (200 a 130 d.C.) observou estas mesmas lesões em crianças enfermas, já que a manifestação clínica de candidíase bucal em recém-nascidos já era frequente na Europa no século XVIII. Em 1839, Langenbeck observou pela primeira vez, em aftas bucais de um paciente com febre tifóide, leveduras do gênero *Candida* e classificou erradamente esse micro-organismo como agente etiológico da doença. David Gruby, em 1842, classificou a levedura no gênero *Sporotrichum*, apresentando o primeiro caso de candidíase frente à Academia de Ciências de Paris, na França (HAZEN, 1995).

A relação da levedura com a candidíase oral e a presença de *Candida* na boca de crianças sadias foi definida por Berg em 1846 e Charles Robin, em 1853, denominou esse micro-organismo de *Oidium albicans*. Zenker, em 1861, descreveu o primeiro paciente acometido de infecção cerebral por disseminação hematogênica por *Candida* na Alemanha. Já em 1890, Zopf renomeou esse micro-organismo de *Monilia albicans* e, somente em 1923, Berkhout transferiu essa espécie para o gênero *Candida* e criou a espécie *C. albicans* (HAZEN, 1995; RIBEIRO et al., 2004).

Leveduras do gênero *Candida* são micro-organismos unicelulares, eucarióticos, heterotróficos que se reproduzem assexuadamente por brotamento ou gemulação, dando origem a células que se denominam blastoconídios. Algumas espécies ainda se multiplicam sexuadamente e fazem ciclo sexual incompleto. São pleomórficos assumindo forma ovóide ou esférica e produzem pseudo-hifas e hifas verdadeiras dependendo das condições de crescimento. Degradam proteínas e carboidratos para obterem carbono e nitrogênio, elementos essenciais para seu desenvolvimento, sendo capaz de se desenvolver tanto na presença de oxigênio quanto em anaerobiose. São encontradas em diversos ecossistemas, como solo, alimentos, água e como comensal no ser humano e animais (LACAZ et al., 2002; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

As principais espécies do gênero *Candida* são: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* e *Candida lusitanae*. Entretanto, espécies emergentes têm sido descritas,

como *Candida dubliniensis*, *Candida kefyr*, *Candida rugosa*, *Candida famata*, *Candida utilis*, *Candida lipolytica*, *Candida norvegensis* e *Candida inconspícua* (COLOMBO; GUIMARAES, 2003, PFALLER et al., 2014).

São micro-organismos comensais, que habitam em sítios como trato gastrointestinal, microbiota vaginal e uretra do ser humano. Porém, podem tornar-se patogênicas quando ocorrem alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou rompimento das barreiras anatômicas, como queimaduras ou procedimentos médicos invasivos (ALONSO-VALLE et al., 2003).

Infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* são denominadas candidíases, com lesões superficiais ou profundas (BARBEDO; SGARBI, 2010). Candidíase pode ocorrer como consequência do rompimento do equilíbrio parasita-hospedeiro, desencadeado por alterações na barreira tecidual e na microbiota autóctone e pelo comprometimento das defesas naturais como a imunológica (PLAYFORD et al., 2008).

## **2.2 *Candida albicans* e *Candida* não *Candida albicans* (CNCA)**

*Candida albicans* é a espécie mais isolada em infecções causadas por *Candida*, mas espécies de CNCA são frequentemente isoladas (MOTTA et al., 2010; DAS et al., 2011; SPILIOPOULOU et al., 2012).

Estudos demonstram que *C. albicans* é o patógeno humano comumente encontrado em infecções hospitalares causadas por *Candida*, apesar de sua frequência variar grandemente de acordo com a região (PFALLER et al., 2014). Esta levedura apresenta capacidade de transição da fase de levedura para hifa (dimorfismo) em resposta a condições ambientais, o que pode estar envolvida em sua patogenicidade. Além disso, outros fatores como a habilidade de resistir à fagocitose, aderir às células epiteliais, secretar uma proteinase ácida e crescer bem à temperatura de 37 °C também é sugerido na sua patogenicidade (SCHERER; MAGEE, 1990). Por outro lado, raramente apresenta resistência a antifúngicos, especialmente a anfotericina B e fluconazol (PFALLER; DIEKEMA, 2007).

*Candida dubliniensis* apresenta características morfológicas e bioquímicas semelhantes a *C. albicans*. A identificação e a diferenciação fenotípica dessas duas espécies são trabalhosas, sendo necessária muitas vezes a utilização de métodos

moleculares para diferenciá-las. *Candida dubliniensis* é menos patogênica que *C. albicans*, mas tem maior facilidade em desenvolver resistência a azólicos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). Tem sido isolada, principalmente, em pacientes imunocomprometidos e em cavidade oral (ELLEPOLA et al., 2015). Mariano e colaboradores (2003) em um estudo com 548 amostras de *C. albicans* de uma micoteca da Universidade de São Paulo inicialmente, por testes fenotípicos, identificaram estes isolados como sendo *C. albicans*, e, após análise pela técnica de RAPD (random amplified polymorphic DNA) identificaram 11 isolados como sendo de *C. dubliniensis*.

*Candida parapsilosis* faz parte de um complexo que abrange três espécies distintas que são diferenciadas através de técnicas moleculares em *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, predominando a espécie *C. parapsilosis* sensu stricto (TORO et al. 2011). É um micro-organismo comensal da pele e penetra na corrente sanguínea através da ruptura da barreira cutânea. Possui grande capacidade de formar biofilme em soluções glicosiladas e de aderir a materiais plásticos, como dispositivos intravasculares, materiais protéticos e nas mãos e utensílios de profissionais da saúde com a contaminação cruzada, o que podem acarretar em uma infecção hospitalar. Em geral, isolados clínicos desta espécie são sensíveis a maioria dos antifúngicos. Também é notória sua presença em recém-nascidos imunocomprometidos (TROFA et al., 2008).

*Candida glabrata* emergiu como um importante patógeno oportunista, tendo sido relatada como a segunda causa de candidemia nos Estados Unidos (PFALLER; DIEKEMA, 2007). Já na América Latina, um estudo multicêntrico envolvendo cinco hospitais terciários de quatro países, demonstrou que a incidência de *C. glabrata* é baixa (7,7%), diferentemente da situação nos Estados Unidos e Europa (GODOY et al., 2003). Esta espécie apresenta intinsecamente sensibilidade reduzida aos antifúngicos e exigem assim uma atenção específica no diagnóstico e nas abordagens de tratamento (GLÖCKNER; CORNELLY, 2015). Um fato interessante da epidemiologia desta levedura é sua maior ocorrência em pacientes idosos e geralmente associada com infecções em conjunto com outras espécies de *Candida* e ao uso anterior de antifúngicos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

*Candida tropicalis* é um importante agente etiológico de infecções em pacientes com neutropenia e com doenças hematológicas malignas. Pfaller & Diekema (2007) relataram que na América do Norte as infecções por *C. tropicalis* representam a quarta causa, enquanto na América Latina esta espécie representa a segunda causa mais



frequente. Godoy e colaboradores (2003) em um estudo multicêntrico na América Latina encontraram *C. tropicalis* como a segunda espécie mais isolada em pacientes com candidemia. Esta espécie também foi identificada como a segunda causadora de candidemia no HC-UFPR, predominantemente entre adultos (FRANÇA; RIBEIRO; QUEIROZ-TELLES, 2008). Geralmente esta espécie é sensível a anfotericina B e na maior parte aos triazólicos (COLOMBO; GUIMARAES, 2003).

A espécie *C. krusei* é um dos patógenos emergentes e é naturalmente resistente ao fluconazol. Muitas infecções causadas por este organismo estão relacionadas ao uso profilático ou terapêutico deste antifúngico (PFALLER et al., 2008).

*Candida famata* é encontrada usualmente em alimentos, incluindo laticínios e também vem sendo isolada da cavidade oral do homem, onde passam a viver como comensal. *Candida famata* não era considerada patogênica para os humanos, porém, hoje já existem relatos clínicos desta fungemia que podem causar endoftalmite e infecções no sistema nervoso central. Em relação ao tratamento, essa espécie é menos suscetível aos azólicos em comparação com *C. albicans* e é responsável por 0,2 a 2% dos casos (RAO et al., 1991; PRINSLOO et al., 2003; CARRASCO et al., 2005; PISA; ALONSO; CARRASCO, 2008).

*Candida guilliermondii* é uma espécie pouco comum de *Candida*, mas que tem aparecido com a frequência aumentada como agente etiológico de candidemia (PFALLER; DIEKEMA 2007). Aparece descrita na maioria dos casos relacionada à pacientes com câncer (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). Um estudo retrospectivo realizado na Itália analisou os casos de candidemia registrados durante um período de 22 anos, sendo encontrados 29 episódios (11,7%) causados por *C. guilliermondii*, todos em pacientes com doenças hematológicas oncológicas (GIRMENIA et al., 2006).

*Candida kefyr* é comumente encontrada em produtos industrializados, principalmente, laticínios. Extremamente rara como patógeno humano, mas já foi descrita como responsável por fungemias, esofagites, meningoencefalites, ocorrendo, principalmente, em pacientes imunodeprimidos, transplantados e com câncer, sendo isolada em menos de 1% das amostras quando comparada com outras espécies (MORGAN et al., 1984; WEICHERT et al., 2012).

Desta forma, faz-se necessário identificar os pacientes em risco de infecção por *C. albicans* ou por CNCA a fim de iniciar uma terapia precoce e eficaz e, conseqüentemente, ter uma redução da morbidade e mortalidade causada por estes patógenos.

### 2.3 Principais infecções hospitalares causadas por *Candida*

As infecções hospitalares causadas por leveduras do gênero *Candida* spp. podem apresentar-se em diversas manifestações clínicas como infecção na corrente sanguínea, infecção no trato urinário, infecção em ferida cirúrgica, abscessos cutâneos relacionados à inserção de cateter, entre outras. A origem dessas infecções pode ser endógena, consequente da proliferação ou mudança de sítio da levedura ou exógena pela presença desta no ambiente hospitalar e nas mãos dos profissionais da saúde (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Entre as infecções causadas por *Candida*, à infecção na corrente sanguínea, conhecida como candidemia é uma síndrome de alta gravidade e é cada vez mais frequente em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), incluindo Unidade de Terapia Intensiva (UTI) neonatal, respondendo por 70 a 80% das fungemias e representando o quarto grupo mais comum de patógenos responsável por infecção da corrente sanguínea nosocomial, com uma taxa de mortalidade de aproximadamente 40 a 80% (FRIDKIN; JARVIS, 1996; TRICK et al., 2002; BLYTH et al., 2009; STEINBACH, 2010; SHIM et al., 2011). Entre pacientes hospitalizados com alto risco para adquirir a infecção estão aqueles com neutropenia, submetidos à cirurgia gastrointestinal, prematuros e acima de 65 anos de idade. Estas infecções estão associadas à internação prolongada, alta taxa de mortalidade e elevado custo hospitalar (KAUFFMAN, 2006; FRANÇA; RIBEIRO; QUEIROZ-TELLES, 2008).

A colonização é considerada um pré-requisito para a infecção causada por *Candida*, mas, nem todos os pacientes colonizados irão desenvolver a doença. No momento da internação, 5-10% dos pacientes estão colonizados por *Candida* e esta proporção tende a aumentar, chegando a 50-86% com o tempo de internação e exposição aos fatores de risco em pacientes internados em UTI (SAIMAN et al., 2001; EGGIMANN et al., 2003).

A maioria dos autores sugere que grande parte dos casos de candidemia seja adquirida por via endógena, pela translocação da levedura através do trato gastrointestinal, local onde há colonização por *Candida* na população humana normal. A presença de uma predisposição local ou generalizada que provoque desequilíbrio da microbiota ou lesão da mucosa gastrointestinal pode ser um agente facilitador de

translocação da levedura até os capilares mesentéricos. Existe ainda a possibilidade de aquisição via exógena da levedura pela transmissão horizontal através do contato direto com as mãos de profissionais de saúde (COLOMBO et al., 1996; RIBEIRO et al., 2004; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; BOW et al., 2010).

A transmissibilidade de *Candida* spp. e a alta prevalência de contaminação das mãos de profissionais de saúde em UTI identificam esses profissionais como potenciais reservatórios na transmissão destes agentes a pacientes de alto risco. Além disso, não há dados clínicos que possibilite ao profissional de saúde identificar o momento da invasão fúngica na corrente sanguínea, quais serão apenas transitórios e quais acarretarão casos de candidemia disseminada (WENZEL, 1995; da SILVA et al., 2001; BARCHIESI et al., 2003; COLOMBO; GUIMARAES, 2003; RIBEIRO et al., 2004; BOW et al., 2010).

Infecções hospitalares do trato urinário causadas por *Candida* spp. estão aparecendo cada vez com mais frequência em pacientes internados, sendo responsáveis por 10 a 15% de todas as infecções urinárias (BUKHARY, 2008).

Episódios de candidúria (presença de *Candida* spp. na urina) em pacientes hospitalizados podem causar transtornos na recuperação destes e até risco de mortalidade. Pesquisa realizada em idosos associa a fragilidade e vulnerabilidade dos pacientes com os episódios de candidúria (FRAISSE et al., 2011). Wynn e colaboradores (2012), relataram que recém-nascidos com peso extremamente baixo podem ter risco significativo de morte associados a ocorrência de candidúria. Alguns dos fatores de risco para infecções no trato urinário ou episódios de candidúria em pacientes hospitalizados são: anormalidades anatômicas no trato urinário, comorbidades, dispositivos de drenagem urinária, cirurgia abdominal, admissão em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), uso de antibióticos de largo espectro, diabetes mellitus, extremos de idade e sexo feminino (ACHKAR; FRIES, 2010). Entre os principais agentes de candidúria, *C. albicans* tem sido registrada como responsável por cerca de 50 a 70% dos isolados, seguida de *C. tropicalis* e *C. glabrata* (KAUFFMAN, 2005).

## 2.4 Prevalência e distribuição de *Candida*

Nas últimas décadas, os pacientes graves passaram a ter uma taxa de sobrevivência mais alta devido a vários procedimentos médicos, elevando assim também os riscos de infecções fúngicas e aumentando a incidência da mesma (WINGARD, 1995; VIUDES et al., 2002).

Hospitais de vários países relatam um aumento significativo de infecções causadas por *Candida*, especialmente em pacientes imunocomprometidos. São a causa mais comum de infecções fúngicas invasivas e representam 72% das infecções fúngicas hospitalares, 15% de todas as infecções adquiridas no ambiente hospitalar, com uma taxa de mortalidade que varia de 40-60% sendo um agravante em saúde pública (AKEME YAMAMOTO et al., 2012; CHEN et al., 2013).

Entre as infecções invasivas causadas por espécies de *Candida*, estudos relatam que hospitais terciários dos Estados Unidos e da Europa apresentam incidências menores que um caso de candidemia por 1.000 internações, enquanto no Brasil, estudos mostraram taxas de incidência elevadas, de 2,5 casos por 1.000 internações (COLOMBO et al., 2006; BASSETTI et al., 2011; CLEVELAND et al., 2012).

Colombo e colaboradores (2006) em um estudo prospectivo de vigilância no Brasil observaram uma incidência de 2,49 casos por 1000 admissões, 0,37 casos por 1.000 pacientes/dia, 2 a 15 vezes maior que as relatadas em centros hospitalares dos EUA (0,28 a 0,96 por 1.000 admissões), Canadá (0,45 por 1.000 admissões) e Europa (0,20 a 0,38 por 1.000 admissões). Bassetti e colaboradores (2013) relataram uma incidência de 1,55 casos por 1.000 admissões em episódios de candidemia em hospitais de ensino terciário na Itália e Espanha. A incidência de 6,9 por 1.000 pacientes em unidades de terapia intensiva (UTI) tem sido relatada (KETT et al., 2011).

Pesquisas sobre a distribuição de *Candida* spp. realizadas nos EUA, Europa, Ásia e Brasil descrevem a prevalência de *C. albicans* com mais de 50% dos isolados. Bassetti e colaboradores (2013) em um estudo de dois anos em hospitais de ensino terciário da Itália e Espanha relataram que *C. albicans* foi a espécie com maior frequência, 58,4%, seguida por *C. parapsilosis* (19,5%), *C. tropicalis* (9,3%) e *C. glabrata* (8,3%).

Motta e colaboradores (2010), em um estudo no Hospital das Clínicas em São Paulo relataram *C. albicans* com 50% nas infecções em pacientes com menos de um

ano de idade, enquanto que *C. parapsilosis* ficou em segundo lugar com 46,9%, seguida de *C. glabrata* com 3,1%.

Pfaller e colaboradores (2011) em um estudo realizado em 79 centros médicos distribuídos na América do Norte, América Latina, Europa e Ásia-Pacífico demonstrou que dentre os 1.752 isolados de *Candida*, 854 (48,7%) foram *C. albicans*. Colombo e colaboradores (2014) em um estudo multicêntrico realizado durante nove anos em vinte e dois centros médicos do Brasil verificaram que 42% dos isolados foram da espécie *C. albicans*, seguido de *C. tropicalis* com 20% dos isolados.

O aumento de infecções causadas por espécies de CNCA como *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* é crescente em infecções invasivas e vêm ocorrendo em várias partes do mundo (ALMIRANTE et al., 2005; COLOMBO et al., 2006; PFALLER; DIEKEMA, 2007). Assim, relatos de taxas de isolamentos em torno de 50% de CNCA também têm sido relatados (BASSETTI et al., 2006; SHORR et al., 2007; PASSOS et al., 2007; BOUZA; MUNOZ, 2008; DIEKEMA et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2012). Oliveira e colaboradores (2014) em um estudo sobre candidemia em pacientes pediátricos verificaram que de 104 isolados, 37,5% foram de *C. albicans*, 24,03% *C. tropicalis*, 22,11% *C. parapsilosis*, 5,8% *Pichia anomala*, 4,8% *C. guilliermondii*, 2,8% *C. krusei*, 1,92% *C. glabrata* e 0,96% *C. pararugosa*, demonstrando assim que mais de 50% dessa infecção foi ocasionada por espécie de CNCA.

Estudos realizados em hospitais de diferentes partes do mundo evidenciam que variações regionais podem estar relacionadas à distribuição de espécies de *Candida*. Países da América Latina teve um predomínio de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, sendo a *C. glabrata* a espécie menos comum. Já nos EUA e Europa, onde o uso profilático do fluconazol é uma prática bem estabelecida, espécies de *C. glabrata* são mais comuns entre as espécies de CNCA (GODOY et al., 2003; GOLDANI; MARIO, 2003; TORTORANO et al., 2004; BRITO et al., 2006).

*Candida tropicalis* foi à espécie mais frequente em amostras clínicas (42%) em um estudo realizado no HU- UFGD, na cidade de Dourados, Mato Grosso do sul, entre 2010 e 2011 (ALMEIDA et al., 2013). Akeme Yamamoto e colaboradores (2012) realizaram um estudo sobre as características epidemiológicas e clínicas de *Candida* spp. isoladas em um hospital universitário de Cuiabá, Mato Grosso, e obtiveram 39,09% das leveduras isoladas da espécie *C. albicans*, 32,73% *C. tropicalis*, 21,82% *C. parapsilosis*, 5,45% *C. glabrata* e 0,91% *C. krusei*, demonstrando a ocorrência de

60,91% de candidíases ocasionadas por espécies CNCA. Outro estudo realizado por Chang e colaboradores (2008) mostraram que 54,2% dos casos de candidemia foram causados por CNCA e que destas, *C. parapsilosis* foi a espécie predominante em um hospital universitário de Campo Grande, capital do estado de Mato Grosso do Sul.

Outros achados no Brasil também demonstraram a prevalência de CNCA sobre a *C. albicans* em amostras clínicas de pacientes internados, como o de realizado por Furnaleto e colaboradores (2011) que verificaram a distribuição de espécies de *Candida* de diferentes amostras clínicas isoladas em um hospital universitário de Londrina, Paraná. Estes autores mostraram que as infecções foram causadas principalmente por espécies de CNCA (64%). Hinrichsen e colaboradores (2009) realizaram um estudo em hospitais terciários do nordeste. Foram obtidos 1279 isolados de *Candida* spp. 367 isolados foram de *C. albicans*, seguido de 912 isolados de CNCA, sendo 363 *C. tropicalis*, 147 *C. parapsilosis*, 81 *C. glabrata*, 30 *C. krusei* e 14 *C. guilliermondii*. Guimarães e colaboradores (2012) em uma análise retrospectiva em 14 hospitais terciários no Brasil revelaram que CNCA representou 61% das leveduras isoladas de hemoculturas. *Candida tropicalis* (24%) e *Candida parapsilosis* (21%) foram as mais freqüentes e *Candida glabrata* com 7% dos casos. Oliveira e colaboradores (2014) em um estudo de quatro anos realizado em um Hospital Público na cidade de São Paulo com pacientes pediátricos também verificaram que 62,5% dos isolados eram de CNCA com o predomínio de *C. tropicalis* seguida de *C. parapsilosis*.

O motivo pelo aumento de espécies de CNCA é pouco conhecido. Melhorias nas técnicas de identificação de leveduras, pressão seletiva de antifúngicos, aumento de pacientes portadores de diferentes doenças degenerativas e neoplasias e a utilização de procedimentos invasivos têm sido sugeridos por vários autores (COLOMBO et al., 1999; NUCCI; MARR, 2005; PFALLER; DIEKEMA, 2007).

## **2.5 Métodos de identificação de *Candida* spp.**

A identificação das leveduras do gênero *Candida* baseia-se inicialmente na morfologia das colônias. As leveduras são cultivadas inicialmente em ágar Sabouraud onde são caracterizadas o tipo de colônias de aspecto cremoso, às vezes mucóides, com variações de tons do branco ao creme (LACAZ et al., 2002).

Para o isolamento e triagem das espécies de *Candida*, meios de isolamento cromogênicos tem sido utilizados para a identificação presuntiva das espécies, entre os quais o mais utilizado é CHROMagar *Candida*. Este meio possibilita a diferenciação das espécies de leveduras por cor, através dos substratos cromogênicos que reagem com enzimas secretadas pelos micro-organismos. Identifica *C. albicans* pelo crescimento de colônias de cor verde, *C. tropicalis* por colônias de cor azul e *C. kruei* como colônias de cor rosa ásperas (BARADKAR et al., 2010). Outras espécies de leveduras podem desenvolver a sua cor natural (creme) ou aparecer cor-de-rosa ou cor de malva claro a escuro, exemplo de *C. glabrata* (PFALLER et al., 1996).

Após a análise morfológica das colônias, são necessários outros testes para a confirmação e identificação das espécies de *Candida*, como a produção de tubo germinativo, análise da micromorfologia e assimilação e fermentação de carboidratos. Essas provas fazem parte dos métodos fenotípicos tradicionais para a identificação de leveduras usadas em laboratórios do mundo todo, considerados métodos clássicos de identificação (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

A prova do tubo germinativo é uma triagem simples e rápida que permite diferenciar *C. albicans* ou *C. dubliniensis* (tubo germinativo positivo) das outras espécies. O tubo germinativo é uma projeção alongada da levedura que é formada quando esta entra em contato com soro humano ou de outros animais, à temperatura de 37°C por 2 a 3 horas (MARINHO et al., 2010).

A observação direta, ou exame direto, é um método presuntivo rápido, e de baixo custo, mas na maioria dos casos, não permite a identificação de espécies que não apresentem estruturas morfológicas típicas. A prova do microcultivo possibilita observar as características micromorfológicas das leveduras em meio de ágar fubá-Tween 80. O ágar fubá é utilizado para análise de hifas, pseudo-hifas, blastoconídios, clamidoconídios ou artroconídios. A adição de *Tween* 80 ao meio é para a redução da tensão superficial e aumentar a formação de hifas e blastoconídios, além de evitar a sobreposição de estruturas (LACAZ et al, 2002).

A assimilação de carboidratos é a capacidade que as leveduras apresentam de crescer aerobicamente na presença de determinado carboidrato como única fonte de energia. A fermentação de carboidratos é a capacidade que as leveduras apresentam de possuir sistemas enzimáticos eficientes, capazes de permitir, em baixas tensões de oxigênio, degradar açúcares para a produção de energia, formando, entre outros metabólitos, etanol e gás carbônico (LACAZ et al, 2002).

Em grandes centros hospitalares onde existe uma grande demanda de exames e a necessidade de resultados rápidos são utilizados os métodos automatizados de identificação e perfil de suscetibilidade aos antifúngicos como o VITEK MS, VITEK 2, WALK-AWAY, BD PHOENIX e MICROSCAN. O sistema VITEK 2 identifica as leveduras clinicamente importantes através de 47 testes bioquímicos fluorescentes, que incluem a assimilação de carboidratos e ácidos orgânicos e detecção de oxidases e arilamidase. Estudos têm mostrado que a utilização deste sistema pode identificar corretamente mais de 93% dos isolados em cerca de 18 horas, demonstrado ser um instrumento totalmente automático e fiável para a identificação de micro-organismos (VALENZA et al., 2008; OCHIUZZI et al., 2014).

Algumas espécies de leveduras do gênero *Candida* apresentam poucas variações morfológicas, dificultando sua identificação por métodos microbiológicos clássicos. Assim, para a confiabilidade do resultado, ainda é requerido testes genotípicos para a confirmação da espécie. A utilização de métodos moleculares vem sendo aplicada para suprir com as limitações dos métodos de identificação tradicional, compreender a patogenicidade das espécies de *Candida* e com o avanço de estudos de taxonomia com métodos moleculares houve a descoberta de novas espécies que causa a infecção (OLIVEIRA et al., 2008; ROCHA et al., 2008).

A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a torna particularmente importante para estudos moleculares, sendo a técnica mais utilizada para a identificação rápida de diferentes espécies de *Candida*, tendo a possibilidade de se gerar grandes quantidades de DNA de segmentos específicos do genoma (MULLIS; FALOONA, 1987; ANTONINI et al., 2004; MOUSAVI et al., 2007). A utilização dessa técnica tem sido considerada uma poderosa ferramenta para a identificação taxonômica, investigação de surtos de infecção hospitalar e também tem contribuído para os estudos epidemiológicos. Também muito utilizada é a técnica do PCR multiplex. Este é uma extensão da PCR convencional. Sua vantagem é a capacidade de amplificar mais que uma sequência alvo simultaneamente, tornando-a mais econômica e mais rápida (RAVIKUMAR et al., 2011).

A sistemática molecular de fungos se baseia principalmente na análise dos genes do DNA mitocondrial (mDNA) e DNA ribossomal (rDNA). Sequências de genes individuais, tais como aqueles a partir da região D1 / D2 de 26S rDNA ou a partir do espaço interno transcrito (ITS) são comumente usados para identificar as espécies de leveduras (KURTZMAN et al., 2010). Recentemente, a sequência da região ITS tem



sido proposta como um marcador “barcode” para a identificação de espécies de fungos. Sequências de rDNA de espécies de leveduras estão disponíveis em bancos de dados públicos, sendo assim possível identificar isolados, comparando suas sequências com as depositadas nos bancos de dados (SCHOCH et al. 2012).

As regiões ITS estão localizadas entre os genes 18S, 5.8S e 28S do rDNA e podem ser amplificadas por iniciadores específicos, sendo divididas em ITS1, localizada entre os genes 18S e o 5.8S, e ITS2, que separa os genes 5.8S e 28S. O fato das regiões ITS serem flanqueadas por segmentos conservados, serem relativamente curtas, 500 a 800 pb e aparecerem em grande número de cópias no genoma, permite que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade. As sequências de DNA dos genes ribossomais são altamente conservadas dentro das espécies e as regiões dos espaçadores ITS podem variar intraespecificamente na sequência de bases e no comprimento, sendo frequentemente usadas para taxonomia de espécies e gêneros de fungos (FUNGARO 2000; SIMONA et al., 2009; SHOKOHI et al., 2010).

Técnicas de biologia molecular como o sequenciamento de DNA e de ferramentas da bioinformática vêm sendo aprimoradas nos últimos anos e com isso, sequências gênicas e genomas completos são rapidamente gerados e depositados em bancos de dados como GenBank, Broad Institute, Sanger Institute e outros, facilitando assim a correta identificação de micro- organismos, possibilitando a realização de métodos de tipagem molecular como PFGE, RAPD, RFLP, entre outras (SIMONA et al., 2009; SCHOCH et al., 2012).

## **2.6 Mecanismos de ação dos antifúngicos**

São limitadas as classes de agentes antimicóticos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas (KATHIRAVAN et al., 2012). E, para a escolha do antifúngico é importante considerar os fatores de risco associados, gravidade do quadro clínico, espécie envolvida e seu perfil de sensibilidade (EGGIMANN et al., 2003; GAVALDA; RUIZ, 2003).

A maioria dos antifúngicos são dirigidos, de alguma forma contra ergosterol, o principal esterol da membrana plasmática fúngica, que é análogo ao colesterol em células de mamíferos. O ergosterol na membrana da célula fúngica contribui para uma variedade de funções celulares, sendo importante para a fluidez e a integridade da

membrana e para o bom funcionamento de muitas enzimas ligadas à membrana, incluindo a síntese de quitina que é importante para o crescimento e divisão celular (WHITE et al., 1998).

Os antifúngicos têm características especiais quanto ao mecanismo de ação, via de administração, ação em micoses superficiais ou sistêmicas, podendo ser classificados com base no sítio-alvo e estrutura química, sendo que estes atuam em sua maioria na membrana celular. A anfotericina B (polieno) e fluconazol (triazólico) são os fármacos de primeira escolha terapêutica. Estas duas classes de antifúngicos agem na membrana celular dos fungos, especificamente no ergosterol. Os polienos, que incluem anfotericina B e nistatina, são drogas que exercem sua atividade antifúngica via ligação ao ergosterol, o que atrapalha a permeabilidade celular e resulta em uma alteração da permeabilidade celular, levando à lise das células (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2010). Nistatina é o agente antifúngico mais tóxico dentro da classe, e tem sido usado para terapia tópica e localizada por causa dos efeitos adversos desfavorável. Anfotericina B é um antifúngico de amplo espectro, mas seu uso é limitado devido ao alto grau de toxicidade (GIROIS et al., 2006).

Os azólicos, que incluem fluconazol, itraconazol, posaconazol e voriconazol também exercem seus efeitos na membrana da célula fúngica. Sua atividade é através do bloqueio da desmetilação do lanosterol, inibindo a síntese de ergosterol, resultando na inibição do crescimento e replicação da célula fúngica. Estes antifúngicos causam menos efeitos adversos que a anfotericina B, mas possuem menor potência antifúngica. O fluconazol é o agente antifúngico mais prescrito devido sua excelente biodisponibilidade, tolerabilidade e mínimos efeitos adversos. Porém, o uso crescente desta droga antifúngica a nível mundial em candidíases em geral é uma das principais causas do aumento das espécies de CNCA sobre a *C. albicans* nos últimos anos (THOMPSON et al., 2009).

As equinocandinas como a caspofungina destaca-se como agente antifúngico eficaz no tratamento de infecções sistêmicas causadas por *Candida* spp., pois a droga tem sido bem tolerada e com poucos efeitos adversos. O mecanismo de ação desta classe é a inibição da produção de (1→3)- $\beta$ -D-glucana, enzima envolvida na síntese da parede celular fúngica através da polimerização da glucose uridina difosfato em  $\beta$  1,3-glucano. O  $\beta$  1,3-glucano é um dos principais componentes estruturais da célula responsáveis pela manutenção da integridade e rigidez da parede celular dos fungos, garantindo a seletividade da ação. Contudo, o espectro de ação é menor do que os

espectros dos agentes poliênicos e dos azólicos, pois é limitado a patógenos que dependem destes polímeros (ASHLEY et al., 2006).

## 2.7 Resistência a drogas antifúngicas

A resistência aos agentes antifúngicos pode ser intrínseca ao organismo específico, ou pode ser adquirido pelo organismo susceptível durante um curso de terapia. Tipicamente, a resistência pode ser atribuída a uma mutação que aumenta a expressão ou outras alterações do alvo da droga. Moléculas tais como bombas de efluxo e proteínas de resposta ao stress também podem estar envolvidas (BARKER; ROGERS, 2006).

Nos últimos anos, estudos relatam com maior frequência, o isolamento de espécies de *Candida* com sensibilidade diminuída ou resistente aos antifúngicos. A resistência destas leveduras pode ser clínica ou *in vitro* (ZARDO; MEZZARI, 2004). Ainda existe a resistência intrínseca, aquela que está presente nas características naturais do micro- organismo, como é o caso da *C. krusei* que é intrinsecamente resistente a fluconazol (COLEMAN et al., 1998). *C. krusei* é a única espécie que é intrinsecamente resistente ao fluconazol, mas pode também demonstrar falsa sensibilidade no teste *in vitro*, mostrando assim um certo cuidado por partes dos profissionais da saúde para evitar a liberação de resultados falsos (MOTTA et al., 2010). *C. albicans* é naturalmente sensível a todos os antifúngicos de uso sistêmico, mas, casos de resistência adquiridas aos azólicos podem ocorrer em pacientes que foram expostos por tempo prolongado a estes medicamentos (PEREA et al., 2001; EDDOUZI et al., 2013). *C. glabrata* frequentemente apresenta sensibilidade reduzida tanto a anfotericina B quanto ao fluconazol (MOTTA et al., 2010)

O uso profilático de antifúngicos em pacientes com maior risco de desenvolver infecções fúngicas invasivas tem alterado o perfil das leveduras. O fluconazol é um dos agentes antifúngicos mais utilizados para o uso profilático, que foi uma das principais causas na diminuição de infecções causadas por *C. albicans* e no aumento do número de espécies CNCA com perfil aumentado de resistência a esse antifúngico (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). Há fortes evidências de que a resistência dos isolados aos derivados azólicos, especialmente fluconazol resulta de alterações genômicas, podendo

causar resistência, reduzindo assim as opções de tratamento medicamentoso (FRANZ et al., 1998; RIBEIRO et al., 2005).

Estudos realizados por Dota e colaboradores (2008) e Furnaleta e colaboradores (2011) relatam que entre os isolados de candidemia, candidíase vulvovaginal e outras amostras clínicas, as espécies CNCA possuem valores de sensibilidade dose-dependente e resistência maiores que a espécie *C. albicans*.

A ocorrência da resistência de espécies de *Candida* a anfotericina B é baixa, sendo registrada em CNCA, como *C. glabrata*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii*. Isto ocorre devido a este antifúngico possuir baixa solubilidade e elevada toxicidade no hospedeiro, o que limita a sua utilização na terapia antifúngica a longo prazo. Outros fatores como a exposição anterior ao polieno e exposição à quimioterapia citotóxica podem contribuir para o desenvolvimento da resistência a anfotericina B. Além disso, é discutido que a exposição prévia destes pacientes a agentes antifúngicos azólicos, pode causar uma alteração dos componentes da membrana celular que podem ocasionar a resistência ao polieno (PEREA; PATTERSON, 2002; COLOMBO et al., 2012).

Voriconazol é um fármaco com grande potencial antifúngico contra a maioria dos fungos causadores de micoses sistêmicas (Colombo et al., 2012). Estudos mostram que este fármaco é mais ativo no tratamento de candidíase hematogênica causada por todas as espécies de *Candida*, incluindo *C. glabrata* e *C. krusei* que são resistentes ao fluconazol e itraconazol (KAUFFMAN et al., 2006).

Assim, a determinação exata do antifúngico adequado é importante tanto para a descoberta de novos medicamentos mais eficazes como para a melhora dos resultados clínicos com os antifúngicos atuais por meio da otimização da sua dosagem. E, a realização dos testes de suscetibilidade a antifúngicos é um forte aliado para que o tratamento antifúngico seja conduzido de maneira segura, correta e eficaz. Também é relevante o desenvolvimento de estratégias direcionadas a disseminação da resistência aos antifúngicos (MAKI et al., 2008).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral:

Identificar fenotipicamente e genotipicamente leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes atendidos em um hospital público de Dourados/MS, visando auxiliar no controle e prevenção de infecções fúngicas no ambiente hospitalar.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- Identificar as espécies de *Candida* envolvidas nos casos de candidíase ocorridos em pacientes internados pelos métodos fenotípicos CHROMagar *Candida* e pelo sistema automatizado VITEK 2 e pelo método genotípico da PCR.
- Confirmar a identificação fenotípica realizada pelo sistema automatizado VITEK 2, pelo meio cromogênico CHROMagar *Candida* e pelo método genotípico da PCR das espécies de *Candida* pela amplificação da região ITS do DNAr.
- Avaliar o desempenho do método de identificação automatizado Vitek 2, CHROMagar *Candida* e PCR para a identificação do gênero *Candida* em nível de espécie e confirmar com a técnica do sequenciamento.
- Avaliar o perfil de susceptibilidade *in vitro* de espécies de *Candida* isoladas de processos infecciosos de pacientes hospitalizados em um hospital público de Dourados.
- Avaliar o sistema automatizado VITEK 2 para a determinação da susceptibilidade *in vitro* com o método de microdiluição em caldo.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHKAR, J.M; FRIES, B.C. *Candida* infections of the genitourinary tract. **Clin Microbiol Rev.** 2010; 23(2): 253-73.

AKEME YAMAMOTO, A.C; DE PAULA, C.R; DIAS, L.B; TADANO, T; MARTINS, E.R; AMADIO, J.V; HAHN, R.C. Epidemiological and clinical characteristics of nosocomial candidiasis in university hospitals in Cuiabá- Mato Grosso, Brazil. **Rev Iberoam Micol.** 2012; 29(3): 164-8.

ALAM, M.Z; ALAM, Q; JIMAN-FATANI, A; KAMAL, M.A; ABUZENADAH, A.M; CHAUDHARY, A.G; AKRAM, M; HAQUE, A. *Candida* identification: a journey from conventional to molecular methods in medical mycology. **World J Microbiol Biotechnol.** 2014; 30(5): 1437-51.

ALMEIDA, A.A; MESQUITA, C.S.S; SVIDZINSKI, T.I.E; OLIVEIRA, K.M.P. Antifungal susceptibility and distribution of *Candida* spp. isolates in the University Hospital in the municipality of Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2013; 46 (3): 335-339.

ALMIRANTE, B; RODRIGUEZ, D; PARK, B.J; CUENCA-ESTRELLA, M; PLANES, A.M; ALMELA, M. et al. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **J Clin Microbiol.** 2005; 43(4): 1829-35.

ALONSO-VALLE, H; ACHA, O; GARCIA-PALOMO, J.D; FARINAS-ALVAREZ, C; FERNANDEZ-MAZARRASA, C; FARINAS, M.C. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 2003; 22(4): 254-7.

ANTONINI, S.R.C; MENEGHIN, S.P; URASHIMA, A.S. Técnicas Básicas de Biologia Molecular. **Araras: EdUFSCar.** 2004. 57p.

ASHLEY, E.S.D; LEWIS, R; LEWIS, J.S; MARTIN, C; ANDES, D. Pharmacology of Systemic Antifungal Agents. **Clin Infect Dis.** 2006; 43: 28-39.

BARADKAR, V.P; MATHUR, M; KUMAR, S. Hichrom *Candida* agar for identification of *Candida* species. **Indian J Pathol Microbiol.** 2010; 53(1): 93-94.

BARBEDO, L.S; SGARBI, D.B.G. Candidíase. **J Bra Doenças Sex Transm.** 2010; 22(1): 22-38.

BARCHIESI, F; CAGGIANO, G; MARACCI, M; ARZENI, D; SCALISE, G; MONTAGNA, M.T. Antifungal susceptibility patterns of yeast isolates causing bloodstream infections. **J Antimicrob Chemother.** 2003; 51(2): 431-3.

BARKER, K.S; ROGERS, P.D. Recent insights into the mechanisms of antifungal resistance. **Curr Infect Dis Rep.** 2006; 8(6): 449-56.

BASSETTI, M; RIGHI, E; COSTA, A; FASCE, R; MOLINARI, M.P; ROSSO, R. et al. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **BMC Infect Dis.** 2006; 6: 21.

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

BASSETTI, M; MERELLI, M; RIGHI, E; DIAZ-MARTIN, A; ROSELLO, E.M; LUZZATI, R; PARRA, A; TRECARCHI, E.M; SANGUINETTI, M; POSTERARO, B; GARNACHO-MONTERO, J; SARTOR, A; RELLO, J; TUMBARELLO, M. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain. **J Clin Microbiol.** 2013; 51(12): 4167-72.

BLYTH, C.C; CHEN, S.C; SLAVIN, M.A; SERENA, C; NGUYEN, Q; MARRIOTT, D. et al. Not just little adults: candidemia epidemiology, molecular characterization, and antifungal susceptibility in neonatal and pediatric patients. **Pediatrics**. 2009; 123(5): 1360-8.

BOUZA, E; MUNOZ, P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. **Int J Antimicrob Agents**. 2008; 32 Suppl 2: S87-91.

BOW, E.J; EVANS, G; FULLER, J; LAVERDIERE, M; ROTSTEIN, C; RENNIE R. et al. Canadian clinical practice guidelines for invasive candidiasis in adults. **Can J Infect Dis Med Microbiol**. 2010 Winter; 21(4): e122-50.

BRITO, L.R; GUIMARAES, T; NUCCI, M; ROSAS, R.C; PAULA ALMEIDA, L; DA MATTA, D.A. et al. Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. **Med Mycol**. 2006; 44(3): 261-6.

BUKHARY, Z.A. Candiduria: a review of clinical significance and management. **Saudi J Kidney Dis Transpl**. 2008; 19(3): 350-60.

CARRASCO, L; RAMOS, M; GALISTEO, R; PISA, D; FRESNO, M; GONZA´LEZ, M.E. Isolation of *Candida famata* from a Patient with Acute Zonal Occult Outer Retinopathy. **J Clin Microbiol**. 2005; 43 (2): 635-640.

CHANG, M.R; CORREIA, F.P; COSTA, L.C; XAVIER, P.C.N; PALHARES, D.B; TAIRA, D.L; PANIAGO, A.M.M; PONTES, E.R.J.C; MACHADO, V.E. *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. 2008; 50: 265-268.

CHEN, L.Y; KUO, S.C; WU, H.S; YANG, S.P; CHAN, Y.J; CHEN, L.K; WANG, F.D. Associated clinical characteristics of patients with candidemia among different *Candida* species. **J Microbiol Immunol Infect**. 2013; 46(6): 463-8.



CHI, H.W; YANG, Y.S; SHANG, S.T; CHEN, K.H; YEH, K.M; CHANG, F.Y. et al. *Candida albicans* versus non-*albicans* bloodstream infections: the comparison of risk factors and outcome. **J Microbiol Immunol Infect.** 2011; 44(5): 369-75.

CLEVELAND, A.A; FARLEY, M.M; HARRISON, L.H; STEIN, B; HOLLICK, R; LOCKHART, S.R; MAGILL, S.S; DERADO, G; PARK, B.J; CHILLER, T.M. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008-2011. **Clin Infect Dis.** 2012; 55(10): 1352-61.

COLEMAN, D.C; RINALDI, M.G; HAYNES, K.A; REX, J.H; SUMMERBELL, R.C; ANAISSIE, E.J. et al. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. **Med Mycol.** 1998; 36 Suppl 1:156-65.

COLLIN, B; CLANCY, C.J; NGUYEN, M.H. Antifungal resistance in non- *albicans* *Candida* species. **Drug Resist Updat.** 1999; 2(1): 9-14.

COLOMBO, A.L; BRANCHINI, M.L; GEIGER, D; SCHIMIDT, A.L; PIGNATARI, A.C; FISCHMAN, O. Gastrointestinal translocation as a possible source of candidemia in an AIDS patient. **Rev Inst Med Trop São Paulo.** 1996; 38(3): 197-200.

COLOMBO, A.L; NUCCI, M; SALOMAO, R; BRANCHINI, M.L; RICHTMANN, R; DEROSI, A. et al. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 1999; 34(4): 281-6.

COLOMBO, A.L; GUIMARAES, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2003; 36(5): 599-607.

COLOMBO, A.L; NUCCI, M; PARK, B.J; NOUER, S.A; ARTHINGTON-SKAGGS, B; DA MATTA, D.A. et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J Clin Microbiol.** 2006; 44(8): 2816-23.

COLOMBO, A.L; GUIMARAES, T; CAMARGO, L.F.A; RICHTMANN, R; QUEIROZ- TELLES, F; SALLES, M.J.C. Tratamento das principais infecções causadas por *Candida* spp.: relato de reunião conjunta de três sociedades médicas. **Braz J Infect Dis.** 2012; 16: 1-43.

COLOMBO, A.L; GUIMARÃES, T; SUKIENIK, T; PASQUALOTTO, A.C; ANDREOTTI, R; QUEIROZ-TELLES, F; NOUÉR, S.A; NUCCI, M. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9- year period. **Intensive Care Med.** 2014; 40(10): 1489-98.

COSTA, C; PONTE, A; PAIS, P; SANTOS, R; CAVALHEIRO, M; YAGUCHI, T; CHIBANA, H; TEIXEIRA, M.C. New Mechanisms of Flucytosine Resistance in *C. glabrata* Unveiled by a Chemogenomics Analysis in *S. cerevisiae*. **PLoS One.** 2015; 10(8):e0135110.

DA SILVA, C.L; DOS SANTOS, R.M; COLOMBO, A.L. Cluster of *Candida parapsilosis* primary bloodstream infection in a neonatal intensive care unit. **Braz J Infect Dis.** 2001; 5(1): 32-6.

DAS I; NIGHTINGALE, P; PATEL, M; JUMAA, P. Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia: experience in a tertiary referral center in the UK. **Int J Infect Dis.** 2011; 15(11): e759-63.

DIEKEMA, D; ARBEFEVILLE, S; BOYKEN, L; KROEGER, J; PFALLER, M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2012; 73(1): 45-8.

DOTA, K.F.D; SHINOBU, C.S; PATUSSI, E.V; CONSOLARO, M.E.L; SVIDZINSKI, T.I.E. Susceptibilidade de levaduras vaginales a los antifúngicos más utilizados em Maringá, Paraná, Brasil. **Acta Bioq Clin Latinoamericana.** 2008; 42(4): 561-566.

EDDOUZI, J; PARKER, J.E; VALE-SILVA, L.A; COSTE, A; ISCHER, F; KELLY, S; MANAI, M; SANGLARD, D. Molecular mechanisms of drug resistance in clinical *Candida* species isolated from Tunisian hospitals. **Antimicrob Agents Chemother.** 2013 Jul;57(7):3182-93.

EGGIMANN, P; GARBINO, J; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **Lancet Infect Dis.** 2003; 3(11): 685-702.

ELLEPOLA, A.N; JOSEPH, B.K; ALTARAKEMAH, Y; SAMARANAYAKE, L.P; ANIL, S; HASHEM, M; KHAN, Z.U. In vitro Adhesion of Oral *Candida dubliniensis* Isolates to Acrylic Denture Surfaces following Brief Exposure to Sub- Cidal Concentrations of Polyenes, Azoles and Chlorhexidine. **Med Princ Pract.** 2015; 24(1).

FRAISSE, T; CROUZET, J; LACHAUD, L; DURAND, A; CHARACHON, S; LAVIGNE, J.P. et al. Candiduria in those over 85 years old: a retrospective study of 73 patients. **Intern Med.** 2011; 50(18): 1935-40.

FRANÇA, J.C.B; RIBEIRO, C.E.L; QUEIROZ-TELLES, F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e susceptibilidade aos antifúngicos. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2008; 41(1): 23-28.

FRANZ, R; KELLY, S.L; LAMB, D.C; KELLY, D.E; RUHNKE, M; MORSCHHAUSER, J. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. **Antimicrob Agents Chemother.** 1998; 42(12): 3065-72.

FRIDKIN, S.K; JARVIS, W.R. Epidemiology of nosocomial fungal infections. **Clin Microbiol Rev.** 1996; 9(4): 499-511.

FUNGARO, M.H.P. PCR na Micologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.** 2000; 3(14): 12-16.

FURLANETO, M.C; ROTA, J.F; QUESADA, R.M; FURLANETO-MAIA, L; RODRIGUES, R; ODA, S. et al. Species distribution and in vitro fluconazole susceptibility of clinical *Candida* isolates in a Brazilian tertiary-care hospital over a 3-year period. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2011; 44(5): 595-9.

GAVALDA, J; RUIZ, I. Guidelines for the treatment of invasive fungal infection. Invasive fungal infection by *Candida* spp. Invasive Fungal Infection Study Group (MICOMED) and Infection in Transplantation Study Group (GESITRA) of the Spanish Society for Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). **Enferm Infecc Microbiol Clin.** 2003; 21(9): 498-508.

GIOLO, M.P; SVIDZINSKI, T.I.E. Fisiopatogenia. Epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **J Bras Patol Med Lab.** 2010; 46: 225-234.

GIRMENIA, C; PIZZARELLI, G; CRISTINI, F; BARCHIESI, F; SPREGHINI, E; SCALISE, G; MARTINO, P. *Candida guilliermondii* fungemia in patients with hematologic malignancies. **J Clin Microbiol.** 2006; 44(7): 2458-2464.

GIROIS, S.B; CHAPUIS, F; DECULLIER, E; REVOL, B.G. Adverse effects of antifungal therapies in invasive fungal infections: review and meta-analysis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 2006; 25(2): 138-49.

GLÖCKNER, A; CORNELLY, O.A. *Candida glabrata*- unique features and challenges in the clinical management of invasive infections. **Mycoses.** 2015; 58(8): 445-50.

GODOY, P; TIRABOSCHI, I.N; SEVERO, L.C; BUSTAMANTE, B; CALVO, B; ALMEIDA, L.P; DA MATTA, D.A; COLOMBO, A.L. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2003; 98(3): 401-405.

GOLDANI, L.Z; MARIO, P.S. *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. **J Infect.** 2003; 46(3): 155-60.

GUIMARÃES, T; NUCCI, M; MENDONÇA, J.S; MARTINEZ, R; BRITO, L.R; SILVA, N; MORETTI, M.L; SALOMÃO, R; COLOMBO, A.L. Epidemiology and predictors of a poor outcome in elderly patients with candidemia. **Int J Infect Dis.** 2012; 16(6): e442-7.

HAZEN, K.C. New and emerging yeast pathogens. **Clin Microbiol Rev.** 1995; 8(4): 462-78.

HINRICHSEN, S.L; FALCÃO, E; VILELLA, T.A; RÊGO, L; LIRA, C; ALMEIDA, L; MARTINS, M; ARAÚJO, C; DUARTE, M; LOPES, G. *Candida* isolates in tertiary hospitals in northeastern Brazil. **Braz J Microbiol.** 2009; 40(2): 325-8.

KATHIRAVAN, M.K; SALAKE, A.B; CHOTHE, A.S; DUDHE, P.B; WATODE, R.P; MUKTA, M.S; GADHWE, S. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. **Bioorg Med Chem.** 2012; 20(19): 5678-98.

KAUFFMAN, C.A. Candiduria. **Clin Infect Dis.** 2005; 15;41 Suppl 6:S371-6.

KAUFFMAN, C.A. Fungal infections. **Proc Am Thorac Soc.** 2006; 3(1): 35-40.

KETT, D.H; AZOULAY, E; ECHEVERRIA, P.M; VICENT, J.L. *Candida* bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. **Crit Care Med.** 2011; 39: 665-670.

KURTZMAN, C.P; PRICE, N.P; RAY, K.J; KUO, T.M. Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella (Candida) bombicola* yeast clade. **FEMS Microbiol Lett.** 2010; 311(2): 140-6.

LACAZ, C.S; PORTO, E; MARTINS, J.E.C; VACCARI, E.M.H; MELO, N.T. Tratado de Micologia Médica: Lacaz (9ª ed.). São Paulo, **Sarvier**, 2002.

MAKI, K; MATSUMOTO, S; WATABE, E; IGUCHI, Y; TOMISHIMA, M; OHKI, H. et al. Use of a serum-based antifungal susceptibility assay to predict the in vivo efficacy of novel echinocandin compounds. **Microbiol Immunol.** 2008; 52(8): 383-91.

MARIANO, P.de. L; MILAN, E.P, DA MATTA, D.A; COLOMBO, A.L. *Candida dubliniensis* identification in Brazilian yeast stock collection. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2003; 98(4): 533-8.

MARINHO, S.A; TEIXEIRA, A.B; SANTOS, O.S; CAZANOVA, R.F; FERREIRA, C.A.S; CHERUBINI, K; OLIVEIRA, S.D. Identification of *Candida* spp. by phenotypic tests and PCR. **Braz J Microbiol.** 2010; 41: 286-294.

MORGAN, M. A; WILKOWSKE, C. J; ROBERTS, G. D. *Candida pseudotropicalis* fungemia and invasive disease in an immunocompromised patient. **J Clin Microbiol.** 1984; 20 (5): 1006-1007.

MOTTA, A.L; ALMEIDA, G.M; ALMEIDA JUNIOR, J.N; BURATTINI, M.N; ROSSI, F. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. **Braz J Infect Dis.** 2010; 14(5): 441-8.

MOUSAVI, S.A.A; KHALESI, E; SHAHIDI, B; AGHIGHI, S; SHARIFI, F; ARAM, F. Rapid Molecular Diagnosis for *Candida* species Using PCR-RFLP. **Biotechnology.** 2007; 6(4): 583-587.

MULLIS, K.B; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.** 1987; 155: 335-50.

NEMCOVA, E; CERNOCHOVA, M; RUZICKA, F; MALISOVA, B; FREIBERGER, T; NEMEC, P. Rapid Identification of medically important *Candida* isolates using high resolution melting analysis. **PLoS One.** 2015; 10(2): e0116940.

NUCCI, M; MARR, K.A. Emerging fungal diseases. **Clin Infect Dis.** 2005; 41(4): 521-6.

OCHIUZZI, M.E; CATALDI, S; GUELFAND, L; MALDONADO, I; ARECHAVALA, A; RED DE MICOLOGÍA CABA, ARGENTINA. Evaluation of Vitek 2 for the identification of *Candida* yeasts. **Rev Argent Microbiol.** 2014; 46(2): 107-10.

OLIVEIRA, R.G; SOBRINHO, N.U; SOUZA, M.V.B; YAMAMOTO, L; OKAY, T.S; DEL NEGRO, G.M.B. Comparison of four random amplified polymorphic DNA (RAPD) systems to assess genetic relatedness and fluconazole susceptibility of *Candida tropicalis* pediatric isolates. **Pediatrics**. 2008; 30(2): 88-94.

OLIVEIRA, V.K; RUIZ, Lda.S, OLIVEIRA, N.A; MOREIRA, D; HAHN, R.C; MELO, A.S; NISHIKAKU, A.S; PAULA, C.R. Fungemia caused by *Candida* species in a children's public hospital in the city of São Paulo, Brazil: study in the period 2007-2010. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. 2014; 56(4): 301-5.

ORTEGA, M; MARCO, F; SORIANO, A; ALMELA, M; MARTINEZ, J.A; LOPEZ, J. et al. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. **J Hosp Infect**. 2011; 77(2): 157-61.

OSTROSKY-ZEICHNER, L; CASADEVALL, A; GALGIANI, J.N; ODDS, F.C; REX, J.H. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. **Nat Rev Drug Discov**. 2010; 9(9): 719-27.

PAPPAS, P.G; REX, J.H; SOBEL, J.D; FILLER, S.G; DISMUKES, W.E; WALSH, T.J. et al. Guidelines for treatment of candidiasis. **Clin Infect Dis**. 2004; 38(2): 161-89.

PASSOS, X.S; COSTA, C.R; ARAUJO, C.R; NASCIMENTO, E.S; E SOUZA, L.K, FERNANDES, Ode. F. et al. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp. bloodstream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. **Mycopathologia**. 2007; 163(3): 145-51.

PEREA, S; LÓPEZ-RIBOT, J.L; KIRKPATRICK, W.R; McAtee, R.K; SANTILLÁN, R.A; MARTÍNEZ, M; CALABRESE, D; SANGLARD, D; PATTERSON, T.F. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. **Antimicrob Agents Chemother**. 2001; 45(10): 2676-84.

PEREA, S; PATTERSON, T.F. Antifungal resistance in pathogenic fungi. **Clin Infect Dis.** 2002; 35(9): 1073-80.

PFALLER, M.A; HOUSTON, A; COFFMANN, S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimen for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. **J Clin Microbiol.** 1996; 34:58-61.

PFALLER, M.A; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol. Rev.** 2007; 20(1): 133-163.

PFALLER, M.A; DIEKEMA, D.J; GIBBS, D.L; NEWELL, V.A; NAGY, E; DOBIASOVA, S; RINALDI, M; BARTON, R; VESELOV, A. *Candida krusei*, a Multidrug-Resistant Opportunistic Fungal Pathogen: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. **J Clin Microbiol.** 2008; 46(2): 515–521.

PFALLER, M.A; MESSER, S.A; MOET, G.J; JONES, R.N; CASTANHEIRA, M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). **Int J Antimicrob Agents.** 2011; 38(1): 65-9.

PFALLER, M.A; ANDES, D.R; DIEKEMA, D.J; HORN, D.L; REBOLI, A.C; ROTSTEIN, C; FRANKS, B; AZIE, N.E. Epidemiology and Outcomes of Invasive Candidiasis Due to Non-albicans Species of *Candida* in 2,496 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) Registry 2004–2008. **PLoS One.** 2014; 9(7): e101510.

PLAYFORD, E.G; MARRIOTT, D; NGUYEN, Q; CHEN, S; ELLIS, D; SLAVIN, M. et al. Candidemia in nonneutropenic critically ill patients: risk factors for non-*albicans* *Candida* spp. **Crit Care Med.** 2008; 36(7): 2034-9.



PRINSLOO, B; WELDHAGEN, G. F; BLAINE, R. W. *Candida famata* central nervous system infection. **S Afr Med J.** 2003; 93(8): 601-602.

PISA, D; ALONSO, R; CARRASCO, L. Fungal infection in patients with multiple sclerosis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 2011; 30(10):1173-80.

RAO, N.A; NERENBERG, A.V; FORSTER, D.J. Torulopsis *Candida (Candida famata)* Endophthalmitis Simulating Propionibacterium acnes Syndrome. **Archives of Ophthalmology.** 1991; 109: 1718-1721.

RAVIKUMAR, G; RAJE, Urs. S; VIJAYA PRAKASH, N.B; RAO, C.G; VARDHANA, K.V. Development of a multiplex polymerase chain reaction for the simultaneous detection of microsporidians, nucleopolyhedrovirus, and densovirus infecting silkworms. **J Invertebr Pathol.** 2011; 107(3): 193-7.

RIBEIRO, E.L; GUIMARÃES, R.I; INÁCIO, M.C.C; FERREIRA, W.M; CARDOSO, C.G; DIAS, S.M. DA S; NAVES, P.L.F. Aspectos das Leveduras de *Candida* Vinculadas as Infecções Nosocomiais. **NewsLab.** 2004; 64: 106-128.

RIBEIRO, M.A; PAULA, C.R; JOHN, R; PERFECT, J.R; COX, G.M. Phenotypic and genotypic evaluation of fluconazole resistance in vaginal *Candida* strains isolated from HIV-infected women from Brazil. **Med Mycol.** 2005; 43(7): 647-50.

ROCHA, B.A; DEL NEGRO, G.M.B; YAMAMOTO, L; DE SOUZA, M.V.B; PRECIOSO, A.R; OKAY, T.S. Identification and differentiation of *Candida* species from pediatric patients by random amplified polymorphic DNA. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2008; 41(1): 1-5.

SAIMAN, L; LUDINGTON, E; DAWSON, J.D; PATTERSON, J.E; RANGEL-FRAUSTO, S; WIBLIN, R.T. et al. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. **Pediatr Infect Dis J.** 2001; 20(12): 1119-24.

SCHERER, S; MAGEE, P.T. Genetics of *Candida albicans*. **Microbiol Rev.** 1990; 54(3): 226-241.

SCHMALRECK, A.F; WILLINGER, B; HAASE, G; BLUM, G; LASS-FLORL, C; FEGELER, W. et al. Species and susceptibility distribution of 1062 clinical yeast isolates to azoles, echinocandins, flucytosine and amphotericin B from a multi-centre study. **Mycoses**. 2012; 55(3): e124-37.

SCHOCH, C.L; SEIFERT, K.A; HUHNDORF, S; ROBERT, V; SPOUGE, J.L; LEVESQUE, C.A; CHEN, W. Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2012; 109(16): 6241-6.

SHIM, G.H; KIM, S.D; KIM, H.S; KIM, E.S; LEE, H.J; LEE, J.A. et al. Trends in epidemiology of neonatal sepsis in a tertiary center in Korea: a 26-year longitudinal analysis, 1980-2005. **J Korean Med Sci**. 2011; 26(2): 284-9.

SHOKOHI, T; HASHEMI SOTEH, M.B; SALTANAT POURI, Z; HEDAYATI, M.T; MAYAHI, S. Identification of *Candida* species using PCR-RFLP in cancer patients in Iran. **Indian J Med Microbiol**. 2010; 28(2): 147-51.

SHORR, A.F; LAZARUS, D.R; SHERNER, J.H; JACKSON, W.L; MORREL, M; FRASER, V.J. et al. Do clinical features allow for accurate prediction of fungal pathogenesis in bloodstream infections? Potential implications of the increasing prevalence of non-*albicans* candidemia. **Crit Care Med**. 2007; 35(4): 1077-83.

SIMONA, E.S; DIANA, P; ROBERTINA, I; IONELA, A; ILEANA, S. Molecular identification of some yeast strains involved in oral candidosis. **Romanian Biotechnological Letters**. 2009; 14(1): 4180-4186.

SPILIOPOULOU, A; DIMITRIOU, G; JELASTOPULU, E; GIANNAKOPOULOS, I; ANASTASSIOU, E.D; CHRISTOFIDOU, M. Neonatal intensive care unit candidemia: epidemiology, risk factors, outcome, and critical review of published case series. **Mycopathologia**. 2012; 173(4): 219-28.

STEINBACH, W.J. Epidemiology of invasive fungal infections in neonates and children. **Clin Microbiol Infect.** 2010; 16(9): 1321-7.

THOMPSON, G.R; CADENA, J; PATTERSON, T.F. Overview of antifungal agents. **Clin Chest Med.** 2009; 30(2): 203-15.

TORO, M; TORRES, M.J; MAITE, R; AZNAR, J. Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. **Clin Microbiol Infect.** 2011; 17(3): 418-424.

TORTORANO, A.M; PEMAN, J; BERNHARDT, H; KLINGSPOR, L; KIBBLER, C.C; FAURE, O. et al. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 2004; 23(4): 317-22.

TORTORANO, A.M; PRIGITANO, A; DHO, G; GRANCINI, A; PASSERA, M. Antifungal susceptibility profiles of *Candida* isolates from a prospective survey of invasive fungal infections in Italian intensive care units. **J Med Microbiol.** 2012; 61(Pt 3): 389-93.

TRICK, W.E; FRIDKIN, S.K; EDWARDS, J.R; HAJJEH, R.A; GAYNES, R.P. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. **Clin Infect Dis.** 2002; 35(5): 627-30.

TROFA, D; GACSER, A; NOSANCHUK, J.D. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. **Clin Microbiol Rev.** 2008; 21(4): 606–625.

VALENZA, G; STRASEN, J; SCHÄFER, F; FROSCH, M; KURZAI, O; ABELE-HORN, M. Evaluation of New Colorimetric Vitek 2 Yeast Identification Card by Use of Different Source Media. **J Clin Microbiol.** 2008; 46(11): 3784–3787.

VIUDES, A; PEMAN, J; CANTON, E; UBEDA, P; LOPEZ-RIBOT, J.L; GOBERNADO, M. Candidemia at a tertiary-care hospital: epidemiology, treatment, clinical outcome and risk factors for death. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 2002; 21(11): 767-74.

WEICHERT, S; REINSHAGEN, K; ZAHN, K; GEGINAT, G; DIETZ, A; KILIAN, A. K; SCHROTEN, H; TENENBAUM, T. Candidiasis caused by *Candida kefyr* in a neonate: Case report. **BMC Infectious Diseases**. 2012; 12 (61): 1-4,

WENZEL, R.P. Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. **Clin Infect Dis**. 1995; 20(6): 1531-4.

WHITE, T.C; MARR, K.A; BOWDEN, R.A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clin Microbiol Rev**. 1998; 11(2): 382-402.

WINGARD, J.R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. **Clin Infect Dis**. 1995; 20(1): 115-25.

WYNN, J.L; TAN, S; GANTZ, M.G; DAS, A; GOLDBERG, R.N; ADAMS-CHAPMAN, I. et al. Outcomes following candiduria in extremely low birth weight infants. **Clin Infect Dis**. 2012; 54(3): 331-9.

ZARDO, V; MEZZARI, A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida* sp. **NewsLab**. 2004; 63: 136-146.

ZAUGG, C; BORG-VON ZEPELIN, M; REICHARD, U; SANGLARD, D; MONOD, M. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. **Infect Immun**. 2001; 69(1): 405-12.

## 5 ARTIGO CIENTÍFICO

**Comparação de diferentes métodos de identificação e perfil de susceptibilidade antifúngica em isolados de *Candida* spp.**

**Luana Mireli Carbonera Rodrigues<sup>1</sup>, Kelly Mari Pires de Oliveira<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados- FCS/UFGD, Dourados- Mato Grosso do Sul, Brasil.

<sup>2</sup>Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados- FCBA/UFGD, Dourados- Mato Grosso do Sul, Brasil.

### **Correspondência do autor:**

Kelly Mari Pires de Oliveira (Oliveira, K.M)

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, Cidade Universitária, Caixa Postal 533, CEP 79.804-970, Dourados, MS, Brasil.

E-mail: [kellyoliveira@ufgd.edu.br](mailto:kellyoliveira@ufgd.edu.br)

### Resumo

A correta identificação dos isolados e a determinação do perfil de susceptibilidade são fatores necessários para uma terapia adequada. O estudo avaliou as diferentes técnicas de identificação de espécies de *Candida* por meio do VITEK 2, CHROMagar *Candida* e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O sistema automatizado VITEK 2 também foi avaliado para a determinação da susceptibilidade antifúngica, em conjunto com o método da microdiluição em caldo. 81 amostras de *Candida* foram coletadas de março de 2013 a março de 2014. A identificação das leveduras foi realizada pelo VITEK 2, CHROMagar *Candida* e PCR. O VITEK 2 apresentou 34,6% de identificação incorreta. O CHROMagar *Candida* não identificou 14,8% dos isolados até nível de espécie e apresentou 8,6% de erros em sua identificação. A PCR identificou corretamente 100% dos isolados e os dados foram confirmados pelo seqüenciamento da região ITS. O perfil de susceptibilidade antifúngica foi determinado pelo VITEK 2 e microdiluição em caldo (MIC). 11,1% dos isolados apresentaram resistência a anfotericina B (AMB), 4,9% ao fluconazol (FLC) e 2,4% ao voriconazol (VRC). Pelo MIC, 7,4% dos isolados apresentaram resistência e a apenas ao VRC. Um isolado apresentou resistência ao VRC nos dois métodos de susceptibilidade testados. 50% dos isolados de *Candida krusei* não foi identificado pelo VITEK 2 e 50% dos isolados desta espécie apresentaram como susceptível ao FLC, o que demonstra a importância de avaliar os dois resultados antes da terapêutica. Portanto, a PCR é uma ferramenta rápida, útil e precisa para a identificação de leveduras, mas, ainda não é viável para a rotina hospitalar. O VITEK 2 é uma ferramenta de grande valia para a identificação e determinação da susceptibilidade antifúngica, mas, considerando centros hospitalares onde há baixa disponibilidade de recursos, o CHROMagar *Candida* para a identificação laboratorial das espécies de leveduras apresentou como uma alternativa viável, pois seus resultados são tão bons como o sistema automatizado, com um menor custo-benefício.

Palavras-chave: *Candida*, meio cromogenico, VITEK 2, análise da seqüência de DNA, susceptibilidade antifúngica.

## Introdução

Infecções invasivas causadas por leveduras do gênero *Candida* representam um grave problema no ambiente hospitalar, pois correspondem por 80% de todas as infecções fúngicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos (Ortega *et al.*, 2011, Colombo *et al.*, 2012).

*Candida albicans* é a espécie frequentemente mais isolada de infecções clínicas, porém espécies de *Candida* não-*Candida albicans* (CNCA) como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* também são isoladas. Estas espécies apresentam diferentes perfis de susceptibilidade frente aos antifúngicos, sendo conhecidos casos de resistência intrínseca e adquirida, como *C. krusei* que é intrinsecamente resistente ao fluconazol e *C. glabrata* que apresenta uma tendência natural para diminuição de sensibilidade (Chi *et al.*, 2011, Mohammadi *et al.*, 2015).

Os métodos convencionais de identificação baseiam-se em características fenotípicas, como é o caso dos meios cromogênicos, mas, a identificação é muitas vezes inconclusiva (Latouche *et al.*, 1997, Alam *et al.*, 2014). No ambiente hospitalar, onde a demanda é elevada e o tempo para se obter o resultado é um fator crucial para o início precoce da terapia antifúngica precisa, é utilizado o sistema automatizado VITEK 2 (bioMérieux, Inc., Hazelwood, MO), que proporciona resultados rápidos, com pouca intervenção humana e permite a identificação das espécies e o perfil de susceptibilidade (Charnot-Katsikas *et al.*, 2014, Melhem *et al.*, 2013).

Devido à sua sensibilidade e rapidez, métodos diagnósticos moleculares vem sendo continuamente utilizados na detecção de agentes patogênicos (Wang *et al.*, 2015). A análise de espaçadores transcritos internos (ITS) tem sido utilizada na identificação molecular de leveduras, contribuindo de forma importante nas investigações epidemiológicas das mesmas. (Schoch *et al.* 2012).

A correta identificação dos isolados e a determinação do perfil de susceptibilidade são fatores necessários para uma terapia adequada, fator importante para reduzir as taxas de mortalidade e morbidade associadas a essa infecção, que muitas vezes são causadas pelo aumento da resistência aos antifúngicos e o surgimento de novas espécies (Borghi *et al.*, 2010).

Para constatar a confiabilidade das metodologias de diagnóstico, nosso estudo avaliou as diferentes técnicas de identificação de espécies de *Candida* por meio do VITEK 2, CHROMagar *Candida* e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O sistema automatizado VITEK 2 também foi avaliado para a determinação da suscetibilidade

antifúngica, em conjunto com o método de referência do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

## **Material e métodos**

### **Isolados**

Isolados de *Candida* spp. de pacientes internados em um Hospital Público de ensino terciário localizado na cidade de Dourados, Mato Grosso do Sul, durante o período de março de 2013 a março de 2014 foram incluídos neste estudo.

As amostras clínicas foram coletadas por profissionais de saúde e cultivadas em Agar Sabouraud Dextrose (SDA) Himedia® a 37°C por 48 horas.

### **Testes de identificação:**

#### **Método automatizado VITEK 2**

Colônias de *Candida* spp. isoladas no SDA foram submetidas ao sistema automatizado VITEK 2 para a identificação. Foi preparado suspensões em solução salina estéril a uma turbidez equivalente a um padrão 2 da escala de McFarland de cada isolado e inserida no sistema automatizado VITEK 2. A identificação foi considerada quando o resultado final foi "excelente" ou "muito bom, de acordo com as recomendações do fabricante.

#### **Método cromogênico**

Colônias de *Candida* spp isoladas em meio SDA foram subcultivadas no meio CHROMagar *Candida* (Difco®) e incubadas a 37°C durante 48 horas e identificadas conforme recomendação do fabricante.

#### **Extração de DNA**

A extração de DNA foi realizada a partir de três colônias celulares cultivadas em caldo sabouraud por meio do kit de extração Yeastar Genomic. A quantidade (260 nm) e pureza (260/280) do DNA genômico foram determinadas por densidade óptica em nanofotofotômetro (NanoPhotometer™ P-300 UV-Vis, IMPLEN®).

#### **Primers PCR**

Para a identificação molecular das espécies foi realizada inicialmente PCR Multiplex, na qual foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores específicos de



espécies distintas de *Candida* conforme descritos por Li *et al.*, 2003 (Tabela 1). Para os isolados que foram divergentes na identificação automatizadas e microbiológica ou que não amplificaram por meio da PCR Multiplex, foi realizada novamente a amplificação do DNA com oligonucleotídeos iniciadores universais (White *et al.*, 1990).

Tabela 1. *Primers* utilizados na identificação molecular de espécies do gênero *Candida*

Espécie	Sequência	Fragmento (pb)	Genbank	Referência
<i>C. lusitaniae</i> <sup>1</sup>	Ci F 5'GTTAGGCGTTGCT CCGAAAT3'	116	AY20707 8	
<i>C. parapsilosi</i> <sup>1</sup>	Cp F 5'GGCGGAGTATAAA GTAATGGATAG3'	126	AY20707 2	
<i>C. tropicalis</i> <sup>1</sup>	Ct F 5'AAGAATTTAACGT GGAAACTTA3'	149	AY20708 0	
<i>C. guilliermondii</i> <sup>1</sup>	Cgu F 5'GTATTG GCA TGG GTA GTA CTG3'	185	AY20707 6	Li et al 2003
<i>C. albicans</i> <sup>1</sup>	Ca F 5'TCAACTTGTCACA CCAGATTATT3'	402	AY20706 7	
<i>C. Krusei</i> <sup>1</sup>	Ck F 5'GAT TTAGTACTACTG CGTG A3'	475	AY20707 0	
<i>C. glabrata</i> <sup>1</sup>	Cgl F 5' CACGACTCGACACT TTCTAATT3'	632	AY20706 8	
Universal <sup>1,2</sup>	ITS4 R 5'TCCTCCGCTTATT GATATGC3'		M27607	White et al 1990
Universal <sup>1</sup>	ITS1 F 5'TCCGTAGGTGAAC CTGCGG3'		D89886	

<sup>1</sup>Primers utilizados na PCR Multiplex. <sup>2</sup>Primers utilizados para amplificar o DNA de isolados que foram discrepantes nas identificações automatizadas, microbiológica ou molecular ou que não amplificam por meio da PCR Multiplex.

### **Reação em Cadeia pela Polimerase**

Todas as reações de amplificação foram realizadas em termociclador BIORAD modelo MyCycler™ Thermal Cycler. As soluções foram preparadas em volume final de 25 µL, constituídos por 12,5 µL de PCR Master MIX (Promega, USA), 1 µL de cada *Primer* (10 pmoles) e 2 µL DNA genômico (10 a 20 ng).

As condições de ciclagem continham uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 3', 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1', anelamento a 55°C por 1' e extensão a 72°C por 1', seguido da extensão final a 72°C por 5'. Os produtos resultantes das amplificações por PCR Multiplex foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com gel red (Uniscience, USA).

### **Sequenciamento das regiões ITS (Internal Transcribed Spacer)**

Foram sequenciados isolados que apresentaram divergências nos métodos de identificação. Para a confirmação da PCR, foi sequenciado também um isolado de cada espécie. Os produtos resultantes da amplificação com *primers* da região ITS foram purificados por meio de Álcool Isoamílico e sequenciados pelo método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) no ABI 3500 *automated DNA sequencer* (Applied Biosystems) com os mesmos *primers* utilizados na PCR e o *BigDye Terminator cycle sequencing*.

As sequências obtidas foram analisadas com o auxílio dos *Softwares* Cap 3 e BioEdit e submetidas a alinhamentos, utilizando o *Software* ClustalW2 (Larkin *et al.*, 2007). As sequências foram alinhadas com sequências disponíveis no *Genbank* por meio do BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

### **Testes de susceptibilidade antifúngica:**

#### **VITEK 2**

O teste com o sistema automatizado VITEK 2 foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Os inóculos foram preparados em solução salina estéril a partir de colônias isoladas em SDA a 35°C por 24 horas e ajustados a uma turbidez equivalente a 2,0 de padrão de McFarland. Após, foram submetidos ao aparelho que fez as leituras automaticamente. Os antifúngicos testados foram Anfotericina B (AMB) (gama de 0,03-16 µg/ml), Fluconazol (FLC) (gama, 0,12 a 64 µg/ml), e o Voriconazol (VRC) (gama de 0,015-8 µg / mL).

### **Microdiluição em caldo (in vitro antimicrobial susceptibility testing)**

As CIMs para todos os isolados foram determinadas seguindo as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute dos documentos M27-A3 e M27-S4 (CLSI 2008, CLSI 2012). Os agentes antifúngicos utilizados no estudo foram Anfotericina B (AMB) (Squibb Farmacêutica, Princeton, NJ, EUA), Fluconazol (FLC) (Pfizer Inc, New York, NY, EUA.) e Voriconazol (VRC) (Pfizer Ltd., Sandwich, Reino Unido).

Os isolados de *Candida* foram cultivados em SDA a 35 °C durante 24 horas. As suspensões foram preparadas em solução salina estéril (0,85%) e ajustadas para 0,5 a  $2,5 \times 10^3$  UFC / mL. RPMI-1640 (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, EUA) foi utilizado como meio de cultura, tamponado com ácido 3 morfolino propanesulfonic (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, EUA) a pH 7,0 e suplementado com 2% de glucose.

O teste foi realizado em microplacas de 96 poços de fundo chato (Nuncclon, Roskilde, SN, DK) que continham 100 µL de inóculo e 100 µL de uma das 10 concentrações dos antifúngicos testados. As microplacas foram incubadas a 35 ° C durante 48 horas. Todos os testes foram realizados em triplicata. A cepa padrão de *C. parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizado como controle. As leituras foram realizadas visualmente. CIMs para FLC e VRC foram determinados como a menor concentração que inibiu, 50% do crescimento em comparação com a turbidez do crescimento de controle. CIM de AMB foi determinada como sendo a menor concentração em que não foi detectado crescimento visível.

Os pontos de corte de susceptibilidade aos antifúngicos foram determinados de acordo com os protocolos MS27-S3 e M27-S4.

## **Resultados**

### **Isolados**

Neste estudo foram incluídos 81 isolados, sendo 39 provenientes de urina, 12 de swab retal, 12 de swab nasal, 8 de aspirado traqueal, 5 de sangue, 3 de ponta de cateter, 1 de escarro e 1 de lesão de perna e tornozelo.

### **Identificação**

O sistema automatizado VITEK 2 apresentou 28 (34,6%) de identificação incorreta. O CHROMagar *Candida* não identificou todos os isolados em nível de espécie e 12 (14,8%) foram identificados como *Candida* spp, apresentando assim 76,6% de similaridade na identificação de espécies enquanto que o sistema automatizado

VITEK 2 apresentou 65,4%. As espécies de *Candida* identificadas no CHROMagar, VITEK 2 e PCR são demonstradas na tabela 2.

Tabela 2: Comparação entre os métodos fenotípicos CHROMagar *Candida* e VITEK 2 e o método molecular PCR para a identificação de isolados de *Candida* spp.

<b>Espécie</b>	<b>CHROMagar (N)</b>	<b>VITEK 2 (N)</b>	<b>PCR (N)</b>
<i>C. albicans</i>	32	34	31
<i>C. tropicalis</i>	27	21	27
<i>C. glabrata</i>	6	5	9
<i>C. krusei</i>	4	3	6
<i>C. parapsilosis</i>	-	5	4
<i>C. lusitaniae</i>	-	1	2
<i>C. guilliermondii</i>	-	2	2
<i>C. famata</i>	-	8	-
<i>C. dubliniensis</i>	-	1	-
<i>C. colliculosa</i>	-	1	-
<i>C. spp</i>	12	-	-

N, número de isolados de *Candida* spp.

### Sequenciamento

Trinta e seis isolados foram sequenciados, sendo 17 que apresentaram divergências nos métodos fenotípicos de identificação, 12 que não foram identificados até nível de espécie pelo CHROMagar *Candida* e 7 isolados para a confirmação da PCR, sendo um isolado de cada espécie.

### Susceptibilidade antifúngica

No sistema automatizado VITEK 2, 9 (11,1%) isolados apresentaram resistência a AMB, 4 (4,9%) ao FLC e 2 (2,4%) ao VRC.

Pelo método padronizado do MIC, apenas 2 (7,4%) dos isolados de *C. tropicalis* apresentaram resistência ao VRC. Para o FCL e AMB todos os isolados foram sensíveis (tabela 4). Apenas um isolado apresentou resistência nos dois métodos de susceptibilidade antifúngica testados. As Concentrações Mínimas Inibitórias (CMIs) capazes de inibir 50% e 90% do crescimento dos isolados são demonstradas na tabela 4.

Entre os métodos para a determinação dos valores da suscetibilidade aos antifúngicos, houve variações quando consideradas as espécies (tabela 4). O sistema automatizado VITEK 2 e a microdiluição em caldo apresentaram 90,3% de resultados semelhantes a *C. albicans*, 88,9% a *C. tropicalis* e 66,7% a *C. glabrata*. *C. krusei* e *C. parapsilosis* apresentaram 50% e os demais isolados apresentaram 100%.

O sistema automatizado VITEK 2 quando comparado a microdiluição em caldo apresentou 88,89% de resultados concordantes a AMB, 95,06% ao FLC e 97,53% ao VRC.

Tabela 4: Variação de susceptibilidade *in vitro* a anfotericina B, fluconazol e voriconazol determinada pelos métodos CLSI MS27-A3 e M27-S4 e VITEK 2 AST-YS01 dos isolados de *Candida* spp.

Espécie (Nº de isolados)	Antifúngico	Método	Resistentes	MIC (µg/mL)		
				Variação	50%	90%
Todos os isolados (81)	Anfotericina B	CLSI	0	0,03-0,5	0,03	0,5
		VITEK 2	9	0,25-16	1	16
	Fluconazol	CLSI	0	0,25-32	0,5	16
		VITEK 2	4	1-32	8	16
	Voriconazol	CLSI	2	0,03-2	0,03	0,5
		VITEK 2	2	0,12-1	1	0,12
<i>C. albicans</i> (31)	Anfotericina B	CLSI	0	0,03-0,5	0,25	0,5
		VITEK 2	3	0,5-16	1	16
	Fluconazol	CLSI	0	0,25-2	0,25	0,5
		VITEK 2	0	1-2	1	1
	Voriconazol	CLSI	0	0,03-0,125	0,03	0,06
		VITEK 2	0	0,12	0,12	0,12
<i>C. tropicalis</i> (27)	Anfotericina B	CLSI	0	0,03-0,5	0,03	0,03
		VITEK 2	2	0,25-16	0,5	4
	Fluconazol	CLSI	0	0,25-4	1	1
		VITEK 2	1	1-4	1	4
	Voriconazol	CLSI	2	0,03-2	0,06	0,25
		VITEK 2	1	0,12-1	0,12	0,12
<i>C. glabrata</i> (9)	Anfotericina B	CLSI	0	0,03-0,5	0,03	0,5
		VITEK 2	2	0,25-16	0,5	16
	Fluconazol	CLSI	0	0,25-32	16	16
		VITEK 2	0	1-8	4	4
	Voriconazol	CLSI	0	0,03-1	0,5	1
		VITEK 2	1	0,12-1	0,12	0,12
<i>C. krusei</i> (6)	Anfotericina B	CLSI	0	0,03-0,25	0,03	0,03
		VITEK 2	0	0,5-1	1	1
	Fluconazol	CLSI	0	0,25-32	1	32
		VITEK 2	3	1-32	16	32
	Voriconazol	CLSI	0	0,03-0,5	0,5	0,5

		VITEK 2	0	0,12	0,12	0,12
		CLSI	0	0,03-0,25	0,03	0,03
	Anfotericina B	VITEK 2	2	0,5-8	4	8
<i>C. parapisilosis</i> (4)	Fluconazol	CLSI	0	0,25-1	0,25	0,25
		VITEK 2	0	1-4	2	4
	Voriconazol	CLSI	0	0,03	0,03	0,03
		VITEK 2	0	0,12	0,12	0,12
<i>C. lusitaniae</i> (2)	Anfotericina B	CLSI	0	0,03-0,5	0,03	0,5
		VITEK 2	0	0,5-1	0,5	1
	Fluconazol	CLSI	0	1-2	1	2
		VITEK 2	0	1	1	1
<i>C. guilliermondii</i> (2)	Voriconazol	CLSI	0	0,03	0,03	0,03
		VITEK 2	0	0,12	0,12	0,12
	Anfotericina B	CLSI	0	0,03-0,5	0,03	0,5
		VITEK 2	0	0,25	0,25	0,25
Fluconazol	CLSI	0	0,25-4	0,25	4	
	VITEK 2	0	4	4	4	
Voriconazol	CLSI	0	0,06	0,06	0,06	
	VITEK 2	0	0,12	0,12	0,12	

---

## Discussão

A identificação de *Candida* em nível de espécie é uma prática rotineira em laboratórios. Meios cromogênicos têm a vantagem de identificação relativamente rápida e de preparação simples (Vijaya *et al.* 2011). No nosso estudo, o meio CHROMagar *Candida* identificou corretamente a maioria dos isolados das espécies de *C. albicans* e todos os isolados de *C. tropicalis*. Daef *et al.* (2014) relataram que CHROMagar *Candida* identificou corretamente todos os isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, o que demonstra um bom desempenho deste meio para a diferenciação de espécies mais comuns de *Candida*. Também observamos que dentre os isolados que o CHROMagar *Candida* foi capaz de identificar, 6 (7,4%) foram identificados erroneamente.

O sistema automatizado VITEK 2 identifica a espécie em aproximadamente 18 horas após incubação, uma vantagem clinicamente importante, enquanto que o CHROMagar *Candida* requer 48 a 72 horas para a identificação completa. Rajkumari *et al.* (2014) relataram 79,5% de identificação correta pelo sistema automatizado VITEK 2 e o CHROMagar *Candida* foi capaz de identificar corretamente 85,6% dos isolados, corroborando com o nosso estudo, onde o CHROMagar *Candida* teve um melhor desempenho em relação ao VITEK 2.

A técnica do seqüenciamento neste estudo foi utilizada para comprovar a eficácia da PCR. Todos os isolados sequenciados apresentaram os mesmos resultados da PCR, confirmando assim a eficácia da mesma.

Massonet *et al.* (2004) descreveram que a maior parte dos erros do sistema automatizado VITEK 2 estavam relacionadas com a espécie *C. glabrata*. Vijgem *et al.* (2011) e Rajkumari *et al.* (2014) também demonstraram falhas na identificação de *C. glabrata* por este método de identificação. Nosso estudo também demonstrou erros quanto à identificação de *C. glabrata*. O sistema automatizado VITEK 2 identificou erroneamente quatro (44,4%) isolados desta espécie, o que demonstra a importância da correta identificação, pois isolados de *C. glabrata* tendem a ter uma resistência natural aos azóis (Silva *et al.*, 2012).

Encontramos também erros na identificação da espécie de *C. krusei*. O sistema automatizado VITEK 2 identificou somente três (50%) isolados no período de estudo. Conseqüentemente, estes três pacientes em que o sistema automatizado VITEK 2 não conseguiu identificar corretamente podem ter sido tratados de maneira inadequada, uma vez que o fluconazol é o antifúngico de primeira escolha no ambiente hospitalar para o

tratamento de infecções fúngicas e esta espécie se apresenta resistente a este medicamento (Mohammadi et al., 2015). Assim, estes fatos demonstram a importância da associação dos resultados de identificação com os resultados da susceptibilidade antifúngica para uma terapia adequada e segura.

Ochiuzzi *et al.* (2014) encontraram diferenças na susceptibilidade de *C. glabrata* associada ao VRC e de *C. krusei* associada ao FLC. Nosso estudo também observou estas discrepâncias, onde um isolado de *C. glabrata* foi resistente ao VRC no VITEK 2 e susceptível na microdiluição em caldo e 3 isolados de *C. krusei* não apresentaram resistência ao FLC no sistema automatizado VITEK 2. Borghi *et al.* (2010) também apresentaram discrepâncias entre esses métodos de susceptibilidade relacionados ao VRC e FLC, reforçando a idéia de que o sistema automatizado VITEK 2 apresenta falhas na avaliação da susceptibilidade.

Melhem *et al.* (2013) observaram resultados falsos-positivos para AMB no sistema automatizado VITEK 2. Em nosso estudo, podemos observar que 11,1% dos isolados apresentaram resistência a AMB no sistema automatizado VITEK 2 e que não foram confirmados pelo método da microdiluição em caldo.

A vigilância das espécies envolvidas nas infecções causadas por estas leveduras junto com os perfis de susceptibilidade antifúngica fornece aos hospitais um instrumento de grande valia de modo a evitar tratamentos empíricos. O sistema automatizado VITEK 2 e o CHROMagar *Candida* demonstraram um bom desempenho para a identificação laboratorial de isolados clínicos, porém, a PCR demonstrou melhores resultados. No entanto, esta técnica ainda não contempla as necessidades da rotina laboratorial dos hospitais.

No ambiente hospitalar, o monitoramento do desenvolvimento de resistência antifúngica durante a terapia deve ser avaliado numa base de rotina para controlar e prevenir infecções hospitalares e a disseminação de isolados resistentes. O sistema automatizado VITEK 2 para determinar a suscetibilidade aos antifúngicos demonstrou ser eficiente quando comparado com o método da microdiluição em caldo. A capacidade do sistema automatizado para proporcionar resultados de CIM é reprodutível, apesar de ter apresentado valores maiores de CIM para alguns isolados que não foram confirmados.

O sistema automatizado VITEK 2 representa uma ferramenta importante na identificação e determinação da susceptibilidade antimicrobiana dentro do ambiente hospitalar, pois a disponibilidade de seus resultados são rápidos, desempenhando um



papel fundamental na terapia. Mas, considerando que o VITEK 2 tem um custo-benefício maior que o CHROMagar *Candida* e que este apresentou resultados tão bons ou melhor do que o sistema automatizado e demonstrou ser um método fácil e preciso para identificação presuntiva das espécies mais comumente encontradas de *Candida*, o seu uso seria uma alternativa útil em centros hospitalares com recursos limitados. Além disso, o uso associado dos resultados de susceptibilidade com os resultados da identificação diminuiria erros durante a terapia antifúngica.

**Agradecimentos**

Agradecemos a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciências e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul (FUNDECT) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e ao Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados (HU-UFGD) e a Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) pelo apoio a pesquisa.

**Conflitos de Interesse**

Não há conflito de interesse a declarar.

## Referências

Ortega M, Marcos F, Soriano A, Almela M, Martínez JÁ, López J, *et al.* *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. *J Hosp Infect.* 2011; 77: 157-161.

Colombo AL, Guimarães T, Camargo LFA, Richtmann R, Queiroz\_Telles F, Salles MJC, *et al.* Tratamento das principais infecções causadas por *Candida* spp.: relato de reunião conjunta de três sociedades médicas. *Braz J Infect Dis.* 2012; 16: 1-42.

Chi HW, Yang YS, Shang ST, Chen KH, Yeh KM, Chang FY, *et al.* *Candida albicans* versus non-*albicans* bloodstream infections: the comparison of risk factors and outcome. *J Microbiol Immunol Infect.* 2011; 44: 369-75.

Mohammadi R, Badiie P, Badali H, Abastabar M, Safa AH, Hadipour M, Yazdani H, Heshmat F. Use of restriction fragment length polymorphism to identify *Candida* species, related to onychomycosis. *Adv Biomed Res.* 2015; 11: 95.

Latouche GN, Daniel HM, Lee OC, Mitchell TG, Sorrell TC, Meyer W. Comparison of use of phenotypic and genotypic characteristics for identification of species of the anamorph genus *Candida* and related teleomorph yeast species. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 3171–3180.

Alam MZ, Alam Q, Jiman-Fatani A, Kamal MA, Abuzenadah AM, Chaudhary AG, Akram M, Haque A. *Candida* identification: a journey from conventional to molecular methods in medical mycology. *World J Microbiol Biotechnol.* 2014; 30: 1437-51.

Charnot-Katsikas A, Tesic V, Boonlayangoor S, Bethel C, Frank KM. Prospective evaluation of the VITEK MS for the routine identification of bacteria and yeast in the clinical microbiology laboratory: assessment of accuracy of identification and turnaround time. *J. Med. Microbiol.* 2014; 63: 235-241.

Melhem MSC, Bertoletti A, Lucca HRL, Silva RBO, Meneghin FA, Szeszs MW. Use of the VITEK 2 system to identify and test the antifungal susceptibility of clinically relevant yeast species. *Braz J Microbiol.* 2013; 44: 1257-1266.

Wang HY, Kim J, Kim S, Park SD, Kim H, Choi HK, Uh Y, Lee H. Performance of PCR-REBA assay for screening and identifying pathogens directly in whole blood of patients with suspected sepsis. *J Appl Microbiol.* 2015; 119: 1433-42.

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109: 6241-6246.

Borghi E, Iatta R, Sciota R, Biassoni C, Cuna T, Montagna MT, Morace G. Comparative Evaluation of the Vitek 2 Yeast Susceptibility Test and CLSI Broth Microdilution Reference Method for Testing Antifungal Susceptibility of Invasive Fungal Isolates in Italy: the GISIA 3 Study. *Clin Microbiol.* 2010; 48: 3153-3157.

Li YL, Leaw SN, Chen JH, Chang HC, Chang TC. Rapid Identification of Yeasts Commonly Found in Positive Blood Cultures by Amplification of the Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003; 22: 693-6.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* 1990; 315-322.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977; 74: 5463-7.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007; 23: 2947-2948.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard M27-A3. 3. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008a.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; 4th informational supplement. CLSI document M27-S4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. (2012).

Vijaya D, Harsha TR, Nagaratnamma T. *Candida* Speciation Using Chromagar. J Clin Diagn Res. 2011; 5: 755–757.

Daef E, Moharram A, Eldin SS, Elsherbiny N, Mohammed M. Evaluation of chromogenic media and seminested PCR in the identification of *Candida* species. Braz J Microbiol. 2014; 45: 255-62.

Rajkumari N, Mathur P1, Xess I, Misra MC. Distribution of different yeasts isolates among trauma patients and comparison of accuracy in identification of yeasts by automated method versus conventional methods for better use in low resource countries. Indian J Med Microbiol. 2014; 32: 391-7.

Massonet CL, Van Eldere J, Vanechoutte M, De Baere T, Verhaegen J, Lagrou K. Comparison of VITEK 2 with ITS2-fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species. J Clin Microbiol. 2004; 42: 2209-11.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiol Rev. 2012; 36: 288-305.

Ochiuzzi ME, Arechavala A, Guelfand L, Maldonado I, Soloaga R. Evaluation of the VITEK 2 system (AST-YSO1 cards) for antifungal susceptibility testing against different *Candida* species. Rev Argent Microbiol. 2014; 46: 111-8.

### **6.1 Anexo 1: Normas para publicação do periódico**

**Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**

**Journal of the São Paulo**

**Institute of Tropical Medicine**

To publish articles dealing with research on different aspects of tropical infectious diseases, provided that data and results are directly linked to human health.

#### **Normas para elaboração do Manuscrito:**

O guia com informações e normas para a elaboração do manuscrito para a publicação encontra-se disponível em:

<http://www.scielo.br/revistas/rimtsp/iinstruc.htm>

## 6.2 Anexo 2: Carta de Submissão

19/02/2016

Mensagem de Impressão do Outlook.com

[Imprimir](#)[Fechar](#)

---

### Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - Manuscript ID RIMTSP-2016-0021

---

De: **onbehalfof+revimtsp+usp.br@manuscriptcentral.com**

Enviada: sexta-feira, 19 de fevereiro de 2016 14:02:42

Para: luanamirelli@hotmail.com

Cc: luanamirelli@hotmail.com; aaraujo.a@hotmail.com; kmpoliveira@hotmail.com

19-Feb-2016

Dear Miss Rodrigues:

Your manuscript entitled "Comparação de diferentes métodos de identificação e perfil de susceptibilidade antifúngica em isolados de *Candida* spp." has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

From 2016 on, the Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine) will be published only on-line, free access.

Your manuscript ID is RIMTSP-2016-0021.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/rimtsp-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/rimtsp-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

Kindly,

Thelma Suely Okay, MD  
Editor-in-Chief

Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo