

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**ESTUDO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE PACIENTES
INTERNADOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE
DOURADOS - MS**

ADRIANA ARAÚJO DE ALMEIDA

**DOURADOS MS
2012**

ADRIANA ARAÚJO DE ALMEIDA

**ESTUDO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE PACIENTES
INTERNADOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE DOURADOS
- MS**

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

Orientadora: KELLY MARI PIRES DE
OLIVEIRA

Co-orientadora: ALEXÉIA BARUFATTI
GRISOLIA

**DOURADOS MS
2012**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD

614.44098171 Almeida, Adriana Araújo de.
A447e Estudo de leveduras isoladas de pacientes
internados no hospital universitário de Dourados-MS /
Adriana Araújo de Almeida. – Dourados, MS : UFGD,
2012.
39 f.

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Mari Pires de
Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) –
Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Infecção hospitalar – Dourados. 2. Candida. 3.
Paciente internado. 4. Hospitais. I. Título.

Agradecimentos

À Deus pela vida, amor e graça infinita concedida a mim. Os Seus planos para minha vida são perfeitos e nunca falham. Obrigada meu Pai por todos os dias me dar força e ânimo para enfrentar as adversidades.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Kelly Mari Pires de Oliveira pelos importantes ensinamentos tanto científicos quanto pessoais, pela amizade, apoio, confiança e credibilidade.

À Prof.^a Dr.^a Terezinha Inez Estivalet Svidzinski por todo carinho, atenção, disponibilidade, ensino, espaço e contribuições dadas para a realização desta pesquisa.

À minha família, a minha base forte! Obrigada por todo amor, carinho, apoio e compreensão. Amo vocês!

Ao meu noivo Gleyson, pelo amor, amizade, incentivo e paciência. Eu te amo!

À minha amiga Quézia pela companhia, amizade, conforto. Muito obrigada por toda ajuda e ânimo nos dias difíceis.

À minha amiga Fabiana, pelos ensinamentos na microbiologia prática, pela atenção, ajuda e amizade.

A minha família de Maringá, pastor Josué, pastora Cleuza, Maeli e Lisandro pelo carinho, apoio e amizade. Muito Obrigada!

As meninas do laboratório de Micologia Médica da UEM: Sayuri, Janine, Patrícia, Cristiane, Adriana, Maria, Elaine, Eliane, Sílvia, Lilian, que de alguma forma me ajudaram. Obrigada pela amizade e carinho.

À todos os meus amigos, pelo apoio, incentivo e momentos de alegria.

Às meninas participantes do projeto de pesquisa, Luana, Danielle, Cintya e Vanessa pela ajuda e amizade.

À Prof.^a Dr.^a Alexéia Barufatti Grisolia e Prof. Dr. Fábio Juliano Negrão por todas as contribuições realizadas neste estudo.

Aos funcionários do SCHI do HU-UFGD: Jonatan Nunes Teixeira, Wanaline Fonseca e Elenice Brandão Cunha Almeida da Cunha pela ajuda dada na busca ativa das leveduras.

Às microbiologistas Flávia Patussi Correia Sacchi e Nathalie Gaebler Vasconcelos do laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados pela ajuda no isolamento das leveduras.

À todos os funcionários do HU-UFGD que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa.

Ao Alex Fraga pelo auxílio nas questões administrativas do Programa de Pós-Graduação Ciências da Saúde.

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

À CAPES pelo apoio financeiro.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

Muito Obrigada!

Dedicatória

Aos meus pais, Celso Alves de Almeida e Nilza Maria Araújo da Silva Almeida.
Obrigada por todos os ensinamentos, palavras de conforto e incentivo e pelo amor incondicional.

Sumário

Agradecimentos	iii
Dedicatória	v
Resumo	vii
Abstract	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Taxonomia e biologia do gênero <i>Candida</i>	3
2.2 Distribuição das espécies de <i>Candida</i> em infecções hospitalares	3
2.3 Principais infecções hospitalares causadas por <i>Candida</i> e seus fatores de risco ..	5
2.4 Importância do diagnóstico e identificação de <i>Candida</i> spp.	6
2.5 Diagnóstico e identificação fenotípica de <i>Candida</i> spp.	6
2.6 Mecanismos de ação dos antifúngicos	8
2.7 Resistência de <i>Candida</i> spp. a drogas antifúngicas	9
3 OBJETIVOS	11
3.1 Objetivo geral	11
3.2 Objetivos específicos	11
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
5 ANEXOS	16
5.1 Artigo	16
5.2 Normas da Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo	30
5.3 Tabelas de dados	34
5.4 Cronograma das atividades de pesquisa realizadas	38
5.5 Aprovação do Comitê de Ética UFGD	39

Resumo

Candida spp. destacam-se como principais responsáveis em infecções fúngicas em hospitais do mundo inteiro. *Candida albicans* ainda é a espécie mais isolada dentro do gênero, porém infecções hospitalares causadas por espécies não-*albicans* tem aumentado nos últimos anos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a distribuição das leveduras isoladas de pacientes internados no hospital universitário de Dourados – MS, bem como identificá-las e avaliar seu perfil de sensibilidade aos antifúngicos. Foram avaliadas leveduras obtidas de pacientes internados no Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados, no centro-oeste do Brasil, no período de junho de 2010 a junho de 2011. Foram incluídas amostras clínicas de sangue, urina, ponta de cateteres, secreções, fezes, escarros e *swabs*. O teste de suscetibilidade antifúngica foi realizado pelo método de microdiluição em caldo e os antifúngicos testados foram: anfotericina B, fluconazol e itraconazol. No período de um ano, foi confirmado o isolamento de leveduras do gênero *Candida* em 63 pacientes internados no hospital. A idade dos pacientes variou de 10 dias a 88 anos, sendo prevalente paciente menor que um ano (28,5%) e maior que 75 anos (17,4%). O sexo feminino foi prevalente (66,1%). 55,5% dos pacientes estavam internados em UTI. Treze pacientes (20,6%) foram a óbito. Foram obtidas 81 leveduras isoladas de 63 pacientes sendo identificadas 43,2% como *C. tropicalis*, 38,2% *C. albicans*, 14,8% *C. glabrata*, 2,4% *C. krusei* e 1,2% *C. parapsilosis*. Houve maior isolamento das leveduras na urina (44,4%) e sangue (16,1%). Das 31 cepas de *C. albicans* estudadas, apenas três obtiveram resistência a fluconazol, enquanto entre as 50 cepas de *C. não-albicans*, 30 foram resistentes a fluconazol, quatro a itraconazol e duas a anfotericina B. 74,2% das cepas de *C. tropicalis* foram resistentes a fluconazol, 5,7% a anfotericina B e 5,7% a itraconazol. Além disso, quatro cepas de *C. tropicalis* foram resistentes a mais de um antifúngico. *Candida tropicalis* foi a espécie mais isolada nas amostras clínicas e que apresentou maior resistência aos antifúngicos testados, dado que diverge de outros trabalhos realizados na região centro-oeste, Brasil e outros países.

Palavras-chaves: *Candida* spp., infecção nosocomial, pacientes hospitalizados.

Abstract

Candida spp. stand out as the main responsible for fungal infections in hospitals worldwide. *Candida albicans* remains the most frequent species within the genus, but nosocomial infections caused by non-*albicans* species has increased in recent years. The present study was aimed to evaluate the distribution of yeasts isolated from patients admitted to the university hospital in Dourados - MS, as well as identify them and assess their sensitivity profile to antifungal agents. Yeasts were assessed from patients hospitalized at Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados, the center-west Brazil, from June 2010 to June 2011. Were included in clinical samples of blood, urine, catheter tip, secretions, feces, sputum and swabs. The antifungal susceptibility testing was performed by the broth microdilution and the antifungal agents tested were: amphotericin B, fluconazole and itraconazole. Within a year, confirmed the isolation of *Candida* species in 63 patients admitted to hospital. The patients' ages ranged from 10 days to 88 years, and prevalent patients less than one year (28.5%) and more than 75 years (17.4%). The female was prevalent (66.1%). 55.5% of patients were admitted to the ICU. Thirteen patients (20.6%) died. We obtained 81 isolates from 63 patients, 43.2% identified as *C. tropicalis*, 38.2% *C. albicans*, 14.8% *C. glabrata*, 2.4% *C. krusei* and 1.2% *C. parapsilosis*. There was a greater isolation of yeasts in urine (44.4%) and blood (16.1%). Of the 31 strains of *C. albicans* studied, only three had resistance to fluconazole, while among the 50 strains of *C. non-albicans*, 30 were resistant to fluconazole, itraconazole and two four amphotericin B. 74.2% of the strains of *C. tropicalis* were resistant to fluconazole, amphotericin B 5.7% and 5.7% to itraconazole. In addition, four strains of *C. tropicalis* were resistant to more than one antifungal agent. *Candida tropicalis* was the species most commonly isolated in clinical samples and that showed resistance to antifungal agents tested, since it differs from other studies conducted in the center-west, Brazil and other countries.

Keywords: *Candida* spp., nosocomial infection, hospitalized patients.

1 INTRODUÇÃO

As infecções hospitalares são uma causa crescente de morbidade e mortalidade em hospitais do mundo todo, por consequência dos avanços tecnológicos relacionados aos procedimentos invasivos para diagnóstico e tratamento, e pelo aparecimento de microrganismos multirresistentes aos antimicrobianos (LEISER et al., 2007).

Estudos realizados no Brasil e no mundo demonstram que as principais infecções são do trato respiratório, da corrente sanguínea e do trato urinário (LEISER et al., 2007; PADRÃO et al., 2010). Essas infecções são causadas principalmente por bactérias e fungos, e são definidas como aquelas adquiridas 72 horas após a admissão dos pacientes e que se manifestam durante a internação, ou após a alta, quando se relacionarem com a internação ou procedimentos hospitalares (BRASIL, 1998).

Nas últimas décadas houve um aumento global de infecções hospitalares de origem fúngica, provavelmente decorrente dos avanços da medicina, como procedimentos invasivos para diagnóstico e tratamento, e o aumento da população de pacientes imunocomprometidos com risco de infecções fúngicas (FRIDKIN, 2005).

Segundo Azie et al. (2012), as leveduras do gênero *Candida* são os principais fungos patogênicos, pois são responsáveis por cerca de 70,0% de todas as infecções fúngicas no ambiente hospitalar. As espécies de *Candida* possuem grande importância clínica pela alta frequência que colonizam e infectam o ser humano, causando desde lesões na mucosa e pele (superficial) até o comprometimento de órgãos, como resultado da disseminação hematogênica da levedura no organismo caracterizando a candidíase invasiva (COLOMBO & GUIMARÃES et al., 2003).

As infecções hospitalares ocasionadas por *Candida* spp. são uma causa crescente de morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados, principalmente aqueles gravemente enfermos e imunocomprometidos. 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).

Espécies de *Candida* são micro-organismos comensais de vários sítios do corpo humano como trato gastrointestinal e respiratório, microbiota vaginal e uretra (ALONSO-VALLE et al., 2003). Porém, podem tornar-se patogênicas quando ocorrem alterações nos

mecanismos de defesa do hospedeiro ou rompimento das barreiras anatômicas, situações comuns em pacientes hospitalizados que recebem a administração de antibióticos e procedimentos médicos invasivos com frequência (DIGNANI et al., 2003).

Estudos realizados no Brasil e no mundo sobre a epidemiologia de infecções causadas por espécies de *Candida*, relatam que *C. albicans* é a espécie com maior frequência de isolamento dentro do gênero. Porém, nas últimas décadas houve um aumento de infecções hospitalares causadas por espécies de *Candida* não-*C. albicans* (CNCA), como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (CHI et al, 2011; COLOMBO et al., 1999; ORTEGA et al., 2011). A ocorrência de infecções causadas por estas leveduras é 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 administrados no ambiente hospitalar (SHMALRECK et al., 2012; TORTORANO et al., 2012).

Desta forma, são relevantes estudos que visem o conhecimento das espécies de *Candida* isoladas de pacientes hospitalizados, bem como avaliar a suscetibilidade antifúngica para controle e prevenção de infecções fúngicas no ambiente hospitalar.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Taxonomia e biologia do gênero *Candida*

O gênero *Candida* pertence ao reino *Fungi*, divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Blastomycetes*, ordem *Cryptococcales* e família *Cryptococcacea*. Atualmente, o gênero abrange cerca de 200 espécies que podem ser encontradas em diversos ecossistemas, como solo, alimentos, água e como comensal no ser humano e animais (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010).

São micro-organismos unicelulares, eucarióticos, heterotróficos e degradam proteínas e carboidratos para obterem carbono e nitrogênio, elementos essenciais para seu desenvolvimento. São capazes de se desenvolver tanto na presença de oxigênio quanto em anaerobiose. A reprodução das leveduras do gênero *Candida*, na maioria das vezes, é de forma assexuada, mas algumas espécies se multiplicam sexuadamente. Algumas espécies têm a propriedade de formar estruturas filamentosas, como hifas e pseudo-hifas (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010).

Em torno de 10% das leveduras do gênero *Candida* são de interesse médico. Dentre elas, as principais espécies são: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* (YARROW, 1998). São microrganismos 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).

2.2 Distribuição das espécies de *Candida* em infecções hospitalares

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).

Estudos realizados no Brasil e no mundo sobre a epidemiologia de infecções causadas por espécies de *Candida*, relatam que *C. albicans* é a espécie com maior frequência de isolamento dentro do gênero. Porém, nas últimas décadas houve um aumento de infecções hospitalares causadas por espécies de *Candida* não-*C. albicans* (CNCA), como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (CHI et al, 2011; COLOMBO et al., 1999; ORTEGA et al., 2011).

Pesquisas sobre a distribuição de *Candida* spp. em casos de candidemia realizados nos Estados Unidos, Europa e Ásia, descrevem a prevalência de *C. albicans* com mais de 50% dos isolados, porém o isolamento de espécies CNCA como *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* é crescente em infecções invasivas (CHI et al., 2011; EDMOND et al. 1999; TORTORANO et al., 2004; WISPLINGHOFF et al., 2004).

Yamamoto et al. (2012), realizaram um estudo sobre a epidemiologia e as características de *Candida* spp. isoladas em hospital universitário de Cuiabá, Mato Grosso, na região centro-oeste do Brasil e obtiveram 110 cepas de *Candida* isoladas de 91 pacientes. 39,0% das leveduras isoladas foram da espécie *C. albicans*, 32,7% *C. tropicalis*, 21,8% *C. parapsilosis*, 5,4% *C. glabrata* e 0,9% *C. krusei*. O que demonstrou a ocorrência de 60,9% de candidíases ocasionadas por espécies CNCA. Outro estudo realizado na mesma região por Chang et al. (2008), mostrou que 54,2% dos casos de candidemia foram causados por CNCA em hospital universitário de Campo Grande, capital do estado de Mato Grosso do Sul. Outros achados no país também mostraram a prevalência de CNCA sobre a *C. albicans* em amostras clínicas de pacientes internados, como o de realizado por Furnaleto et al. (2011) que verificaram a distribuição de espécies de *Candida* isoladas em hospital universitário de Londrina, Paraná. Estes autores isolaram 208 cepas de *Candida* spp. de diferentes amostras clínicas, sendo as principais espécies isoladas *Candida albicans* (36,0%), *C. tropicalis* (33,2%) e , *C. parapsilosis* (19,2%). Estas leveduras foram isoladas principalmente de urina, sangue e secreção traqueal.

Outros estudos realizados no Brasil demonstram a frequência de espécies CNCA maior que *C. albicans*. Hinrichsen et al. (2009) realizaram um estudo em 746 pacientes internados em hospitais terciários. Foram obtidas 1279 isolados de *Candida* spp.: 367 *C. albicans*, 363 *C. tropicalis*, 147 *C. parapsilosis*, 81 *C. glabrata*, 30 *C. krusei* e 14 *C. guilliermondii*. Em candidemias, *C. tropicalis* (33,5%) e *C. parapsilosis* (33,5%) foram as

espécies mais isoladas seguidas de *C. albicans* (18,5%). Em candidúrias e secreções traqueais, *C. albicans* foi prevalente seguida de *C. tropicalis*.

2.3 Principais infecções hospitalares causadas por *Candida* e seus fatores de risco

Entre as infecções invasivas causadas por espécies de *Candida*, estudos realizados sobre a candidemia relatam que hospitais terciários dos Estados Unidos e da Europa apresentam incidências menores que um caso de candidemia por 1000 internações, enquanto no Brasil, estudos recentes mostraram taxas de incidência elevadas de 1,27 a 3,9 casos por 1000 internações (WISPLINGHOFF et al., 2004; HINRICHSEN et al., 2008). Além disso, Marra et al. (2011) realizaram um estudo multicêntrico de infecções da corrente sanguínea em hospitais brasileiros e verificaram que entre os patógenos fúngicos, *Candida* spp. foram os principais agentes.

Entre pacientes hospitalizados com risco para adquirir a infecção na corrente sanguínea causada por *Candida*, estão aqueles com neutropenia, submetidos à cirurgia gastrointestinal, prematuros e acima de 65 anos de idade. Os principais fatores de risco para a infecção são: uso de cateteres intravasculares, nutrição parenteral, antibióticos de amplo espectro, cirurgia prévia e hemodiálise. (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003). Estas infecções estão associadas à internação prolongada (três a 30 dias), alta taxa de mortalidade (10,0% a 49,0%) e elevado custo hospitalar (KAUFFMAN, 2006). Em relação à distribuição das espécies, *C. albicans* é considerada a espécie mais isolada em hemoculturas, mas espécies não-*albicans* como, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, estão sendo frequentemente isoladas (DAS et al., 2011; MOTTA et al., 2010; SPILIOPOULOU et al., 2011).

Infecções hospitalares do trato urinário causadas por *Candida* spp. estão se tornando cada vez mais frequentes em pacientes internados, sendo responsáveis por 10 a 15% de todas as infecções urinárias (BUKHARY, 2008). Episódios de candidúria 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 et al. (2012), relataram que recém-nascidos com peso extremamente baixo podem ter risco significativo de morte associados a ocorrência de candidúria. Além disso, a candidúria pode ser considerada um fator de risco para candidemia em pacientes adultos (GÜRCÜOĞLU et al.,

2010). Alguns dos fatores de risco para infecções no trato urinário ou episódios de candidúria (presença de *Candida* spp. na urina) 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, aumento da idade e sexo feminino (ACHKAR et al., 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* (KAULFMAN, 2005).

2.4 Importância do diagnóstico e identificação de *Candida* spp.

Ainda hoje, pouco se sabe sobre as características epidemiológicas de espécies de CNCA. Segundo Miceli et al. (2011), a epidemiologia das infecções fúngicas está crescendo rapidamente e espécies de CNCA e outras leveduras raras têm emergido como principais patógenos oportunistas. A ocorrência dessas espécies é crescente, embora existam variações de acordo com a região demográfica, com as características do grupo de indivíduos estudado, com o sítio e as causas da infecção (PFALLER & DIEKEMA, 2002).

Estudos recentes descrevem a ocorrência de sensibilidade diminuída para azóis entre espécies não-*albicans* como *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (FURNALETO et al., 2011; SHMALRECK et al., 2012; TORTORANO et al., 2011). Além disso, o uso crescente de anfotericina B em hospitais tem sido associado com o aparecimento de CNCA resistentes a droga, principalmente *C. glabrata*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii* (COLLIN et al., 1999).

Portanto, o diagnóstico laboratorial correto das espécies envolvidas nas infecções de *Candida* tem interesse não só epidemiológico, mas também clínico, sendo importante pela significância prognóstica e terapêutica, permitindo o tratamento antifúngico precoce e correto e o reconhecimento de surtos (COLOMBO & GUIMARÃES, 2007).

2.5 Diagnóstico e identificação fenotípica 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

dextrose, onde são caracterizadas por colônias de aspecto cremoso, às vezes mucóides, com variações de tons do branco ao creme (LACAZ et al., 2002).

Para o isolamento das espécies, é realizado o cultivo em CHROMagar *Candida*® que é um meio cromogênico que possibilita uma triagem das espécies do gênero *Candida* e também diferencia culturas mistas. O princípio deste meio é a produção de cor nas colônias por reações enzimáticas. Diferentes espécies produzem cores diferentes, permitindo assim a detecção direta em placa de isolamento. As colônias de *C. albicans* crescem com uma cor verde-claro a verde médio, as de *C. tropicalis* crescem azuis esverdeadas a azul metalizado e as de *C. krusei* crescem cor-de-rosa claro com um rebordo esbranquiçado. 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, outras provas são necessárias para a confirmação e identificação das espécies de *Candida*, como a produção de tubo germinativo, análise da micromorfologia, assimilação e fermentação de carboidratos (Tabela 1). Essas provas fazem parte dos métodos fenotípicos tradicionais para a identificação de leveduras usadas em laboratórios do mundo todo, considerados métodos clássicos e padrão ouro para essa finalidade (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010).

Tabela 1. Características microbiológicas e bioquímicas das principais espécies de *Candida*.*

Espécies de <i>Candida</i>	Microbiologia			Bioquímica ¹											
	Hifas	Pseudohifas	Tubo germinativo	GLU	GAL	LAC	MAL	SUC	MELI	CEL	TRE	RAF	MEL	UREASE	KHO ₃
<i>C. albicans</i>	+	+	+	FA	AF±	-	FA	A	-	-	AF±	-	A±	-	-
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	FA	-	-	-	-	-	-	A±	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	+	-	AF±	A	-	A	AF±	-	-	AF±	-	A	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	-	FA	FA	-	FA	FA	-	A±	FA	-	A	-	-

* Baseado em Negri et al. (2011).

¹ Análises bioquímicas: fermentação e assimilação na fonte de uma fonte de carbono, como glicose (GLU), galactose (GAL), lactose (LAC), maltose (MAL), sacarose (SUC), melibiose (MELI), celobiose (CEL), trealose (TRE), rafinose (RAF), melesitose (MEL). Hidrólise da uréia (uréase) e assimilação de KHO₃.

+ positivo; - negativo; FA fermentação e assimilação positiva; A assimilação positiva; A± assimilação variável; AF± assimilação positiva com fermentação variável.

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 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).

C. dublinienses é uma espécie que possui dificuldades na sua identificação, pois possui características morfológicas, fenotípicas, bioquímicas e virulência similares à *C. albicans* (SULLIVAN et al., 1999). Portanto, são propostos novos métodos fenotípicos para a diferenciação das duas espécies, como crescimento em temperatura a 45°C, onde apenas *C. albicans* consegue manter seu crescimento, alguns meios de cultura para a distinção das espécies, como caldo Sabouraud hipertônico, ágar tabaco e ágar arroz (PASLIGH et al., 2010; SILVEIRA-GOMES et al., 2011). Entretanto, para a confiabilidade do resultado, ainda é requerido testes genotípicos para a confirmação da espécie.

2.6 Mecanismos de ação dos antifúngicos

O tratamento de infecções sistêmicas causadas por *Candida* spp. pode ser realizado com um número de drogas antifúngicas limitado. 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, um esterol importante da membrana plasmática fúngica, que é análogo ao colesterol em células de mamíferos. O ergosterol contribui para a variedade das funções celulares, sendo importante para a fluidez e a integridade da membrana e para o bom funcionamento de muitas enzimas ligadas à membrana (WHITE et al., 1998).

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 morte celular rápida. Nistatina é o agente antifúngico mais tóxico dentro da classe, 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 (ASHLEY 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).

Em 2001, foi introduzida outra classe de antifúngicos, as equinocandinas. O mecanismo de ação desta classe é a inibição da produção de (1→3)-β-D-glucana, um componente essencial da parede celular fúngica, o que garante a seletividade da ação já que a parede celular está presente no fungo e não em mamíferos. 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. Entre as equinocandinas, 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 (ASHLEY et al., 2006).

2.7 Resistência de *Candida* spp. a drogas antifúngicas

Nos últimos anos, estudos relatam com maior frequência, o isolamento de espécies de *Candida* com sensibilidade diminuída ou resistentes aos antifúngicos. A resistência destas leveduras pode ser clínica ou *in vitro*. A resistência clínica pode ocorrer devido ao baixo nível do fármaco no tecido e no sangue, à interação entre os fármacos ou à imunodepressão do paciente. Já a resistência *in vitro* pode ocorrer quando isolados suscetíveis se transformam em resistentes devido ao contato prévio com o antifúngico. (ZARDO & MEZZARI, 2004). Ainda existe a resistência intrínseca, aquela que está

presente nas características naturais do microrganismo, como é o caso da *C. krusei* que é intrinsecamente resistente a fluconazol (COLEMAN et al., 1998).

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 causadas 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).

Estudos realizados por França et al. (2008), Dota et al. (2008) e Furnaleto et al. (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*. Autores acreditam que a resistência de *Candida* spp. ao antifúngico pode se desenvolver em pacientes imunocomprometidos e pacientes com câncer. 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 (WHITE et al., 1998).

Deste modo, a realização dos testes de suscetibilidade a antifúngicos é necessária para que o tratamento antifúngico seja conduzido de maneira segura, correta e eficaz. Adicionalmente, é relevante o desenvolvimento de estratégias direcionadas a disseminação da resistência aos antifúngicos entre os fungos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a distribuição e o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos de espécies de *Candida* isoladas de pacientes internados no Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados – Dourados/MS.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar fenotipicamente ao nível de espécie as leveduras do gênero *Candida* dos isolados clínicos.
- Correlacionar a distribuição das espécies encontradas com a origem dos isolados.
- Analisar as características dos pacientes com amostras clínicas positivas para *Candida* spp.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abi-Said D, Anaisse E, Uzun O, Raad I, Pinzcowski H, Vartivarian S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. Clin Infect Dis. 1997; 24: 1122-1128.

Achkar JM, Fries BC. *Candida* infections of the genitourinary tract. Clin Microbiol Rev. 2010; 23: 253-227.

Alonso-Valle H, Acha O, García-Palomo JD, Fariñas-Alvarez C, Fernández-Mazarrasa C, Fariñas MC. Candidemia in tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2003; 22: 254-257.

Ashley, E. S. D. et al. Pharmacology of systemic antifungal agents. Clin Infect Dis. 2006; 43: 28-39.

Brasil, M. D. Portaria n. 2.616. In: SAÚDE, M. D. (Ed.). Diário Oficial. Brasília; 1998.

Chang MR, Correia FP, Costa LC, Xavier PCN, Palhares DB, Taira DL, Paniago AMM, Pontes ERJC, Machado VE. *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2008; 50:265-268.

Chi HW, Yang YS, Shang ST, Chen KH, Yeh KM, Chang FY, Lin JC. *Candida albicans* versus non-*albicans* bloodstream infections: The comparison of risk factors and outcome. J Microbiol Immun Infect. 2011; 44: 369-375.

Coleman DC, Rinaldi MG, Haynes KA, et al. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. Med Mycol. 1998; 36: 156-165.

Collin B, Clancy CJ, Nguyen MH. Antifungal resistance in non-*albicans Candida* species. Dru Resist Updat. 1999; 2: 9-14.

Colombo A L, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. Rev Soc Bras Med Trop. 2003; 36: 599-607.

Colombo, A. L.; Guimarães, T. Candidúria: uma abordagem clínica e terapêutica. Rev Soc Bras Med Trop. 2007; 40: 332-337.

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: 759-763.

Dota KFD, Shinobu CS, Patussi EV, Consolaro MEL, Svidzinski TIE. Susceptibilidade de levaduras vaginales a los antifúngicos más utilizados em Maringá, Paraná, Brasil. Acta Bioq Clin Latinoamericana. 2008; 42: 561-566.

Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis*. 1999; 29: 239-244.

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 suscetibilidade aos antifúngicos. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 41: 23-28.

Furlaneto MC, Rota JF, Quesada RM, Furlaneto-Maia L, Rodrigues R, Oda S, Oliveira MT, Serpa R, França EJ. 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: 595-599.

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

Hinrichsen SL, Falcão E, Vilella TAS, Colombo AL, Nucci M, Moura L, Rêgo L, Lira C, Almeida L. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 41: 394-398.

Hinrichsen SL, Falcão E, Vilella TAS, 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: 325-328.

Kauffman, C. A. Fungal infections. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2006; 3: 35-40.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. *Tratado de micologia médica: Lacaz (9ª ed.)*. São Paulo, Sarvier, 2002.

Leiser, J. J.; Tognim, M. C. B.; Bedendo, J. Infecções hospitalares em um centro de terapia intensiva de um hospital de ensino no norte do Paraná. *Ciência, Cuidado e Saúde*. 2007; 6: 181-186.

Marinho SA, Teixeira AB, Santos OS, Cazanova RF, Ferreira CAS, Cherubini K, Oliveira SD. Identification of *Candida* spp. by phenotypic tests and PCR. *Braz J Microbiol*. 2010; 41: 286-294.

Miceli MH, Díaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis*. 2011; 11: 142-151.

Motta AL, Almeida GMD, Almeida Júnior JN; Burattini MN; Rossi F. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. *Braz J Infect Dis*. 2010; 14: 441-448.

Moura MEB, Campelo SMA, Brito FCP, Batista OMA, Araújo TME, Oliveira ADS. Infecção hospitalar: estudo de prevalência em um hospital público de ensino. *Rev Bras Enfer*. 2007; 60: 416-421.

Padrão MC, Monteiro ML, Maciel NR, Viana FFCF, Freitas NA. Prevalência de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva. *Rev Bras Clin Med.* 2010; 8: 125-128.

Pasligh J, Radecke C, Fleischhacker M, Ruhnke M: Comparison of phenotypic methods for the identification of *Candida dubliniensis*. *J Microbiol Immunol Infect* 2010; 43:147–154.

Pfaller MA, Diekema DJ. Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 3551-3557.

Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ, Messer SA, SENTRY participant group. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and *in vitro* susceptibilities to fluconazole, ravuconazole and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 3254-3259.

Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROM agar *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.

Schmalreck AF, Willinger B, Haase G, Blum G, Lass-Flörl C, Fegeler W, Becker K, Antifungal Susceptibility Testing (AFST) Study Group. Species and susceptibility distribution of 1062 clinical yeast isolates to azoles, echinocandins, flucytosine and amphotericin B from a multi-centre study. *Mycoses.* 2012.

Silveira-Gomes F, Sarmiento DN, Espírito-Santo EPT, Souza NO, Pinto TM, Marques-da-Silva SH. Differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* using hypertonic Sabouraud broth and tobacco agar. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 44:457-460.

Spiliopoulou A, Dimitriou G, Jelastopulu E, Giannakopoulos I, Anastassiou ED, Christofidou M. Neonatal Intensive Care Unit Candidemia: Epidemiology, Risk Factors, Outcome, and Critical Review of Published Case Series. *Mycopathologia.* 2011.

Sullivan DJ, Moran G, Donnelly S, Gee S, Pinjon E, McCartan B, et al. *Candida dubliniensis*: An update. *Rev Iberoam Micol* 1999; 16:72-76.

Thompson GR, Cadena J, Patterson TF. Overview of antifungal agents. *Clin Chest Med.* 2009; 30: 203–215.

Tortorano AM, Pen J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O, Biraghi E, Canton E, Zimmermann K, Senton S, Grillot K, ECMM Working Group on Candidaemia. 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: 317-322.

White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, Cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11: 382–402.

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24.179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 39: 309-317, 2004.

Yamamoto ACA, Paula CR, Dias LB, Tadano T, Martins ERM, Amadio JVRS, Hahn RC. Epidemiological and clinical characteristics of nosocomial candidiasis in university hospitals in Cuiabá – Mato Grosso, Brazil. *Rev Iberoam Micol.* 2012.

Yarrow, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. New York: Elsevier; 1998.

Zardo V. Mezzari A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida* sp. *NewsLab.* 2004; 63: 136-146.

5 ANEXOS

5.1 Artigo

Antifungal susceptibility and distribution of *Candida* spp. isolates in the University Hospital of Mato Grosso do Sul State, Brazil

**Adriana Araújo de ALMEIDA(1), Cristiane Suemi Shinobu MESQUITA(2),
Terezinha Inez Estivalet SVIDZINSKI(2), Kelly Mari Pires de OLIVEIRA(1)**

ABSTRACT

Hospital infections caused by *Candida* spp. are an increasing cause of morbidity and mortality in hospitalized patients, especially the critically ill or immunocompromised. The present study analyzed the distribution of *Candida* species in the University Hospital of the Federal University at Grande Dourados and evaluated their *in vitro* susceptibility to antifungal drugs. The yeasts were identified phenotypically using classical methodologies. Antifungal susceptibility tests were undertaken using the broth micro-dilution technique and antifungal agents tested were amphotericin B and fluconazole. We analyzed yeast isolates from urine (62.0%), blood (24.0%), and tracheal secretions (14.0%). The *Candida* species encountered were: *C. tropicalis* (42.0%), *C. albicans* (36.0%), *C. glabrata* (20.0%), and *C. krusei* (2.0%). The antifungal susceptibility tests demonstrated that *C. albicans* was sensitive to both antifungal agents tested. However, 31.2% of the isolates that were non-*C. albicans* *Candida* demonstrated dose-dependent susceptibility to fluconazole and 3.1% were resistant to amphotericin B. Our results differed from previously published works and demonstrated that *C. tropicalis* was the most commonly isolated yeast species

(1) Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Biological and Environmental Sciences, Federal University at Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil.

(2) Laboratory of Medical Mycology, Department of Clinical Analyses, State University at Maringá, Maringá, PR, Brazil.

Correspondence to: Kelly Mari Pires de Oliveira, Rodovia Dourados-Ithaum, km 12, 79804-970, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil.

E-mail: kellyoliveira@ufgd.edu.br

among hospital patients as well as the importance of species-level identifications for instituting correct antifungal therapies in light of the predominance of non-*C. albicans* *Candida* infections.

KEYWORDS: *Candida*, Candiduria, Candidemia

INTRODUCTION

There have been global increases in fungal hospital infections (HI) in recent decades, probably reflecting advances in medical practices such as the increasing use of invasive procedures for diagnosis and treatment as well as the increasing numbers of immunocompromised patients at high risk for fungal infections¹³.

According to Azie *et al.* (2012)³, yeasts of the genus *Candida* are responsible for approximately 70% of all hospital-environment fungal infections. *Candida* species are therefore of enormous clinical importance because of the high frequencies at which they colonize and infect humans and cause diseases ranging from lesions in the mucous membranes and skin (superficial) to infections in body organs (and their resulting dissemination through the bloodstream, characterizing invasive candidemia)⁸.

Candida spp. are commensal micro-organisms that inhabit various sites in the human body (including the gastrointestinal and respiratory tracts) and they make up part of the vaginal and urethral microbiota¹. These micro-organisms can become pathogenic, however, as result of alterations in host defense mechanisms or breakdowns of anatomical barriers in the body – situations that are common in hospitalized patients who receive antibiotics or undergo frequent invasive procedures¹¹.

HI attributed to *Candida* spp. have been responsible for increases in the morbidity and mortality in hospitalized patients especially the critically ill or immunocompromised. The origins of these infections can be endogenous (due to yeast proliferation or dislocation) or exogenous (by transmission of these micro-organisms from the hospital environment through contact with health workers)⁸.

Studies undertaken in Brazil that have focused on the epidemiologies of infections caused by *Candida* species have reported that *C. albicans* is the most frequently isolated species of the genus. There have been, however, increases in HI caused by non-*C. albicans* *Candida* (NCAC) species such as *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, and *C. krusei*^{5,10,20}. The occurrence of infections caused by these yeasts is relevant to the vigilance

of HI as these micro-organisms have virulence attributes and their profiles of antifungal drug sensibilities are variable, with recent reports of resistance to the principal antifungal drugs currently administered in hospitals^{23,27}.

Amphotericin B and fluconazole are among the antifungal agents most widely utilized in treating systemic fungal infections. The former is an efficient polyene antifungal agent, although its use is limited due to its high degree of toxicity in humans. The latter compound is a triazole frequently prescribed to treat *Candida* spp. infections due to its excellent patient tolerance and minimal collateral effects² – although a number of species of *Candida* demonstrate fluconazole resistance^{14,21} and the growing worldwide use of this drug to treat candidemia is one of the principal causes of increases in NCAC species in recent years¹⁵.

Considering the importance of recognizing *Candida* species involved in HI, and their growing resistance to antifungal agents, the present study analyzed the distributions of *Candida* species in the University Hospital of the Federal University at Grande Dourados and evaluated their *in vitro* susceptibility to antifungal drugs.

MATERIALS and METHODS

Clinical samples: We evaluated clinical samples from patients being treated in the University Hospital of the Federal University at Grande Dourados in central-western Brazil during the period between June/2010 and June/2011. This hospital has 197 beds, including 32 in the Intensive Care Unit (ICU). The following information about the patients was gathered: sex, age, the hospital ward where the patient was being treated when the infectious agent was identified, as well as any mortalities.

The clinical samples tested for *Candida* species included urine, blood, and tracheal secretions. The samples were cultivated following standard procedures described in the literature. Cultures from urine samples were considered significant at concentrations above 10⁵ colony-forming units per milliliter (CFU/mL).

Species identifications: The yeasts were isolated and initially identified using CHROMagar *Candida*® (Difco). The isolates were firmly identified based on their microscopic, macroscopic, and biochemical characteristics as described by classical methodologies, including colony morphology, the production of germinative tubes, micro-morphological analyses, and tests of carbohydrate assimilation and fermentation³¹.

Tests of antifungal susceptibility: Yeast isolate susceptibility to antifungal agents was determined by the broth micro-dilution method, following the norms of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), document M27-A3⁶. The antifungal agents tested were amphotericin B (Squibb Pharmaceutical) and fluconazole (Pfizer Inc).

The yeasts were pre-cultured in Sabouraud Dextrose (Difco) agar at 35 °C for 24 hours. Suspensions were prepared in sterile saline solutions (0.85%) with yeast concentrations adjusted to 0.5 to 2.5 x 10³ CFU/mL. RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) culture media was used, buffered with 3 morpholinopropanesulfonic acid (Sigma-Aldrich) pH 7.0, and supplemented with 2% glucose.

Each microplate well (Nunclon, Delta, Nunc A/S, Roskilde, Denmark[®]) contained 100 µL of inoculant and one of the 10 antifungal agent concentrations tested; the cultures were incubated at 35 °C for 48 hours. All tests were performed in triplicate. A standard strain of *C. parapsilosis* ATCC 22019 was used as a control in the tests. The microplates were analyzed using an Expert plus - ASYS[®] analyzer (at 490 nm).

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for fluconazole was defined as the lowest concentration of that compound that could reduce fungal growth by 50%; the MIC of amphotericin B was considered as the lowest concentration of that compound that could impede any visible yeast growth when compared to positive controls (those without added drugs).

The cut-off levels of susceptibility to fluconazole were utilized according to supplement M27-S3⁷, which determined values of MIC ≤ 8 µg/mL as sensitive, 16-32 µg/mL as sensitive dose-dependent (SDD), and ≥ 64 µg/mL as resistance. This document did not consider amphotericin B, so the susceptibility references levels established by Yang *et al.* (2008) were used³⁰: values of MIC ≤ 1 µg/mL were considered sensitive; and ≥ 2 µg/mL as resistant.

RESULTS

A total of 50 *Candida* isolates were obtained from hospitalized patients during the study period, with the following species distributions: *C. tropicalis* 42.0% (n=21); *C. albicans* 36.0% (n=18); *C. glabrata* 20.0% (n=10); and *C. krusei* 2.0% (n=1).

As can be seen in Table 1, yeasts were more frequently isolated from women (70.0%) and from ICU patients (58.0%). Mortality was recorded in 18.0% of the patients. *Candida* infections were most common in patients older than 61 (46.0%) and in those between 41-50 (16.1%). Similar profiles were observed in patients with yeasts in their tracheal secretions.

Table 1 - Characteristics of the patients providing positive clinical samples of *Candida* spp.

Characteristics	Clinical samples ^a			Total (n=50)
	Urine (n=31)	Blood (n=12)	Tracheal secretions (n=7)	
Sex (M/F) ^b	(29.0/71.0)	(41.6/58.4)	(14.3/85.7)	(30.0/70.0)
Age ^{b,c}	≤ 1 (13.0)	≤ 1 (58.4)	21 – 30 (14.3)	≤ 1 (22.0)
	21-30 (3.2)	2-10 (25.0)	≥ 61 (85.7)	2-10 (6.0)
	31-40 (6.5)	11-20 (8.3)		11-20 (2.0)
	41-50 (16.1)	≥ 61 (8.3)		21-30 (4.0)
	51-60 (9.6)			31-40 (4.0)
	≥ 61 (51.6)			41-50 (10.0) 51-60 (6.0) ≥ 61 (46.0)
Internation site ^b	ICU (54.8)	ICU (58.4)	ICU (71.4)	ICU (58.0)
	General ward (42.2)	General ward (33.3)	General ward (28.6)	General ward (40.0)
		ICU (8.3)		ICU (2.0)
Deaths ^b	22.5	16.6	-	18.0

M: male, F: female, ICU: Intensive Care Unit, CIU: Intermediate Care Unit, ^anumbers of isolates according to specimen sample, ^bvalues in parentheses expressed as percentages, ^cin years.

It can be seen in Table 2 that the species most commonly isolated from urine was *C. tropicalis* (38.8%), followed by *C. albicans* (29.0%), *C. glabrata* (29.0%), and *C. krusei* (3.2%). Among isolates derived from blood, *C. albicans* (66.6%) was predominant, while *C. tropicalis* was the yeast species most frequently isolated (71.4%) from tracheal secretions.

Table 2 - Distribution of *Candida* species isolates in clinical samples obtained from hospital patients.

Species	Clinical samples*			Total
	Urine	Blood	Tracheal secretions	
<i>C. tropicalis</i>	12 (38.8)	4 (33.4)	5 (71.4)	21 (42.0)
<i>C. albicans</i>	9 (29.0)	8 (66.6)	1 (14.3)	18 (36.0)
<i>C. glabrata</i>	9 (29.0)	-	1 (14.3)	10 (20.0)
<i>C. krusei</i>	1 (3.2)	-	-	1 (2.0)
Total	31 (62.0)	12 (24.0)	7 (14.0)	50

*Numbers in parentheses expressed as percentages of isolates.

The MICs for amphotericin B varied from 0.125 to >16 µg/mL; and from 0.25 to >64 µg/mL for fluconazole. MICs capable of inhibiting between 50% and 90% of the growth of isolates of each species are presented in Table 3.

Table 3 –Variations in MIC, MIC₅₀ and MIC₉₀ of the isolates of *Candida* spp.

Species (numbers of isolates)	MIC values (µg/mL)					
	Amphotericin B			Fluconazole		
	Variation	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Variation	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>C. tropicalis</i> (21)	0.125- >16	0.5	1	0.25-16	1	2
<i>C. albicans</i> (18)	0.25-0.5	0.25	0.5	0.25-32	0.25	0.5
<i>C. glabrata</i> (10)	0.25-1	0.5	1	16->64	32	32
<i>C. krusei</i> (1)	1	1	1	32	32	32

MIC: Minimum Inhibitory Concentration, **MIC₅₀** and **MIC₉₀**: lowest concentration capable of inhibiting growth in 50% and 90% of the isolates respectively.

All of the *C. albicans* isolates were sensitive to amphotericin B, and 94.5% were sensitive to fluconazole. Among all of the samples of *C. tropicalis*, only one demonstrated resistance to amphotericin B (MIC = >16 µg/mL), and one was SDD to fluconazole (MIC = 16 µg/mL); the other isolates were sensitive to both antifungal drugs. All of the isolates of the species *C. glabrata* and *C. krusei* were sensitive to amphotericin B, but demonstrated high MICs upon exposure to fluconazole (Table 4).

Table 4 - Antifungal susceptibility profile of *Candida* species isolated from clinical samples.

Species	Samples	Antifungal agents*				
		Amphotericin B		Fluconazole		
		S	R	S	SDD	R
<i>C. tropicalis</i>	21	20	1	20	1	0
<i>C. albicans</i>	18	18	0	17	1	0
<i>C. glabrata</i>	10	10	0	0	8	2
<i>C. krusei</i>	1	1	0	0	1	0
Total	50	49	1	37	11	2

S: sensitive, **SDD:** dose-dependent sensibility, **R:** resistant.

*Number of isolates.

DISCUSSION

Fungal infections are frequent complications for hospitalized patients. *Candida* spp. infections have increased in the last few decades, principally those caused by NCAC species, which indicates the importance of laboratory diagnoses to correctly identify the species involved and to be able to initiate precocious and adequate treatments⁸.

The data presented here considered the factors of age, sex, and the hospital units where the patients were infected, and were similar to previous reports by other researchers. Furnaleto *et al.* (2011)¹⁴ observed that infections caused by *Candida* spp. were more frequent in older people (> 61 years), those less than one-year-old, and among ICU patients^{4,29}.

HI are more frequent and can often be more serious in older patients due to factors related to aging itself, the underlying illness, and to hospitalization time; the death rate from candidemia, however, is greatest among young patients¹⁶. The occurrence of *Candida* spp. infections in small children often involves the colonization of their mucous membranes or skin, which puts them at risk for invasive illnesses caused by alterations in their host-parasite equilibrium¹⁸. Infections caused by *Candida* among female patients (principally candiduria) can often be associated with the presence of *Candida* spp. in the vaginal microbiota. The high infection percentages of ICU patients is directly related to their exposure to risk factors for fungal infection, including: previous utilization of antibiotics; invasive procedures such as use of central venous catheters; prolonged

hospitalization times; and debility due to the underlying causes for their original hospitalization²⁵.

Studies have demonstrated apparent reductions in infection rates caused by *C. albicans* in recent decades, but increases in infections caused by NCAC²⁰ – which corroborate the results of the present study, as *C. albicans* represented only 36.0% of the isolates, while the other NCAC (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, and *C. krusei*) represented the large majority (64.0%). These results are similar to other studies undertaken recently in central-western Brazil. Yamamoto *et al.* (2012)²⁹ reported finding 39.0% *C. albicans* isolates in Cuiabá-MT; other reports from the same country demonstrated a predominance of NCAC over *C. albicans* in clinical samples isolated from hospitalized patients^{14,17}.

According to our results, *C. tropicalis* was the most frequently isolated species in hospitalized patients (42.0%), which differed from the results of studies undertaken in other parts of the world, where *C. albicans* usually predominates hospital infection rates. *C. tropicalis* was the fourth most frequent *Candida* species isolated in cases of candidemia in the United States²⁸ and the third most frequent in Spain²⁰ and Asia⁵. In Brazil, a number of studies have indicated *C. tropicalis* as the second most frequent isolate in cases of candidemia among hospitalized patients^{14,17,29}.

In the present study, *C. albicans* was the most frequent species (66.6%) among cases of candidemia, a result very similar to reports from the United States, Europe, and Brazil^{9,12,26}. Differing results, however, were found in the University Hospital of Mato Grosso do Sul state by Chang *et al.* (2008)⁴ who reported the presence of *C. albicans* in 45.8% of the candidemia infections examined. This infection is difficult to diagnose as it does not have any specific symptomatology and gives only low positive results in blood cultures – which facilitates its dissemination to other organs, resulting in the worsening of the clinical situation of the patient, the prolonged administration of medicines, and high hospital costs²¹. Cases of candidemia were more frequently observed in children less than one-year-old.

A high sensitivity of *C. albicans* to antifungal agents was observed, corroborating other published works^{5,14,22}. As can be seen in Table 4, among the NCAC species (n=32): 31.2% of the isolates demonstrate SDD to fluconazole, and 3.1% of them were resistant to amphotericin B (which corroborates published reports of high resistance of these species to antifungal agents)^{21,23}. None of the isolates of *C. glabrata* were sensitive to fluconazole,

although 80.0% were SDD and 20.0% were resistant, in agreement with the findings of other authors who described the low sensibility of this species to triazol^{19,24}.

The identification of the *Candida* isolates to the species level is therefore extremely important and tests of antifungal sensitivity will be necessary for the adequate treatment of yeast infections in hospital environments and for controlling and preventing HI.

RESUMO

Suscetibilidade antifúngica e distribuição de *Candida* spp. isoladas do Hospital Universitário no Mato Grosso do Sul, Brasil

As infecções hospitalares causadas por *Candida* spp. são uma causa crescente de morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados, principalmente aqueles gravemente enfermos e imunocomprometidos. O presente estudo teve como objetivo analisar a distribuição das espécies de *Candida* no Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados e avaliar a suscetibilidade *in vitro* a drogas antifúngicas. As leveduras foram identificadas fenotipicamente de acordo com a metodologia clássica. O teste de suscetibilidade antifúngica foi realizado pela metodologia de microdiluição em caldo e os antifúngicos testados foram anfotericina B e fluconazol. Foram analisadas leveduras isoladas de urina (62,0%), sangue (24,0%) e secreção traqueal (14,0%). As espécies de *Candida* encontradas foram: *C. tropicalis* (42,0%), *C. albicans* (36,0%), *C. glabrata* (20,0%) e *C. krusei* (2,0%). O teste de suscetibilidade antifúngica mostrou que *C. albicans* foram sensíveis aos antifúngicos testados. Entretanto, 31,2% dos isolados das espécies de *Candida* não-*Candida albicans* apresentaram sensibilidade dose-dependente para fluconazol e 3,1% resistentes para anfotericina B. Nossos resultados diferem de outros trabalhos e mostram que *C. tropicalis* foi a espécie mais isolada de pacientes internados. Ressaltamos a importância da identificação em nível de espécie para a correta terapia antifúngica devido ao predomínio de infecções por *Candida* não-*Candida albicans*.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Flávia Patussi Correia Sacchi and Nathalie Gaebler Vasconcelos of the Clinical Analysis Laboratory of the University Hospital of the Federal University at Grande Dourados for their contributions to isolating the East specimens. Financial support: FUNDECT and CAPES.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

ETHICAL APPROVAL

This research was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of the Federal University at Grande Dourados (protocol 050/2010 – CEP/UFGD).

REFERENCES

1. Alonso-Valle H, Acha O, García-Palomo JD, Fariñas-Alvarez C, Fernández-Mazarrasa C, Fariñas MC. Candidemia in tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003; 22: 254-257.
2. Ashley, ESD; Lewis R, Lewis JS, Martin C, Andes D. Pharmacology of Systemic Antifungal Agents. *Clin Infect Dis*. 2006; 43: S28-39.
3. Azie N, Neofytos D, Pfaller M, Meier-Kriesche HU, Quan SP, Horn D. The PATH (Prospective Antifungal Therapy) Alliance® registry and invasive fungal infections: update 2012. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012; 73: 293-300.
4. Chang MR, Correia FP, Costa LC, Xavier PCN, Palhares DB, Taira DL, Paniago AMM, Pontes ERJC, Machado VE. *Candida* bloodstream infection: data from a

- teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2008; 50: 265-268.
5. Chi HW, Yang YS, Shang ST, Chen KH, Yeh KM, Chang FY, Lin JC. *Candida albicans* versus non-*albicans* bloodstream infections: The comparison of risk factors and outcome. *J Microbiol Immun Infec*. 2011; 44: 369-375.
 6. 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.
 7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution Antifungal Susceptibility testing of yeasts; 3rd Informational Supplement, M27-S3. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008b.
 8. Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003; 36: 599-607.
 9. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skagg B, da Matta DA, Warnock D, Morgan J, Brazilian Network Candidemia Study. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 2816-2823.
 10. Colombo AL, Nucci M, Salomão R, Branchini ML, Richtmann R, Derossi A, Wey SB. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1999; 34: 281-286.
 11. Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie E. *Candida*. In: Anaissie E, McGinnis MR, Pfaller MA. (Ed.). *Med mycology*. 1. ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2003; p. 195-239.

12. Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis*. 1999; 29: 239-244.
13. Fridkin SK. The changing face of fungal infections in health care settings. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 1455-1460.
14. Furnaleto MC, Rota JF, Quesada RMB, Furnaleto-Maia L, Rodrigues R, Oda S, Oliveira MT, Serpa R, França EJG. 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: 595-599.
15. Giolo MP, Svidzinski TIE. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *J Bras Patol Med Lab*. 2010; 46: 225-234.
16. Guimarães T, Nucci M, Mendonça JS, Martinez R, Brito LR, Silva N, Moretti ML, Salomão R, Colombo AL. Epidemiology and predictors of a poor outcome in elderly patients with candidemia. *Int J Infect Dis*. 2012; 16: e442-e447.
17. Hinrichsen SL, Falcão E, Vilella TAS, Rêgo L, Lira C, Almeida L, Martins M, Araújo C, Duarte M, Lopes G. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 41: 394-398.
18. Hube B. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*. 2004; 7: 336-41.
19. Kiraz N, Dag I, Oz Y, Yamac M, Kiremitci A, Kasifoglu N. Correlation between broth microdilution and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of caspofungin, voriconazole, amphotericin B, itraconazole and fluconazole against *Candida glabrata*. *J Microbiol Methods*. 2010; 82: 136-140.

20. Ortega M, Marco F, Soriano A, Almela M, Martínez JA, López J, Pitart C, Mensa J. *Candida* Species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. *J Hosp Infect.* 2011; 77: 157-161.
21. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ, Messer SA, SENTRY participant group. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and *in vitro* susceptibilities to fluconazole, ravuconazole and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 3254-3259.
22. Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to equinocandin 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: 65-69.
23. Schmalreck AF, Willinger B, Haase G, Blum G, Lass-Flörl C, Fegeler W, Becker K, Antifungal Susceptibility Testing (AFST) Study Group. Species and susceptibility distribution of 1062 clinical yeast isolates to azoles, echinocandins, flucytosine and amphotericin B from a multi-centre study. *Mycoses.* 2012; 55: e124-e137.
24. Singla N, Gulati N, Kaistha N, Chander J. *Candida* colonization in urine samples of ICU patients: determination of etiology, antifungal susceptibility testing and evaluation of associated risk factors. *Mycopathologia.* 2012; 174:149-55.
25. Talarmin JP, Boutoille D, Tattevin P, Dargère S, Weinbreck P, Ansart S, Chennebault JM, Hutin P, Léautez-Nainville S, Gay-Andrieu F, Raffi F, le GERICCO. Epidemiology of candidemia: a one-year prospective observational study in the west of France. *Med Mal Infect.* 2009; 39: 877-885.

26. Tortorano AM, Pen J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O, Biraghi E, Canton E, Zimmermann K, Senton S, Grillot K, ECMM Working Group on Candidaemia. 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: 317-322.
27. Tortorano AM, Prigitano A, Dho G, Grancini A, Passera M; ECMM-FIMUA Study Group. Antifungal susceptibility profiles of *Candida* isolates from a prospective survey of invasive fungal infections in Italian intensive care units. *J Med Microbiol*. 2012; 61: 389-393.
28. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 25,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 2004; 39: 309-317.
29. Yamamoto ACA, Paula CR, Dias LB, Tadano T, Martins ERM, Amadio JVRS, Hahn RC. Epidemiological and clinical characteristics of nosocomial candidiasis in university hospitals in Cuiabá – Mato Grosso, Brazil. *Rev Iberoam Micol*. 2012; 29: 164-168.
30. Yang YL, Wang AH, Wang CW, Cheng WT, Li SY, Lo HJ. Suscetibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species in Taiwan surveillance of antimicrobial resistance of yeasts 2006. *Diag Microbiol Infect Dis*. 2008; 61: 175-180.
31. Yarrow D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: C. P. Kurtzman, J. W. Fell, *The yeast, a taxonomic study*. Elsevier: New York; 1998.

5.2 Normas da Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Scope and policy

The “**Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**/Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine” (Revista do IMTSP) is a journal devoted to research on the different aspects of transmissible diseases. The Journal welcomes original works on all transmissible diseases. Each issue may contain, besides original papers, brief communications, preliminary reports, technical reports, reviews and correspondence. Reports on meetings are also accepted.

Papers written in English (**we advise authors with English as a foreign language to have their manuscripts checked by someone with English as a first language, preferably a scientist**), should be sent to the Editor, Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. **Manuscripts will be peer-reviewed by two or three referees of the Editorial Board and/or *ad hoc* reviewers. The decision of acceptance for publication lies with the Editors and is based on the recommendations of these referees. A form stating the following items should be sent to the Editorial Office signed by all Authors of the article: 1) The manuscript and all parts of it have not been submitted elsewhere; 2) There are no financial or other relationships from any of the authors of the manuscript that might lead to any conflict of interest; 3) The submitted manuscript has been read by all authors carefully. All authors agree that the manuscript represents their work. 4) Describe sources of funding that have supported the work. Please also describe the role of the study sponsor(s), if any, in study design; collection, analysis, and interpretation of data; writing of the paper; and decision to submit it for publication; 5) The corresponding author is indicated below and will be responsible for communicating with the other authors about revisions and final approval of the paper. From September 2010 on, manuscripts will be received only by on-line submission: <http://submission.scielo.br/index.php/rimtsp/login>, where the authors can check the status of the submission any time. The electronic file will be used for editorial**

assessment and online refereeing, and the editorial decisions on the manuscript will be communicated to the authors.

Authors may suggest up to four potential reviewers for their work, giving a full address (with fax, phone and e-mail) for each person they propose.

Form and preparation of manuscripts

Original papers - The text should be preceded by a short summary not exceeding 200 words, and should then proceed to sections of Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements and References. All papers should contain a summary in English and Portuguese or Spanish. Pages should be numbered consecutively in Arabic numerals; tables, figure legends including magnifications should be submitted on separate sheets. Tables and figures should be referred to in the text together with an indication of their approximate position recorded in the text margin. Tables should be typed double-spaced, each on a separate page. They should be numbered and contain a brief specific title. Drawings as well as halftones (photographs, photomicrographs, electron micrographs, or roentgenograms) should be planned to suit the size of a single or double page column. All figures must be submitted in duplicate, with author's name, figure number on top marked in light pencil on back. Diagrams and line drawings must be supplied as originals or glossy prints.

Color photographs will be allowed only in special circumstances and the author will be asked to contribute towards the cost of reproduction.

Acknowledgments should be brief, and should not include thanks to anonymous referees and editors, or effusive comments. Grant or contribution numbers may be acknowledged. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* encourages authors to include a statement to specify the individual contributions of each co-author, which will be published under a separate subheading "Author contributions" following the Acknowledgments.

Brief communications, preliminary and technical reports and letters to the editor are reserved for reporting new observations of critical importance. They should not

exceed two or three printed pages, including the illustrations and references. Preliminary reports will be published in the next issue going to press, after acceptance by referees.

Review articles by investigators who have made substantial contributions to a specific area of transmissible diseases will be published by invitation of the editorial board.

However, a review article may be submitted to the editor and if it is judged appropriate after peer revision it will be published. A review article should be presented in the same format as a full paper, except that it would not have to be divided into sections such as introduction, material and methods, results and discussion. It should, however, contain abstracts both in English and Portuguese or Spanish.

Review articles, brief communications, preliminary and technical reports, and correspondence published in a recent number of the journal should be used as models for formatting.

The list of **REFERENCES**, including only those actually mentioned in the text or tables, should be in alphabetical order in the Vancouver format and numbered consecutively in Arabic numerals. Citation in the text is by these numbers, and only exceptionally by name and year. Listing should be as follows:

a) **Articles from journals:** Last names and initials of all authors (**unless there are more than six, when only the first six should be given followed by *et al.***), full title of the article, title of the journal (title abbreviation by NLM - <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>), the year of publication, the volume number, the first and last page numbers.

Ex.: Velho, PENF, Faria, AV, Cintra, ML, Souza, EM, Moraes, AM. *Larva migrans*: a case report and review. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2003;45:167-71.

Ex.: Costa E, Lopes AA, Sacramento E, Costa YA, Matos ED, Lopes MB *et al.* Penicillin at the late stage of leptospirosis: a randomized controlled trial. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2003;45:141-5.

b) **Books:** last names and initials of all authors, full title of the book, edition, place of publication, the publisher, and the year.

Ex.: Lewin B. Genes IX. Boston: Jones and Bartlett; 2008.

c) **Chapter of book:**

Ex.: Ferreira HO. Doença de Chagas. In: Farhat CF, Carvalho ES, Carvalho LHFR, Succi RC, editores. Infectologia pediátrica. São Paulo: Atheneu; 1998. p. 531-7.

d) **Thesis**

Ex.: Vidal MSM. Estudo imunoquímico de antígenos de *Fonsecaea pedrosoi* e padronização de técnicas sorológicas para cromoblastomicose causada por este fungo [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2002.

Ethical Guidelines - Papers must state in the Material and Methods section that: 1) inform consent was obtained from all human adult participants and from parents or legal guardians of minors together with the approved consent of the Ethical Commission and 2) the maintenance of experimental animals complies with the guidelines of the human use of laboratory animals.

Randomized Controlled Trials and Clinical Trials - The **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** supports the policy of Clinical Trials registration delivered by WHO and the International Committee of Medical Journals Editors (ICMJE) recognizing the importance, in open access, of these initiatives for the registration and international knowledge of the information on clinical studies. Therefore, there will be accepted from 2007 on, only papers of clinical research dealing with these issues having an identification number provided by one of the clinical assays validated by established criteria from WHO and ICMJE. The addresses can be found in the ICMJE site (<http://www.icmje.org>). **The trial registration number should be written at the end of the summary.**

5.3 Tabelas de dados

Tabela 1. Características dos pacientes com candidíase internados no Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados e dados laboratoriais dos isolados.

Registro do isolado	Paciente	Sexo	Idade	Local de internação	Cultura	Data exame	Espécie	Fluconazol	Anfotericina B
1	P1	M	3 meses	UTI	Hemocultura	02/06/2010	<i>C. albicans</i>	0,25	0,5
2	P2	M	12	UTI	Hemocultura	02/06/2010	<i>C. tropicalis</i>	4	0,125
3	P3	M	70	UTI	Hemocultura	22/06/2010	<i>C. tropicalis</i>	0,25	0,5
4	P4	F	5 meses	UTI	Hemocultura	28/06/2010	<i>C. albicans</i>	0,25	0,5
5	P5	F	8	Enfermaria	Hemocultura	08/11/2010	<i>C. albicans</i>	0,25	0,25
6	P6	F	19 dias	Enfermaria	Hemocultura	21/01/2011	<i>C. tropicalis</i>	0,25	1
7	P7	M	2	Enfermaria	Hemocultura	28/01/2011	<i>C. tropicalis</i>	1	0,5
8	P8	F	6 meses	UTI	Hemocultura	08/02/2011	<i>C. albicans</i>	0,25	0,25
9	P9	M	2	Enfermaria	Hemocultura	22/03/2011	<i>C. albicans</i>	0,25	0,5
10	P10	F	7 meses	UTI	Hemocultura	23/03/2011	<i>C. albicans</i>	0,25	0,25
11	P11	F	2 meses	UTI	Hemocultura	29/03/2011	<i>C. albicans</i>	0,5	0,5
12	P12	F	5 meses	Enfermaria	Hemocultura	29/03/2011	<i>C. albicans</i>	0,25	0,5
13	P13	F	84	UTI	Secreção traqueal	07/06/2010	<i>C. glabrata</i>	32	1
14	P14	F	68	UTI	Secreção traqueal	20/09/2010	<i>C. tropicalis</i>	0,25	1
15	P15	M	71	UTI	Secreção traqueal	29/09/2010	<i>C. tropicalis</i>	2	1
16	P16	F	63	UTI	Secreção traqueal	03/11/2010	<i>C. tropicalis</i>	1	1
17	P17	F	52	UTI	Secreção traqueal	09/03/2011	<i>C. tropicalis</i>	2	0,5
18	P18	F	88	Enfermaria	Secreção traqueal	17/03/2011	<i>C. tropicalis</i>	1	1
19	P19	F	27	Enfermaria	Secreção traqueal	22/03/2011	<i>C. albicans</i>	32	0,5
20	P20	F	84	Enfermaria	Urocultura	15/06/2010	<i>C. albicans</i>	2	0,5

21	P3	M	70	UTI	Urocultura	21/06/2010	<i>C. tropicalis</i>	0,5	0,5
22	P21	F	87	Enfermaria	Urocultura	20/07/2010	<i>C. tropicalis</i>	1	1
23	P22	M	8 meses	UTI	Urocultura	03/09/2010	<i>C. glabrata</i>	32	1
24	P14	F	68	UTI	Urocultura	16/09/2010	<i>C. albicans</i>	0,25	0,5
25	P23	F	52	UTI	Urocultura	22/09/2010	<i>C. tropicalis</i>	0,5	> 16
26	P24	F	55	Enfermaria	Urocultura	30/09/2010	<i>C. glabrata</i>	> 64	1
27	P25	F	59	UTI	Urocultura	21/10/2010	<i>C. albicans</i>	0,25	0,5
28	P26	F	79	UTI	Urocultura	09/12/2010	<i>C. albicans</i>	0,25	0,5
29	P27	M	64	Enfermaria	Urocultura	14/12/2010	<i>C. glabrata</i>	16	0,25
30	P28	F	87	Enfermaria	Urocultura	19/12/2010	<i>C. tropicalis</i>	1	1
31	P29	M	42	UTI	Urocultura	21/12/2010	<i>C. glabrata</i>	32	0,5
32	P30	M	2 meses	Enfermaria	Urocultura	29/12/2010	<i>C. albicans</i>	0,25	0,5
33	P31	F	87	Enfermaria	Urocultura	07/01/2011	<i>C. glabrata</i>	32	1
34	P32	F	29	UTI	Urocultura	24/01/2011	<i>C. tropicalis</i>	1	0,5
35	P33	F	52	Enfermaria	Urocultura	28/01/2011	<i>C. glabrata</i>	32	0,5
36	P34	M	50	Enfermaria	Urocultura	03/02/2011	<i>C. tropicalis</i>	0,25	1
37	P35	M	37	UTI	Urocultura	09/02/2011	<i>C. albicans</i>	0,25	0,25
38	P36	M	88	UTI	Urocultura	26/02/2011	<i>C. tropicalis</i>	16	0,25
39	P37	F	43	Enfermaria	Urocultura	04/03/2011	<i>C. tropicalis</i>	2	0,5
40	P38	F	69	UTI	Urocultura	09/03/2011	<i>C. glabrata</i>	32	1
41	P39	F	3 meses	Enfermaria	Urocultura	21/03/2011	<i>C. albicans</i>	0,25	0,5
42	P40	M	84	UTI	Urocultura	05/04/2011	<i>C. tropicalis</i>	1	0,5
43	P41	F	33	UTI	Urocultura	25/04/2011	<i>C. tropicalis</i>	1	1
44	P42	F	47	UTI	Urocultura	25/04/2011	<i>C. albicans</i>	0,25	0,25
45	P43	M	66	Enfermaria	Urocultura	10/05/2011	<i>C. albicans</i>	0,5	0,5
46	P44	F	62	Enfermaria	Urocultura	11/05/2011	<i>C. glabrata</i>	> 64	1

47	P45	F	88	Enfermaria	Urocultura	16/05/2011	<i>C. glabrata</i>	32	0,5
48	P46	F	1 mês	UTI	Urocultura	18/05/2011	<i>C. tropicalis</i>	0,5	1
49	P47	F	78	UTI	Urocultura	19/05/2011	<i>C. tropicalis</i>	1	1
50	P48	F	47	UTI	Urocultura	31/05/2011	<i>C. krusei</i>	32	1

Tabela 2. Características dos pacientes com isolamento de *Candida* em outras culturas e dados laboratoriais dos isolados.

Registro do isolado	Paciente	Sexo	Idade	Local de internação	Cultura	Data exame	Espécie	Fluconazol	Anfotericina B
51	P49	F	68	UTI	Coprocultura	27/09/2010	<i>C. tropicalis</i>	1	1
52	P50	M	55	Enfermaria	Escarro	02/12/2010	<i>C. albicans</i>	0,25	0,25
53	P51	M	50	Enfermaria	Escarro	10/03/2011	<i>C. albicans</i>	0,25	0,5
54	P52	F	43	Enfermaria	Incisão gastrostomia	09/03/2011	<i>C. tropicalis</i>	2	0,5
55	P53	F	53	Enfermaria	Lavado brônquico	22/03/2011	<i>C. albicans</i>	0,125	0,25
56	P54	M	2 meses	UTI	Ponta de cateter	14/06/2010	<i>C. parapsilosis</i>	8	0,25
57	P55	M	70	UTI	Ponta de cateter	21/06/2010	<i>C. tropicalis</i>	4	0,5
58	P56	F	6 meses	UTI	Ponta de cateter	23/07/2010	<i>C. glabrata</i>	32	1
59	P57	F	79	UTI	Ponta de cateter	11/12/2010	<i>C. tropicalis</i>	2	1
60	P58	F	88	Enfermaria	Ponta de cateter	15/03/2011	<i>C. albicans</i>	1	0,5
61	P59	M	2 meses	Enfermaria	Ponta de cateter	21/03/2011	<i>C. albicans</i>	0,25	0,25
62	P60	M	1 mês	Enfermaria	Ponta de cateter	09/05/2011	<i>C. albicans</i>	0,25	0,5

63	P61	F	1 mês	UTI	Ponta de cateter	13/05/2011	<i>C. tropicalis</i>	1	1
64	P62	F	10 dias	Enfermaria	Ponta de cateter	20/05/2011	<i>C. albicans</i>	0,125	0,5
65	P63	F	4	Enfermaria	Sec. fer. operatória	25/04/2011	<i>C. albicans</i>	0,125	0,5
66	P64	F	58	UTI	Sec. Úlcera Sacral Swab de	10/02/2011	<i>C. albicans</i>	0,125	0,125
67	P65	F	3 meses	UTI	orofaringe	17/06/2010	<i>C. albicans</i>	32	1
68	P66	F	84	UTI	Swab nasal	07/06/2010	<i>C. albicans</i>	0,25	0,5
69	P67	F	63	UTI	Swab nasal	03/11/2010	<i>C. tropicalis</i>	0,5	1
70	P68	M	20	UTI	Swab retal	14/10/2010	<i>C. tropicalis</i>	32	1
71	P69	F	25	Enfermaria	Swab retal	14/10/2010	<i>C. tropicalis</i>	1	> 16
72	P70	F	57	Enfermaria	Swab retal	03/11/2010	<i>C. tropicalis</i>	4	0,03
73	P71	F	68	UTI	Swab retal	25/01/2011	<i>C. glabrata</i>	32	0,5
74	P72	M	2 meses	UTI	Swab retal	28/02/2011	<i>C. tropicalis</i>	16	0,125
75	P73	M	1 mês	UTI	Swab retal	25/05/2011	<i>C. krusei</i>	64	1

5.3 Cronograma das atividades de pesquisa realizadas

Atividades desenvolvidas	2010												2011												2012		
	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M
Revisão bibliográfica		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Avaliação pelo comitê de Ética HU					X	X																					
Avaliação pelo comitê de Ética UFGD						X	X	X	X	X	X																
Coleta das amostras de <i>Candida</i> spp.					X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X									
Identificação das espécies de <i>Candida</i>																			X	X	X	X					
Teste de sensibilidade aos antifúngicos																			X	X	X	X					
Análise dos resultados																							X	X	X		
Redação da dissertação e do artigo																							X	X	X	X	
Qualificação																										X	
Defesa																											X



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Dourados, 29 de fevereiro de 2012.

Senhora Pesquisadora:

Kelly Mari Pires de Oliveira

O Projeto de sua responsabilidade – Protocolo nº. **050/2010** – **CEP/UFGD** - intitulado “**Investigação e diferenciação de *Candida* spp. de infecções hospitalares e da microbiota de pacientes internados em um hospital universitário**” foi integralmente **APROVADO** e poderá ser conduzido.
Data da Aprovação: 03/12/2010.

Ressaltamos que os relatórios semestrais devem ser apresentados ao Comitê de Ética para acompanhamento e que alterações em seu projeto devem ser avisadas previamente a Coordenadora.

Atenciosamente,

Felipe de Almeida Borges
Secretário Comitê de Ética em Pesquisa – PROPP/UFGD