

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

TATIANA ELIAS COLOMBO

**“RELAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA ENTRE ISOLADOS
CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE
Candida spp EM DOIS HOSPITAIS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO, SP”**

Prof^a Dr^a Margarete Teresa Gottardo de Almeida
Orientadora

São José do Rio Preto

2010

Colombo, Tatiana Elias.

Relação fenotípica e genotípica entre isolados clínicos e ambientais de *Candida* spp em dois hospitais de São José do Rio Preto, SP / Tatiana Elias Colombo. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2010.

125 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Margarete Teresa Gottardo de Almeida

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Micologia. 2. Candidíase. I. Almeida, Margarete Teresa Gottardo de. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 582.28

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

TATIANA ELIAS COLOMBO

**“RELAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA ENTRE ISOLADOS
CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE
Candida spp EM DOIS HOSPITAIS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO, SP.”**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Margarete Teresa Gottardo de Almeida

FAMERP – São José do Rio Preto

Prof^a Dr^a Ana Marisa Fusco Almeida

UNESP – Araraquara

Prof^a Dr^a Mara Correa Lelles Nogueira

UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 20 de julho de 2010

DEDICATÓRIA

*A minha família, pelo grande amor, dedicação e
apoio em mais uma conquista que é tão minha
quanto deles.*

AGRADECIMENTOS

Obrigada Senhor, pelo dom da vida que generosamente me destes. Agradeço por mais esta etapa que estou vencendo e pelo passado que já vivi. Que a Vossa constante presença ilumine o meu futuro.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Margarete Teresa Gottardo de Almeida, por ter acreditado em mim. Agradeço pelos ensinamentos, conselhos e confiança refletidos em condições indispensáveis que um jovem pesquisador deve ter no decorrer de sua formação. Agradeço por nos demonstrar com exemplos que qualquer objetivo pode ser alcançado com responsabilidade, trabalho sério e organização.

Aos Professores e à Coordenação do Curso por contribuírem para o enriquecimento de meu conhecimento.

Ao Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira pela colaboração neste trabalho, por conceder-me uma bolsa técnica, fato muito importante para meu amadurecimento na pesquisa e por ceder o Laboratório de Pesquisa em Virologia para a realização deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Mara Correa Lelles Nogueira pelas sábias palavras e conselhos em vários momentos.

Aos meus colegas de Mestrado que tive a felicidade de conhecer e com os quais dividi bons e tensos momentos.

À técnica do Laboratório de Microbiologia da FAMERP, Luceli, pelo carinho, amizade e colaboração que foram constantes.

Aos meus amigos do laboratório de Microbiologia da FAMERP Fernanda, Keith, João Paulo, Juliana, Milena, Leandro, Leonardo, Luana, Natália, Natalinha e Tiago pelo auxílio na

execução desse trabalho, pelo companheirismo, apoio, amizade e incontáveis momentos de alegria e descontração.

Aos meus amigos do Laboratório de Virologia Amanda, Adriano, Ana Theresa, Aninha, Arieli, Carol, Danilo, Gislaine, Lígia, Rafael, Silvia e Vinícius pelos inúmeros momentos de descontração e pela agradável companhia.

Ao Laboratório Central do Hospital de Base assim como ao Instituto de Hematologia de São José do Rio Preto, por terem gentilmente cedido todas as cepas que possibilitaram a realização deste estudo.

À equipe responsável pelo controle de infecção hospitalar de ambos Hospitais, pela atenção concedida.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo, chefe do Laboratório Especial de Micologia/UNIFESP, SP, pela oportunidade do treinamento em RAPD e PFGE, assim como ao apoio técnico oferecido.

À equipe do Laboratório Especial de Micologia/UNIFESP, SP, em especial a Dr^a Anally e aos mestrandos Fernanda, Gisella e Jorge, pela atenção, colaboração e amizade prestadas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo imprescindível apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	17
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Infecções fúngicas.....	19
1.2. Ambiente hospitalar e <i>Candida</i> spp.....	19
1.3. O gênero <i>Candida</i> e o hospedeiro.....	20
1.4. Resistência antifúngica	23
1.5. Candidíase sistêmica.....	25
1.5.1 Epidemiologia de candidemia	26
1.5.2 Fisiopatologia e vias de aquisição	27
1.5.3 Diagnóstico	27
1.6. Testes de suscetibilidade aos antifúngicos.....	28
1.7. Epidemiologia molecular	29
1.8. Condição microbiológica do ambiente hospitalar.....	30
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVOS	34
3.1. Objetivo geral.....	34
3.2. Objetivos específicos	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1. Seleção das amostras.....	35
4.2. Identificação das leveduras	35
4.2.1 Características macromorfológicas	35
4.2.2 Características micromorfológicas.....	36
4.2.2.1 Teste de formação do tubo germinativo.....	36
4.2.2.2 Microcultivo em Corn-Meal com Tween 80.....	36

4.2.3 Provas fisiológicas de identificação das levedurs	36
4.2.3.1 Assimilação de carboidratos	37
4.2.3.2 Assimilação de nitrogênio	37
4.2.4 Produção de ascósporo	38
4.3. Teste de sensibilidade aos antifúngicos	38
4.4. Análise da epidemiologia molecular	40
4.4.1 Extração do DNA genômico para leveduras	40
4.4.1.1 RFLP	41
4.4.1.1.1 Sequências iniciadoras	41
4.4.1.1.2 Reações de amplificação	41
4.4.1.1.3 Eletroforese	41
4.4.1.1.4 Digestão enzimática	42
4.4.1.2 RAPD	42
4.4.1.2.1 Sequências iniciadoras e reações de amplificação	42
4.4.1.2.2 Eletroforese	44
4.4.1.2.3 Avaliação da similaridade dos padrões de bandas	44
4.4.2 PFGE	44
4.4.2.1 Extração do DNA cromossômico para leveduras	44
4.4.2.2 Condições eletroforéticas	45
4.4.2.3 Avaliação da similaridade dos padrões de bandas	46
5. RESULTADOS	47
5.1. Identificação das amostras	47
5.2. Distribuição das candidemias	50
5.3. Leveduras isoladas do leite hospitalar	52
5.4. Correlação entre as leveduras isoladas de hemocultura e leite	56
5.5. Análise genética	59
5.5.1 Perfil do “PCR-RFLP” para distinção entre <i>Candida albicans</i> e <i>Candida dubliniensis</i>	59

5.5.2 Perfil das leveduras submetidas ao “RAPD”	59
5.5.2.1 <i>Candida albicans</i>	60
5.5.2.2 <i>Candida glabrata</i>	61
5.5.2.3 <i>Candida guilliermondii</i>	62
5.5.2.4 <i>Candida metapsilosis</i> , <i>Candida orthopsilosis</i> e <i>Candida parapsilosis</i>	64
5.5.2.5 <i>Candida tropicalis</i>	67
5.5.2.6 <i>Pichia anomala</i>	68
5.5.2.7 <i>Trichosporon asahii</i>	70
5.5.3 Perfil da Cariotipagem em Campo Pulsátil (PFGE)	71
5.5.3.1 <i>Candida albicans</i>	72
5.5.3.2 <i>Candida orthopsilosis</i> e <i>Candida parapsilosis</i>	74
5.5.3.3 <i>Candida tropicalis</i>	76
5.5.3.4 <i>Pichia anomala</i>	77
5.6. Perfil de sensibilidade	79
6. DISCUSSÃO	85
7. CONCLUSÕES	90
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
9. APÊNDICE	109
10. ANEXOS	113
10.1. Meios e reagentes utilizados	113
10.1.1 Meios para isolamento das leveduras	113
10.1.2 Meios e soluções para identificação	113
10.1.3 Meio para o teste de suscetibilidade	116
10.1.4 Soluções utilizadas para extração do DNA genômico	116
10.1.5 Soluções utilizadas para digestão enzimática (RFLP)	118
10.1.6 Soluções utilizadas para polimorfismo do DNA aleatoriamente amplificado	120
10.1.7 Soluções e meios utilizados para cariotipagem eletroforética	121

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gel de agarose exibindo padrões genéticos de isolados de <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i> por PCR-RFLP	59
Figura 2. Gel de agarose exibindo padrões genéticos de isolados de <i>C. albicans</i> pós RAPD	60
Figura 3. Dendrograma obtido através dos perfis de bandas gerados com o <i>primer</i> B14 para as 36 cepas de <i>C. albicans</i>	61
Figura 4. Gel de agarose exibindo padrões genéticos de isolados de <i>C. glabrata</i> pós RAPD	62
Figura 5. Dendrograma obtido através dos perfis de bandas gerados com o <i>primer</i> OPE-18 para as três cepas de <i>C. glabrata</i>	62
Figura 6. Gel de agarose exibindo padrões genéticos de isolados de <i>C. guilliermondii</i> pós RAPD (H1)	63
Figura 7. Dendrograma obtido através dos perfis de bandas gerados com o <i>primer</i> OPE-18 para as três cepas de <i>C. guilliermondii</i>	63
Figura 8. Gel de agarose exibindo padrões genéticos de <i>C. orthopsilosis</i> e <i>C. parapsilosis</i> pós RAPD (H2)	65
Figura 9. Dendrograma obtido através dos perfis de bandas gerados com o <i>primer</i> B14 para as 59 cepas de <i>C. parapsilosis</i>	66
Figura 10. Gel de agarose exibindo padrões genéticos de <i>C. tropicalis</i> pós RAPD (H2).67	
Figura 11. Dendrograma obtido através dos perfis de bandas gerados com o <i>primer</i> M2 para as 30 cepas de <i>C. tropicalis</i>	68
Figura 12. Gel de agarose exibindo padrões genéticos de <i>P. anomala</i> pós RAPD (H2) 69	
Figura 13. Dendrograma obtido através dos perfis de bandas gerados com o <i>primer</i> CDU para as 12 cepas de <i>P. anomala</i>	69
Figura 14. Gel de agarose exibindo padrões genéticos de <i>T. asahii</i> pós RAPD (H2)	70

Figura 15. Dendrograma obtido através dos perfis de bandas gerados com o <i>primer</i> 6 para as 12 cepas de <i>T. asahii</i>	71
Figura 16. Cariotipagem eletroforética de <i>C. albicans</i> : cariótipos isolados de sangue e leite de pacientes (H1 e H2)	72
Figura 17. Dendrograma obtido através dos perfis de bandas gerados por cariotipagem para as 27 cepas de <i>C. albicans</i>	73
Figura 18. Cariotipagem eletroforética de <i>C. parapsilosis</i> : cariótipos isolados de sangue (H2)	74
Figura 19. Dendrograma obtido através dos perfis de bandas gerados por cariotipagem para as 2 cepas de <i>C. metapsilosis</i> e 7 cepas de <i>C. orthopsilosis</i>	75
Figura 20. Dendrograma obtido através dos perfis de bandas gerados por cariotipagem para as 35 cepas de <i>C. parapsilosis</i>	75
Figura 21. Cariotipagem eletroforética de <i>C. tropicalis</i> : cariótipos isolados de sangue e leite dos hospitais analisados.....	76
Figura 22. Dendrograma obtido através dos perfis de bandas gerados por cariotipagem para as 20 cepas de <i>C. tropicalis</i>	77
Figura 23. Cariotipagem eletroforética de <i>P. anomala</i> : cariótipos dos isolados clínicos (H2)	78
Figura 24. Dendrograma obtido através dos perfis de bandas gerados por cariotipagem para as oito cepas de <i>P. anomala</i>	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de ponto de corte sugeridos para interpretação de testes de suscetibilidade de leveduras	39
Tabela 2. Distribuição dos casos de candidemia por faixa etária no Hospital 1 e no Hospital 2, agosto/2007-novembro/2009	48
Tabela 3. Evolução dos 98 pacientes com candidemia e distribuição microbiana (Hospital 1 e Hospital 2), agosto/2007–novembro/2009	49
Tabela 4A. Distribuição das espécies isoladas de hemoculturas nas unidades hospitalares (Hospital 1).....	51
Tabela 4B. Distribuição das espécies isoladas de hemoculturas nas unidades hospitalares (Hospital 2).....	51
Tabela 5A. Distribuição de ocorrência de leveduras nos leitos e unidades hospitalares (H1).	53
Tabela 5B. Distribuição das espécies de leveduras isoladas de leito nas unidades hospitalares (H1).....	53
Tabela 6A. Distribuição de ocorrência de leveduras nos leitos e unidades hospitalares (H2)	54
Tabela 6B. Distribuição das espécies de leveduras isoladas de leito nas unidades hospitalares (H2).....	55
Tabela 7A. Distribuição das espécies de leveduras isoladas em pacientes e nos leitos do Hospital 1.....	57
Tabela 7B. Distribuição das espécies de leveduras isoladas em pacientes e nos leitos do Hospital 2.....	58
Tabela 8A. Distribuição dos valores de CIM e perfil de suscetibilidade das espécies de leveduras isoladas de hemocultura e de leito (H1).....	80
Tabela 8B. Distribuição dos valores de CIM e perfil de suscetibilidade das espécies de leveduras isoladas de hemocultura e de leito (H1).....	81

Tabela 9A. Distribuição dos valores de CIM e perfil de suscetibilidade das espécies de leveduras isoladas de hemocultura e de leite (H2)	82
Tabela 9B. Distribuição dos valores de CIM e perfil de suscetibilidade das espécies de leveduras isoladas de hemocultura e de leite (H2)	83
Tabela 9C. Distribuição dos valores de CIM e perfil de suscetibilidade das espécies de leveduras isoladas de hemocultura e de leite (H2)	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
C	Citosina
cm	Centímetro
cols	Colaboradores
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitosina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
dNTP	Desoxinucleosídeo
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
DO	Densidade Óptica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
et al.	Colaboradores
g	Gramas
G	Guanina
h	Horas
HCl	Ácido clorídrico
kb	Kilo base
KCl	Cloreto de Potássio
M	Molar
mA	Mili Ampère
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MgCl ₂	Cloreto de magnésio

mg	Miligrama
μl	Microlitro
Nº	Número
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
nmol	Nanomol
pb	Pares de base
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
q.s.p	Quantidade suficiente para
®	Marca registrada
rDNA	Ácido desoxirribonucléico ribossomal
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
spp.	Espécies
T	Timina
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Ultra violeta
U/μl	Unidades por microlitro
vol	Volume
Volts	Unidade de corrente elétrica
X	Vezes
°C	Graus Celsius

RESUMO

As leveduras estão amplamente distribuídas em diversos ambientes, sendo também habitantes normais do corpo humano. São consideradas patógenos oportunistas causando infecções que variam desde superficiais até profundas e fatais. Espécies de *Candida* spp ocupam, atualmente, lugar de destaque como principais causadoras das infecções a corrente sanguínea. A investigação da suscetibilidade antimicrobiana, frente aos antifúngicos rotineiramente preconizados na terapêutica, é de fundamental importância, além disso, métodos moleculares como o RAPD (Polimorfismo do DNA aleatoriamente amplificado) e PFGE (Eletroforese em campo pulsátil) são conhecidos por ajudar na identificação das fontes de infecção e delineamento epidemiológico. O Laboratório de Microbiologia da FAMERP, em parceria com o Hospital de Base de São José do Rio Preto, vem desenvolvendo projetos de pesquisa que envolve o isolamento, a identificação e manutenção de coleção de culturas de espécies microbianas. O presente projeto teve como objetivo identificar as espécies leveduriformes presentes em isolados clínicos e ambientais, avaliar a sua suscetibilidade antimicrobiana, além de estudar a relação genética entre tais isolados por ambas técnicas - RAPD e PFGE, na tentativa de elucidar as possíveis fontes de aquisição, prática considerada fundamental na rede de vigilância. No período de agosto de 2007 a outubro de 2009, foram analisados 119 episódios de candidemia. A distribuição dos casos de candidemia foi mais frequente em pacientes com idade inferior a 1 ano e superior a 60 anos, não havendo tendência para nenhum gênero. O grupo geral manteve como período de internação uma média de 35 dias, com frequência de óbito correspondente a 61%. *C. albicans* foi a espécie mais prevalente (29%), seguida por *C. parapsilosis* (28%) e *C. tropicalis* (23%). Dos leitos hospitalares, *C. parapsilosis* (46.5%) e *T. asahii* (28%) foram as mais frequentes. A análise do poder discriminatório do RAPD e PFGE revelou-se como maior para o primeiro frente aos isolados *Candida* spp e *Picchia anomala*. A relação clonal esteve presente, em isolados clínicos *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *P. anomala*; clínicos e ambientais para *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Em associação aos parâmetros genéticos apenas os isolados clonais, clínicos e ambientais de *C. parapsilosis*, *T. asahii* e *P. anomala* apresentam o mesmo perfil de suscetibilidade aos antifúngicos em 100% dos casos. No entanto, frente à espécie *C. tropicalis*, a taxa de concordância entre as duas análises (fenótipo e genótipo) foi 30%. Ainda, os isolados clonais de *C. guilliermondii* (2) apresentaram respostas fenotípicas distintas aos

fármacos testados. Considerando-se todas as espécies estudadas, a ocorrência de fenótipo de resistência aos azólicos, caracterizou-se como evento raro, no entanto, padrões de sensibilidade dose dependente foi mais frequente para as espécies *C. albicans* e *C. tropicalis*. Tais dados confirmam a necessidade de estudos epidemiológicos que possam monitorar possíveis mudanças na distribuição dessas espécies frente aos padrões de suscetibilidade antimicrobiana. A ocorrência de isolados clonais em amostras clínicas e ambientais traça a existência de rota de transmissão comum em ambiente hospitalar.

Palavras-chaves: *Candida* spp, RAPD, PFGE, relação clonal, suscetibilidade antimicrobiana.

ABSTRACT

The yeasts are widely distributed in the environments diverse and are also normal inhabitants of the human body. They are considered opportunistic pathogens and cause infections that vary since superficial until deep and fatal. Species of *Candida* sp. currently occupy prominence place as main causers of bloodstream infections. The investigation of the antimicrobial susceptibility, relate to the antifungal drugs routinely used in the therapeutics, has a great importance, moreover, molecular methods as RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) and PFGE (Pulsed-Field Gel Eletrophoresis) are known to help in the identification of the infection sources and epidemiologic delineation. The Laboratory of Microbiology of the FAMERP, in partnership with the Hospital of Base of São José do Rio Preto, it develops projects of research that it involves isolation, identification and maintenance of collections of microbial species cultures. The present project had as objectives to identify the yeast species found in the clinical and environmental isolates, to evaluate their antimicrobial susceptibility, beyond evaluate the genetic relation between the isolates by both techniques - RAPD and PFGE, in the attempt to elucidate the possible sources of acquisition, which is the basic considered practice in the vigilance net. In the period of August of 2007 the October of 2009, 119 episodes of candidemia have been analyzed. The distribution of the candidemia cases was more frequent in patients with less than one year old and more than 60 years old, and there wasn't any tendency of gender. The general group kept as period of internment an average of 35 days, with death frequency of 61%. *C. albicans* was the most prevalent specie (29%), followed by *C. parapsilosis* (28%) and *C. tropicalis* (23%). In hospital beds, *C. parapsilosis* (46,5%) and *T. asahii* (28%) have been most frequent. The analysis that the discriminatory power of RAPD and PFGE showed as bigger for the first front to *Candida* spp e *Picchia anomala* isolates. The clonal relation was present, in clinical isolates of *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and *P. anomala*; clinical and environment for *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*. In association to the genetic parameters only the clone isolates, clinical and environmental isolates of *C. parapsilosis*, *T. asahii* and *P. anomala* presented the same profile of antifungal susceptibility in 100% of the cases. However, regarding to the specie *C. tropicalis*, the rate of agreement between the two analyses (phenotypic and genotypic) was 30%. Still, the clones isolates of *C. guilliermondii* (2) presented distinct phenotypic answers to the tested drugs. Considering all the studied species, the occurrence of

a phenotype of azole resistance, characterized as rare event, however, profile of dose-dependent sensitivity was more frequent for the species *C. albicans* e *C. tropicalis*. Such data confirms the necessity of epidemiologic studies which can monitor possible changes in the distribution of these species or in the patterns of antimicrobial susceptibility. The occurrence of clonal isolated in clinical and environmental samples it traces the existence of route of common transmission in hospital environment.

Key-Words: *Candida* spp, RAPD, PFGE, clonal relation, antimicrobial susceptibility.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Infecções fúngicas

O número de doenças fúngicas tem aumentado nos últimos anos e neste sentido, a infecção da corrente sanguínea causada por fungos vem sendo considerada a quarta causa de sepse, segundo dados do *Nosocomial Infection Surveillance System* (WISPLINGHOFF et al., 2004). Neste panorama, 80% destas, são causadas por espécies de leveduras do gênero *Candida* resultando em substancial morbidade e mortalidade (40 a 60%), especialmente se a terapia antifúngica falta ou é inapropriada (GAGNE et al., 2006; GAREY et al., 2006; GUDLAUGSSON et al., 2003; MORGAN et al., 2005; MORREL et al., 2005; PUZNIAK et al., 2004; SHORR et al., 2009). Por esta razão, estas infecções possuem grande impacto na saúde pública, principalmente em ambientes hospitalares de alto risco como Unidades de Tratamento Intensivo (COLOMBO et al., 1999). Além disso, o surgimento de espécies resistentes aos antifúngicos, associado aos altos índices de mortalidade no mundo todo, representam um importante desafio terapêutico (FRANÇA et al., 2008; HUANG et al., 1999).

1.2. Ambiente hospitalar e *Candida* spp

A relevância das infecções por *Candida* spp em ambiente hospitalar passou a ganhar importância a partir da década de 1980, interligada ao avanço da tecnologia científica médica e do melhor conhecimento dos mecanismos desencadeadores de doenças, propiciando uma sobrevivência maior do homem (EGGIMANN et al., 2003; GUDLAUGSSON et al., 2003; RIBEIRO et al., 2004; SANDVEN, 2000; VIUDES et al., 2002; ZAOUTIS et al., 2005). Este fato fez com que as intervenções de procedimentos clínico-laboratoriais expusessem os pacientes a uma seletividade de micro-organismos mais resistentes, favorecidos pelo uso indiscriminado ao longo do tempo dos fármacos disponíveis no mercado (FRANÇA et al., 2008). Deste modo, os relatos de cepas de *Candida* spp envolvidas em enfermidades humanas na condição de agente principal e/ou secundário tornaram-se mais frequentes, fazendo deste

micro-organismo um dos mais relevantes, e intimamente associado às infecções nosocomiais (COLOMBO et al., 2003).

Atualmente, infecções sanguíneas por espécies de *Candida*, conhecida por candidemia, estão entre as principais infecções nosocomiais, devido ao aumento no número de hospitalizações, cirurgias de alto risco, depressão imunitária secundária à doença de base ou distúrbios metabólicos do hospedeiro, fatores iatrogênicos relacionados aos procedimentos médicos invasivos, quimioterapia e abuso na utilização de antibióticos de amplo espectro (BLUMBERG et al., 2001; BRITO et al., 2006; COLOMBO et al., 1999; GUDLAUGSSON et al., 2003; HINRICHTSEN et al., 2008; MARCHETTI et al., 2004; PFALLER et al., 2001; RANGEL-FRAUSTO et al., 1999; SAIMAN et al., 2001; VIUDES et al., 2002; WARNOCK, 2007).

Devido à alta taxa de mortalidade, torna-se imprescindível a investigação das fontes de aquisição para posterior adoção de medidas de controle (ERGON et al., 2005). Apesar da existência de controvérsias sobre o tratamento apropriado das superfícies inanimadas no ambiente hospitalar, para prevenção de transmissão de patógenos, existe evidência da presença e sobrevivência de *C. albicans* em superfície inerte por tempo prolongado, devido à presença de albumina, baixa temperatura e alta umidade no ambiente, fato apresentado pelo estudo de Kramer et al., 2006.

1.3. O gênero *Candida* e o hospedeiro

O gênero *Candida* é constituído por leveduras anamórficas, cujos mecanismos de divisão celular envolvem o brotamento simples, brotamento fissão e divisão binária. Fazem parte do reino Fungi; Divisão Eumycota; Filo Deuteromycota; Classe Blastomyces; Ordem Criptococcales; Família Criptococaceae; gênero *Candida* (BRION et al., 2001; GUARRO et al., 1999; HOOG & GUARRO, 2001; XAVIER & CHANG, 2008).

As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância pela alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano. Possuem ampla distribuição, podendo ser encontradas fazendo parte da microbiota do homem (trato gastrointestinal e saliva) e de outros animais, assim como no solo, alimentos e em diversos ambientes, inclusive hospitalares (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; GUARRO et al., 1999). Essas leveduras comensais tornam-se patogênicos caso ocorra um desequilíbrio da relação parasito-hospedeiro (BRION

et al., 2001). Assim, a colonização é o primeiro passo, uma vez que populações numerosas de leveduras tentam vencer as defesas do indivíduo, sem causar-lhes danos (BRION et al., 2001). Seguem-se, então, alterações no mecanismo de defesa do hospedeiro ou comprometimento das barreiras anatômicas secundárias (RODRIGUEZ & MOREIRA, 1999). Tais alterações podem ser decorrentes de mudanças fisiológicas característica da idade, ou, ainda, associadas a doenças degenerativas, neoplasias, imunodeficiências congênitas ou adquiridas e imunossupressão induzida por atos médicos (COLOMBO et al., 2003). Em associação aos fatores de virulência do gênero *Candida*, todas essas alterações ocasionam uma infecção do tecido sanguíneo, com potencial de disseminação para outros sítios profundos (MEDRANO & RABENHORST 2004).

Entre as espécies de *Candida* conhecidas, 17 são implicadas em quadros de infecção humana. Nesse sentido, *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas, apresentando vários fatores de virulência (LOPEZ-SATRE et al., 2003; MARCHETTI et al., 2004; RODRIGUEZ & MOREIRA, 1999). Esta espécie é naturalmente sensível a várias drogas antifúngicas de uso sistêmico, mas casos de resistência adquirida aos azólicos são conhecidos, particularmente em isolados fúngicos de pacientes que foram expostos a estes medicamentos. Já a resistência a anfotericina B é considerada um fenômeno raro, devido a interpretações conflitantes das metodologias com relação aos pontos de corte que permitem classificar os isolados como sensíveis ou resistentes à anfotericina B (BOFF & ALVES, 2007; LEMOS et al., 2009).

Do mesmo modo, *Candida dubliniensis* apresenta semelhança morfológica e bioquímica com *C. albicans*, porém é menos patogênica e tem maior facilidade de desenvolver resistência aos antifúngicos triazólicos (FRANÇA & FILHO, 2006). Embora o significado clínico não esteja totalmente identificado, esta espécie é considerada um patógeno oportunista devido a sua associação com infecções orais recorrentes, assim como sua implicação com casos de infecções superficiais ou sistêmicas em indivíduos imunocomprometidos (JABRA-RIZK et al., 2000; NONAKA et al., 2008).

Paralelamente, *Candida parapsilosis* apresenta-se, desde os anos 80, como um importante patógeno hospitalar, em crianças e recém-nascidos prematuros em unidades de terapia intensiva, especialmente em infecção de corrente sanguínea, relacionada predominantemente à via de transmissão exógena (BONASSOLI et al., 2005; CANO et al., 2005; COLOMBO et al., 1999; COLOMBO et al., 2003; COSTA et al., 2000; GODOY et al.,

2003; GOLDANI & MARIO, 2003; MATSUMOTO et al., 2002; XAVIER et al., 2008). Caracteristicamente, *C. parapsilosis* coloniza a pele, tem grande capacidade de produzir biofilme, em particular associado a cateter (CANO et al., 2005; CANTÓN et al., 2001; FRANÇA & FILHO, 2006; LEVIN et al., 1998; MEDRANO et al., 2006). Isolados clínicos desta espécie são sensíveis a anfotericina B e aos triazólicos (DIEKEMA et al., 2002; SANGLARD & ODDS, 2002).

Casuísticas do Brasil e do mundo revelam *Candida tropicalis* como importante levedura do grupo não-*albicans* responsável por quadros de candidemia (ALMIRANTE et al., 2005; CLARK et al., 2004; LUPETI et al., 2002), cuja via de aquisição é essencialmente endógena (CANTÓN et al., 2001). Considera-se que 50 a 60% dos pacientes colonizados por esta espécie desenvolvam infecções sistêmicas, sendo de ocorrência elevada em pacientes com neoplasias, leucemias e em menor naqueles com tumores sólidos (COLOMBO et al., 2003; FOONGLADDA et al., 2004; GUPTA et al., 2001). Os isolados clínicos desta espécie são sensíveis a anfotericina B e, na grande maioria das vezes, aos triazólicos (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; FRANÇA & FILHO, 2006).

Candida guilliermondii é considerada um componente da microbiota humana, sendo raramente isolada de pacientes como um patógeno. Devido à baixa frequência, infecções causadas por *C. guilliermondii* são relativamente pouco estudadas, em comparação às infecções causadas por outras espécies de *Candida* (PASQUALOTTO et al., 2006). Tem sido reportada com diminuição na suscetibilidade a drogas antifúngicas (PFALLER & DIEKEMA, 2007).

Em muitos centros médicos dos Estados Unidos, a espécie mais comum de *Candida* não-*albicans*, corresponde a *Candida glabrata* (LIN et al., 2005). No entanto, índices de prevalência variáveis vêm sendo apontados, comumente relacionados a diversos fatores, tais como, geográficos, idade e população em estudo (DIEKEMA et al., 2002; MALANI et al., 2001; MARR et al., 2000; RANGEL-FRAUSTO et al., 1999; VISCOLI et al., 1999). Devido ao fato desta espécie ser resistente ao fluconazol, há relatos de um aumento de fungemias relacionados à essa espécie (MALANI et al., 2005).

Pichia anomala (anteriormente *Hansenula anomala*, forma anamórfica *Candida pelliculosa*) tem sido raramente implicada como causa de fungemia em neonatos e pacientes imunocomprometidos (PASQUALOTTO et al., 2005). Embora *P. anomala* seja considerada

uma levedura emergente em termos de infecção sanguínea, dados sobre a suscetibilidade frente a drogas antifúngicas são raros (MATTA et al., 2007).

Apesar deste panorama microbiológico relevante nas doenças fúngicas de corrente sanguínea, outras espécies do gênero *Candida* podem ainda ser consideradas patogênicas para humanos, tais como: *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis* e *C. inconspicua* (COLOMBO et al., 2006; PFALLER & DIEKEMA, 2004; SANDVEN et al., 2006). À exceção de *C. krusei*, inerentemente resistente aos derivados azólicos, as demais apresentam padrões variados de resposta aos antimicrobianos comumente utilizados na prática clínica (FIDEL et al., 1999). É, portanto, de fundamental importância estabelecer metas para o conhecimento do comportamento microbiológico de cada uma das espécies fúngicas, para permitir a escolha da melhor abordagem terapêutica (ALEXANDER, 2002; COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; PFALLER et al., 2001; SANGLARD & ODDS, 2002).

1.4. Resistência antifúngica

A resistência pode ser definida em termos microbiológicos e clínicos (ESPINEL-INGROFF, 2008). O conceito microbiológico de resistência engloba a resistência primária (ou intrínseca) que é aquela presente em um organismo sem prévia exposição aos fármacos antifúngicos e a resistência secundária (ou adquirida) que é aquela desenvolvida como resposta à exposição a essas substâncias (LOEFFLER & STEVENS, 2003). Normalmente, a resistência secundária é decorrente de alterações fenotípicas e/ou genotípicas de caráter estável ou transitório (BARKER & ROGERS, 2006). Por sua vez, a resistência clínica tem sido definida como a progressão ou a persistência de uma infecção, a despeito do estabelecimento de apropriada terapia antimicrobiana (PEREA & PATTERSON, 2002). A ocorrência de resistência clínica está associada a fatores do hospedeiro, fatores farmacológicos, fatores iatrogênicos e fatores fúngicos (ESPINEL-INGROFF, 2000). Dentro das infecções fúngicas invasivas, a resistência clínica se manifesta tipicamente em pacientes com neutropenia profunda e prolongada, pacientes submetidos a múltiplas terapias e portadores de próteses e cateteres (PLAYFORD et al., 2008).

A resistência primária à anfotericina B é de ocorrência limitada. Alguns patógenos emergentes como *Aspergillus* spp., *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e

Fusarium spp., todavia, têm demonstrado certo grau de resistência primária *in vitro* (CUENCA-ESTRELLA et al., 2006). Da mesma forma, a resistência secundária a fármacos poliênicos é pouco prevalente entre as espécies fúngicas. No entanto, alguns casos de infecção disseminada por cepas de *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. albicans* que desenvolveram resistência à anfotericina B durante o tratamento antifúngico têm sido descritos (ROGERS, 2006). A resistência aos poliênicos está primariamente relacionada a alterações qualitativas e quantitativas dos lipídios da membrana celular fúngica (CANUTO & RODERO, 2002). Os mecanismos bioquímicos de resistência incluem a diminuição do conteúdo de ergosterol sem concomitante mudança em sua composição, a substituição dos esteróis com maior afinidade pelos poliênicos e a reorientação dos esteróis existentes, tornando a ligação com os poliênicos menos favorável (BAKER & ROGERS, 2006). Essas alterações da membrana fúngica parecem estar associadas a mutações nos genes *erg2* ou *erg3* (KLEPSER, 2001). Outras fontes de resistência são o aumento da atividade da catalase celular que age minimizando a destruição oxidativa produzida pelos fármacos poliênicos e a diminuição do conteúdo de β -1,3-glucana que estabiliza a parede celular fúngica, influenciando o acesso de macromoléculas como a anfotericina B à membrana plasmática (LOEFFLER & STEVENS, 2003; SANGLARD, 2002). Apesar de quimioterapia citotóxica e severo imunocomprometimento serem, comumente, observados em pacientes infectados com cepas que apresentam resistência secundária, os fatores de risco para o desenvolvimento de resistência aos derivados poliênicos não estão bem definidos (KANAFANI & PERFECT, 2008).

Diferentes mecanismos moleculares de resistência aos azólicos são possíveis (ESPINEL-INGROFF, 2008). A resistência secundária a esses fármacos está melhor descrita em fungos leveduriformes (SANGLARD, 2002). Em *Candida* spp., a resistência pode ser resultado do aumento da expressão de bombas de eliminação ativa que regulam o transporte e/ou o acúmulo intracelular de derivados azólicos. Os transportadores ABC e os transportadores MSF são as duas principais bombas de efluxo encontradas nesses fungos. A super-expressão em *C. albicans* dos genes *cdr1* e *cdr2* codificadores dos transportadores ABC e do gene *mdr1* codificador dos transportadores MSF determinam a diminuição da susceptibilidade à maioria dos azólicos de uso clínico e ao fluconazol, respectivamente (MISHRA et al., 2007). Genes funcionalmente semelhantes àqueles observados em *C. albicans* são também descritos em espécies não-*albicans* como *cgcdr1* e *pdh1* em *C. glabrata* e *cdcdr1* e *cdcdr2* em *C. dubliniensis* (SANGLARD, 2002). Um mecanismo diretamente

relacionado com resistência é a alteração estrutural da enzima 14- α lanosterol demetilase (ERG11p) que é o sítio celular dos derivados azólicos e a enzima chave na síntese do ergosterol. Essa enzima é produto do gene *cyp51/erg11* e mutações em sua sequência levam a mudanças conformacionais da enzima, afetando a afinidade com os azólicos (PRASAD & KAPOOR, 2005). Em *C. krusei*, esse mecanismo de resistência é de natureza primária (SANGLARD & ODDS, 2002). O aumento da expressão do gene *erg11* parece também contribuir para resistência aos derivados azólicos (KLEPSEK, 2001). A alteração na via biossintética do ergosterol é outro mecanismo associado à resistência. A enzima C-5,6 esterol desaturase codificada pelo gene *erg3* cataliza a conversão de 14- α metilfecosterol em 14- α metil-ergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diol. Esse esterol metilado tóxico é formado com o bloqueio de ERG11p, sendo consequência da atividade dos fármacos azólicos sobre a célula fúngica. A mutação do gene *erg3* suprime o efeito tóxico e é considerado um mecanismo de resistência (MISHRA et al., 2007). Devido a não produção de ergosterol, esse mecanismo também está associado à resistência aos derivados poliênicos (MELLADO et al., 2002). Com a alteração da composição dos esteróis da membrana citoplasmática, o influxo celular de azólicos é afetado pela perda de fluidez e assimetria dessa organela. Este mecanismo tem sido demonstrado em isolados de *C. albicans* resistentes ao miconazol e fluconazol e *C. krusei* resistente ao itraconazol (LOEFFLER & STEVENS, 2003).

1.5. Candidíase sistêmica

A candidíase sistêmica caracteriza-se por uma sintomatologia infecciosa localizada, que, em algum período de sua evolução, dissemina-se a outros órgãos por via sanguínea, como, por exemplo, coração, intestino, pulmão, rins e sistema nervoso central, podendo ser observada de forma isolada ou associada (ELLIS, 2002; SALDAR et al., 2002). Nestas situações, os episódios de fungemia podem ter caráter transitório e autolimitado, particularmente em hospedeiros imunocompetentes (COLOMBO et al., 2003). Ainda, não existem, até o momento, dados clínicos ou laboratoriais que permitam ao clínico diagnosticar o momento exato do aparecimento da fungemia, ou, ainda, identificar se o episódio será transitório ou não (COLOMBO et al., 2003). De fato, complicações como retinite, meningite ou osteomielite tardias por *Candida* spp, podem aparecer semanas ou meses após o episódio de candidemia (COLOMBO et al., 2003). O aparecimento de lesões cutâneas pode ser a

primeira manifestação de doença invasiva ou um marcador de disseminação da doença. Tais lesões podem acometer de 10 a 15% dos pacientes, apresentando-se caracteristicamente como formações maculo-papulares ou pequenos nódulos com base eritematosa ou purpúrica, sendo ainda descritos outros aspectos morfológicos de lesões (FERNANDES et al., 2000).

1.5.1 Epidemiologia de candidemia

Evidências sugerem que infecções da corrente sanguínea (ICS) causadas por *Candida* spp têm se tornado o maior problema em hospitais terciários em todo o mundo, estando associadas ao aumento da permanência hospitalar e à elevada taxa de mortalidade (ALMIRANTE et al., 2006; ANTUNES et al., 2004; BARBERINO et al., 2006; COLOMBO et al., 2006; MEDRANO et al., 2006; TORTORANO et al., 2004). No Brasil, a taxa é de 3,7 casos para cada 10.000 pacientes por dia e tem levado a necessidade da criação de programas de vigilância (COLOMBO et al., 2006; WARNOK, 2007). Nos Estados Unidos é considerada a quarta causa mais comum de infecção hospitalar, com incidência de 1,5 casos a cada 10.000 pacientes por dia (HAJJEH et al., 2004) e na Europa, em torno de 0,5 e 0,7 casos a cada 10.000 pacientes por dia (ARENDRUP et al., 2005; RICHET et al., 2002).

Mudanças significativas na epidemiologia da candidemia, em virtude, principalmente, da diversificação das espécies envolvidas, vêm sendo descritas (MARCHETTI et al., 2004; RENTZ et al., 1998). Assim, por exemplo, *C. albicans* tem sido a espécie mais prevalente, responsável por 85 a 90% (CHENG et al. 2005). Entretanto, nas duas últimas décadas, espécies de *Candida* não-*albicans* tornaram-se os principais agentes etiológicos envolvidos nos quadros de infecções fúngicas invasivas no mundo todo, garantindo que variações geográficas mudem o padrão etiológico desta infecção (COLOMBO et al., 2006; HINRICHSEN et al., 2008; MORGAN, 2005; XAVIER et al., 2008). Nesse sentido, na América do Norte nota-se o predomínio de *C. glabrata* (MORGAN, 2005); na América do Sul, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (BRILHANTE et al., 2005; COLOMBO et al., 2003; HINRICHSEN et al., 2008); no Brasil, *C. albicans*, e para o grupo não-*albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (COLOMBO et al., 2006).

A falta de um diagnóstico rápido e preciso de candidemia, aliada à condição clínica do paciente, têm sido considerados elementos fundamentais, explicativos, aos elevados índices de mortalidade (40 a 60%) (AL-JASSER & ELKHIZZI, 2004; ALMIRANTE et al., 2005;

ARENDRUP et al., 2005; FALLAAS et al., 2006; MIRANDA & LEVIN, 2007; PAPPAS et al., 2003). Nos Estados Unidos, os índices percentuais de mortalidade cresceram 38% entre a década de 80 e 90 (GUDLAUGSSON et al., 2003; WEY et al., 1988).

Outro aspecto relevante a ser considerado, em relação aos episódios de candidemia, é o alto custo decorrente do atendimento ao paciente, compreendendo diagnóstico, tempo de internação e tratamento (MORGAN et al., 2005). A partir desses dados, é possível concluir que a candidemia é um problema de saúde pública em hospitais terciários de todo o mundo.

1.5.2 Fisiopatologia e via de aquisição

Acredita-se que a maioria dos casos de candidemia seja adquirida por via endógena, pela translocação de *Candida* através do trato gastrointestinal (NUCCI & ANAISSE, 2001). Qualquer variável que provoque desequilíbrio da microbiota ou lesão da mucosa gastrointestinal, pode ser um agente facilitador de translocação de *Candida* spp até os capilares mesentéricos. Sendo assim, fatores que aumentem a colonização intestinal por *Candida* (uso de antibióticos) ou determinem atrofia ou lesão de mucosa intestinal (jejum prolongado, nutrição parenteral total, hipertensão, quimioterapia) pode potencializar o fenômeno de translocação no tubo gastrointestinal (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

Entretanto, em ambiente nosocomial, infecções hematogênicas por *Candida* spp também podem ser adquiridas por via exógena, através do contato das mãos de profissionais de saúde, a partir de cateteres vasculares centrais, implante de próteses contaminadas, bem como pela administração parenteral de soluções contaminadas (BRITO et al., 2006; HINRICHSSEN et al., 2008). A identificação dessa rota de aquisição e transmissão é fundamental para controle e monitoramento clínico, reduzindo o tempo de internação e os custos hospitalares (MÍMICA et al., 2009).

1.5.3 Diagnóstico

O diagnóstico de candidemia é estabelecido, até o presente, por meio de ferramentas metodológicas diversas, tais como, a hemocultura (artesanal, semi-automatizada e automatizada total), testes sorológicos e técnicas de biologia molecular, visando uma melhoria na sensibilidade e especificidade do diagnóstico (FERNANDES et al., 2000). Dentre

as técnicas alternativas, a automação precedida de lise centrifugação, e os sistemas de cultura de sangue com monitoramento contínuo, são indubitavelmente superiores quando comparados aos sistemas de detecção manual (MAGADIA & WEINSTEIN, 2001). Tais sistemas automatizados são constituídos por um sistema de leitura ótica do frasco de hemocultura realizado a cada 10 minutos, agilizando dessa forma o diagnóstico (MAGADIA & WEINSTEIN, 2001). Mesmo assim, apesar deste avanço, ainda possui baixa sensibilidade, pois em apenas 50% dos pacientes com infecção invasiva, ocorre positividade na vigência de infecção da corrente sanguínea (MÍMICA et al., 2009). Considerada a falha no diagnóstico, a disseminação do fungo pode ocorrer, resultando em piora clínica do paciente, ampliação dos efeitos adversos, administração medicamentosa prolongada e, consequentemente, aumento dos custos hospitalares (KAUFFMAN, 2006; MORGAN et al., 2005).

1.6. Testes de suscetibilidade aos antifúngicos

Os testes de sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos (difusão em disco e microdiluição em caldo) são realizados para avaliar e comprovar a sensibilidade ou resistência do fungo isolado, assim como para direcionamento de conduta terapêutica (ESPINEL-INGROFF, 2000). O último, considerado “gold-standard”, tem como princípio expor um inóculo definido do micro-organismo a uma conhecida concentração da droga, cuja leitura final identifica a concentração inibitória mínima (CIM) capaz de inibir o crescimento do agente fúngico, qualificando-o como sensível, sensível dose dependente ou resistente (MEDRANO & RABENHORST, 2004). Vários documentos para padronização dessa metodologia vêm sendo descritos desde 2002 pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Assim, o protocolo intitulado M27-A2, estabelece regras para testes de sensibilidade a drogas antifúngicas por microdiluição em caldo. Recentemente, segue uma nova proposta, denominada M27-A3, CLSI, 2008.

A realização dos testes de sensibilidade aos antifúngicos não é justificável para alguns autores, pelo fato de que a concentração inibitória mínima de antifúngicos não define necessariamente o sucesso terapêutico (SANGLARD & ODDS, 2002). De fato, a resposta imunológica do hospedeiro, a presença do foco infeccioso (próteses e cateteres), a farmacocinética do antifúngico (níveis séricos do antifúngico, interações medicamentosas antagônicas), a espécie de fungo envolvido são elementos essenciais que interferem com a

dinâmica do tratamento (DATRY et al., 2001). Por exemplo, nos pacientes com AIDS e com candidíase oral, há uma boa correlação clínico-laboratorial (GHANNOUM & RICE, 1999; KREMERY, 2000), fato não observado naqueles outros sem imunodeficiência, conforme previamente descrito. Aqui, os testes de sensibilidade realizados em pacientes candidêmicos, HIV negativos, não proporcionam uma prova sólida de detecção de resistência (GHANNOUM & RICE, 1999; VIUDES et al., 2002).

1.7. Epidemiologia molecular

A epidemiologia de *Candida* é muito complexa e os primeiros estudos propuseram a análise das propriedades fenotípicas (MERZ, 1990; PFALLER et al., 1990).

Novas propostas foram estabelecidas, e assim, Pfaller e cols (2000) salientaram a importância da aplicação de métodos de tipagem molecular para isolados microbianos. Essa proposta permite estabelecer dados epidemiológicos para detecção de infecção cruzada, distinção entre re-infecção e reincidência de uma infecção, desenvolvimento de resistência antifúngica durante terapia antifúngica, detecção de linhagens resistentes selecionadas pela pressão antimicrobiana. De fato, atualmente, para se entender a dinâmica do organismo infectante na população humana, estabelecer critérios em relacionamentos complexos de comensalismo ou infecção, compreender os mecanismos genéticos e evolucionários, identificar a origem da infecção ou monitorar a emergência de cepas resistentes, os métodos de tipagem molecular emergem como poderosas ferramentas (LIAN et al., 2003; OLIVE & BEAN, 1999; PASSOS & SILVA, 2007; SOLL, 2000). Dentre as diversas técnicas de biologia molecular empregadas para esse fim, são citadas: eletroforese em campo pulsátil (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* - PFGE), polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP) e polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (*Random Amplified Polymorphic DNA* - RAPD) (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2000). Cada uma tem vantagens e desvantagens quando aplicadas a situações específicas e algumas são consideradas preferenciais para laboratórios de rotina e ou pesquisa (ESPINEL-INGROFF et al., 1999).

A técnica de RFLP é utilizada para caracterizar micro-organismos pelos padrões derivados da clivagem de seu DNA, cujos comprimentos dos fragmentos produzidos podem diferir quando o DNA é digerido com diferentes enzimas de restrição. Os padrões de bandas

gerados podem ser usados para diferenciar espécies de fungos (IROBI et al. 1999; MIRHENDI et al. 2005).

O RAPD é uma técnica que não requer conhecimento prévio do “DNA” a ser analisado (HANULLA et al., 1999), utilizando *primers* de até 10pb (TAYLOR et al., 1999). Os produtos da “PCR” são submetidos a uma corrida eletroforética, onde se obtêm padrões de DNA cujas diferenças ou semelhanças permitem presumir seu grau de parentesco por análise comparativa (VALÉRIO et al., 2006). Daí, se considerar como método de tipagem de grande utilidade para estudos epidemiológicos, visto apresentar poder discriminatório, ser rápido, relativamente barato, de fácil execução e teoricamente aplicável a vários micro-organismos (BAIRES-VARGUEZ et al., 2007; CHONG et al., 2003; CHONG et al., 2007; REISS et al., 1998; SOLL, 2000; VALÉRIO et al., 2006).

Uma segunda opção diagnóstica, o PFGE vem sendo descrito como melhor ferramenta para estudos de epidemiologia molecular onde a cariotipagem eletroforética é muitas vezes discriminatória (CHEN et al., 2005; JANG et al., 2005; HERSCHLEB et al., 2007). De fato, estudo realizado por Chen e cols (2005), comparando quatro métodos moleculares de investigação epidemiológica, apresentou o PFGE (utilizando o processo de digestão com duas enzimas de restrição) como melhor ferramenta para análise molecular.

De modo geral, a utilização de um único método nem sempre é satisfatória e pode induzir a um resultado equivocado. Portanto, a combinação de dois métodos ou mais pode servir como melhor ferramenta para investigação da relação genética entre micro-organismos (ALMEIDA et al., 2007; VALÉRIO et al., 2006).

1.8. Condição microbiológica do ambiente hospitalar

O meio ambiente hospitalar, incluindo o ar, a água e as superfícies inanimadas que cercam o paciente, guarda íntima relação com as infecções hospitalares, podendo proporcionar focos de contato e transmissão (ANDRADE et al., 2000; CURTIS, 2008; MOBIN & SALMITO, 2006; STOLL & MOREIRA, 2009).

Embora as causas de infecção hospitalar sejam multivariadas, uma parcela de responsabilidade relaciona-se aos padrões de assepsia e de higiene do ambiente hospitalar, além das boas práticas envolvendo corpo clínico (ANDRADE et al., 2000; MATOS et al., 2004).

Dentre as atividades executadas no cotidiano dos hospitais há a limpeza de unidade, reconhecendo-a como uma das formas de manter o ambiente hospitalar biologicamente seguro (ANDRADE et al., 2000). Nesse sentido, dois tipos de limpeza de unidade hospitalar são adotados: concorrente e terminal. A concorrente é aquela realizada diariamente em algumas partes da unidade e em objetos pessoais após o seu uso. Já a limpeza terminal é conduzida em todos os componentes da unidade e tem sido indicada quando o paciente desocupa o leito por motivo de alta, óbito, transferência, período de hospitalização prolongada e nos casos de término de isolamento (ZANCONATO et al., 2007). De uma maneira geral, os dois tipos de limpeza são realizados para a remoção de sujidade, com a finalidade primordial de impedir a disseminação de micro-organismos que colonizam as superfícies horizontais dos mobiliários (PANNUTI, 1997). Para tal, a adoção de produtos químicos com ação germicida, eficazes para a remoção e destruição de micro-organismos, é recomendada pelo ministério da saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998). Entre outros, são indicados alguns aldeídos, compostos fenólicos, quaternários de amônia, compostos orgânicos liberadores de cloro ativo, iodo e derivados, álcoois, glicóis e biguanidas (SVIDZINSKI et al., 2007).

Os principais pré-requisitos que devem ser levados em conta para um agente químico ser utilizado com ação germicida são: apresentar amplo espectro de ação antimicrobiana; ser capaz de inativar rapidamente os micro-organismos; não ser corrosivo para metais; não danificar artigos ou acessórios de borracha ou plástico, nem equipamentos ópticos; sofrer pouca interferência de outros produtos químicos; ser inodoro ou ter odor agradável; não ser irritante para a pele e mucosas; possuir baixa toxicidade; tolerar pequenas variações de temperatura e de pH (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

Para a seleção de um produto químico também devem ser consideradas características dos micro-organismos, assim como a forma em que os mesmos costumam se encontrar; os esporulados resistem muito mais do que aqueles que permanecem na forma vegetativa. Além disso, é importante levar em consideração ao seu número (concentração do inóculo) a ser destruído (SVIDZINSKI et al., 2007).

Entre os agentes químicos mais utilizados atualmente nos hospitais, o hipoclorito de sódio e o ácido peracético são considerados os que melhor atendem aos requisitos de um desinfetante. O hipoclorito de sódio é um agente químico utilizado para desinfecção de nível médio de artigos e superfícies; é de baixo custo, mas necessita de análise do teor do princípio ativo antes do uso e oferece risco ambiental, pois persiste no meio ambiente por oito anos

(SVIDZINSKI et al., 2007). O ácido peracético proporciona maior segurança durante a execução do serviço, diminuindo os riscos relativos à saúde ocupacional, e é altamente compatível com o meio ambiente, pois é um composto biodegradável. Porém deve ser manuseado sempre em local seco e ventilado e ser evitada a incidência de luz solar direta. É indicado o uso de equipamento de proteção individual (avental, luvas, protetor ocular ou facial e outros) durante o seu manuseio (CAREGNATO et al., 2002). Apesar destas considerações, observa-se uma tendência em substituir o hipoclorito de sódio pelo ácido peracético para a maioria dos hospitais (SVIDZINSKI et al., 2007).

RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) em parceria com o Hospital de Base (HB) de São José do Rio Preto, SP, vem desenvolvendo projetos de pesquisa que visam o isolamento, identificação e manutenção de coleção de culturas de espécies microbianas de importância clínica. A análise da suscetibilidade antifúngica por microdiluição, formalizada para otimizar a caracterização fenotípica das leveduras por auxiliar na tipagem, foi proposta do presente projeto. Além disso, a avaliação da relação genética, a partir de RAPD e PFGE correlacionado aos perfis de sensibilidade dos isolados, obtidos tanto de fonte clínica como ambiental, poderá elucidar as possíveis vias de aquisição e transmissão para posterior adoção de medidas de controle das mesmas, além de monitorar a sensibilidade dos isolados.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Realizar a tipagem epidemiológica de isolados clínicos e ambientais de *Candida* spp, assim como de outras espécies de leveduras, a partir de métodos fenotípicos e genotípicos.

3.2. Objetivos específicos

- Reconhecer as espécies responsáveis pela infecção de sangue e contaminação de leitos.
- Determinar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos dos isolados clínicos e ambientais pela técnica microdiluição em caldo;
- Estabelecer a definição das espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis* através da técnica de RFLP;
- Comparar o perfil genético com a resposta de suscetibilidade aos antifúngicos;
- Identificar relação clonal dos isolados.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Seleção das amostras

Durante o período entre agosto de 2007 a outubro de 2009, com a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa, protocolo 2848-2007, os isolados clínicos e ambientais foram obtidos de pacientes sob critério de internação localizados tanto Hospital de Base, como no Hospital Beneficência Portuguesa de São José do Rio Preto, SP.

Entre os pacientes internados, a candidemia foi comprovada por hemocultura (Becton Dickinson BACTEC 9240). Seguida da identificação micológica por métodos convencionais de identificação bioquímica. Também foram considerados objetos de estudo, amostras do leite, de tais pacientes com candidemia.

Para critério de seleção dos colchões utilizou-se paciente com candidemia, sendo a colheita de 5 quadrantes, realizada com *swab* umidecido em solução salina 0.85% esterilizada (Anexo III). Mediante alta, óbito ou transferência, este mesmo leite era reavaliado microbiologicamente pela segunda vez, antes e após a limpeza terminal.

A identificação micológica foi realizada no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (SP). A origem hospitalar dos isolados, tipo de material analisado, data da colheita, unidade de onde foram obtidos, bem como a data de internação, estão apresentados no apêndice I. Além disso, realizou-se uma revisão dos prontuários de cada paciente, com o preenchimento de fichas cadastrais, apresentando dados clínicos e pessoais, tais como, sexo, idade, data de internação, local de internação, data de saída, diagnóstico laboratorial, data da hemocultura e evolução do paciente.

4.2. Identificação das leveduras

4.2.1 Características macromorfológicas

As espécies foram identificadas e os critérios morfológicos e bioquímicos estabelecidos de acordo com os aspectos macromorfológicos da colônia, tais como, textura

(glabrosa seca, glabrosa úmida, glabrosa mucóide), relevo (sem relevo, cerebriforme), presença ou não de pigmento e coloração. Importante ressaltar que o CHROMagar *Candida*® (Anexo I) foi utilizado como meio primário de estudo.

4.2.2 Características micromorfológicas

4.2.2.1 Teste de formação do tubo germinativo

O teste de formação do tubo germinativo, análise fisiológica ou funcional baseou-se no protocolo descrito por Lacaz e cols (2002), cuja formação em tubo consistiu em uma projeção alongada, sem constrição, que emerge da levedura, quando em contato com o soro (1,0 ml). Após o tempo considerado, intervalo de tempo de 2 horas, removeu-se, com auxílio de uma pipeta Pasteur, uma gota da suspensão e colocou-se entre lâmina-lamínula para ser examinada ao microscópio óptico, com objetivas de 10 a 40x. A formação de início de filamentação (tubo germinativo) dentro deste período foi considerada como resultado positivo e confirmou a identificação da espécie *C. albicans*.

4.2.2.2 Microcultivo em Corn-Meal com Tween 80

A técnica baseou-se no princípio de que a incubação das leveduras em meio Tween 80 e sob baixa tensão de oxigênio, estimulou a produção de conídios e/ou pseudo-filamentação. Segundo Lacaz e cols (2002), após o preparo do ágar fubá com Tween 80 (Anexo I), distribuído em lâminas, a semeadura era realizada com alça de platina estéril, em 3 estrias paralelas sobre o ágar, de 4 a 4 cm de extensão e equidistantes de 3 a 4 mm umas das outras. As estrias foram recobertas na sua porção central, com lamínula esterilizada de 20 mm². Inseriu-se em câmara úmida e incubou-se a 30°C, durante 48 a 96 horas. No momento da observação, a lâmina era removida e posicionada no microscópio óptico. A área estriada era examinada, com as objetivas de 10x e 40x, visando detectar as estruturas micro morfológicas.

4.2.3 Provas fisiológicas de identificação das leveduras

A identificação das leveduras prosseguiu as provas de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio segundo descrição por Lacaz e cols (2002).

4.2.3.1 Assimilação de fontes de carbono

A assimilação de carbono referiu-se à habilidade que uma levedura tem de crescer aerobicamente na presença de determinado carboidrato fornecido como única fonte de carbono. Para assimilação em meio sólido empregou-se ágar destituído de qualquer fonte de carbono, adicionado da suspensão da levedura e distribuído em placa. A positividade foi avaliada pela observação do halo de crescimento preferencial da levedura na presença dos carboidratos: dextrose, galactose, trealose, xilose, lactose, sacarose, celobiose, inositol, melibiose, rafinose, dulcitol e maltose. Assim, preparou-se uma suspensão de levedura com crescimento recente (24 a 48 horas) em 2 ml de água destilada esterilizada, ajustando-se posteriormente a turbidez de acordo com o padrão de número cinco da escala de McFarland. O meio *Yeast Nitrogen Base* (Anexo I) previamente preparado, de acordo com as normas do fabricante, foi armazenado em tubos de 20 x 200 mm, contendo 20 ml e 10 ml do meio, a 4°C. No momento do uso, os tubos foram submetidos a uma temperatura de 50°C em banho-maria. Após a estabilização da temperatura, 1,5 ml da suspensão da levedura foi adicionado a 30 ml do meio e vertidos em placas de Petri esterilizadas, de 150 x 15 mm. Simultaneamente, suaves movimentos de rotação da placa com inóculo foram feitos com a finalidade de homogeneizá-lo ao meio de cultura. Após solidificar, a placa foi disposta sobre cartela-guia, onde os nomes dos açúcares foram distribuídos. Pequenas alíquotas dos carboidratos foram distribuídas equidistantes sobre o ágar, com auxílio de espátulas individuais esterilizadas. As placas foram incubadas a 25-30°C, durante 24 a 48 horas e a leitura realizada após 48 horas, sendo a positividade observada através do surgimento de halo de crescimento, na área correspondente a cada carboidrato. A dextrose foi utilizada como controle positivo para avaliar a viabilidade do inóculo da levedura.

4.2.3.2 Assimilação de fontes de nitrogênio

A assimilação do nitrogênio consiste na habilidade das leveduras em crescer aerobicamente na presença de um composto nitrogenado inorgânico fornecido como única fonte de nitrogênio. Para assimilação de fontes nitrogenadas em meio sólido empregou-se ágar destituído de qualquer fonte de nitrogênio, adicionado da suspensão da levedura, e distribuído em placa. Após a solidificação, foram distribuídos em compostos nitrogenados inorgânicos e um orgânico sobre o ágar. Preparou-se uma suspensão recente da levedura (24 a 48 horas) em 1 ml de água destilada esterilizada, ajustando-se posteriormente a turbidez, de

acordo com o padrão número cinco da escala de McFarland. Para tal, o meio *Yeast Carbon Base* (Anexo I) foi previamente preparado, de acordo com as normas do fabricante e armazenado em tubos de 20 x 200 mm, contendo 20 ml do meio, a 4°C. No momento do uso, os tubos foram submetidos a uma temperatura de 50°C em banho-maria. Após a estabilização da temperatura, 1 ml da suspensão da levedura foi adicionado a 20 ml do meio e vertidos em placa de Petri de 90 x 15 mm esterilizada. Simultaneamente foram realizados suaves movimentos de rotação da placa, com a finalidade de homogeneizar o inóculo. Após solidificação do meio, a placa foi disposta sobre cartela-guia, onde pequenas alíquotas das fontes de nitrogênio foram distribuídas equidistantes sobre o ágar, com auxílio de espátulas individuais esterilizadas. As placas foram incubadas a 25-30°C, durante 24 a 48 horas a partir de que a leitura positiva fosse feita por meio de um halo de turvação em torno das fontes nitrogenadas.

4.2.4 Produção de ascósporo

Algumas espécies de leveduras formam ascos, que alojam esporos sexuais, as ascosporas. A observação dessas estruturas é importante para a identificação da levedura. Para estimular a produção de ascosporas é necessário cultivar o isolado em meios especiais. Objetivando-se distinguir leveduras ascosporadas, a levedura foi semeada em meio Gorodkova (Anexo I). Após 7 dias, foi realizado esfregaço em lâmina, corado pela técnica de Ziehl Nielsen (Anexo I), sendo a forma e o tamanho dos ascos observados em microscópio com objetiva de 100 x (LACAZ et al., 2002).

4.3. Teste de sensibilidade aos antifúngicos

Os micro-organismos isolados e identificados foram testados por microdiluição em caldo, realizados de acordo com a padronização publicada no documento M27-A2 pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2002). Além dos isolados clínicos e ambientais, foi incluído em cada ensaio, a levedura *Candida kruzei* ATCC 6258, como referência padrão. Para tal, utilizou-se meio líquido RPMI-1640 (*Sigma Chemical Co., St Louis, MO*) (Anexo I) tamponado com ácido morfopropileno sulfônico (MOPS; Sigma) e

glicose 2% (modificação do documento M27-A2, com base no EUCAST, 2002) ajustando-se o pH em 7,0 com ácido clorídrico.

As leveduras foram previamente subcultivadas em ágar Sabouraud dextrose (Oxoid) e incubadas por 24 horas a 35°C. A padronização dos inóculos foi realizada utilizando a escala 0,5 de MacFarland e ajustada em 90% de transmitância em espectrofotômetro (Biospectro), em comprimento de onda de 530 nm. Os antifúngicos utilizados, anfotericina B, cetoconazol, fluconazol e itraconazol foram fornecidos sob a forma de pó, pela indústria farmacêutica Sigma, cujas concentrações variaram de 0,125 a 64 µg/ml para o fluconazol e de 0,03 a 16 µg/ml para itraconazol, cetoconazol e anfotericina B. Foram utilizadas microplacas estéreis com 96 poços (cralplast) inoculando-se apenas um antifúngico por placa, da menor para a maior diluição. As dez concentrações de cada antifúngico preparadas foram colocadas em sentido vertical na placa, nas colunas de 1 a 11. Cada coluna correspondeu a uma concentração diferente. As colunas 1 e 12 foram utilizadas como controle, a 1 controle de esterilidade e a 12, controle de crescimento. O inóculo foi dispensado na quantidade de 100 µl, nas colunas de 2 a 12. As placas foram agitadas em agitador de Micro Placas MA 562 e incubadas em estufa úmida a 35°C por 24 horas.

Segundo o documento M27-A2 padronizado em 2002 pelo CLSI, os critérios de corte para definição de sensível, sensível dose dependente e resistência, foram considerados conforme a tabela 1.

Tabela 1 – Valores de ponto de corte sugeridos para interpretação de testes de suscetibilidade de leveduras.

Suscetibilidade	Antifúngicos - CIMs (µg/ml)			
	Fluconazol	Itraconazol	Cetoconazol	Anfotericina B*
Sensível	≤ 8	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 1
SDD	16 e 32	0,25 e 0,5	0,25 e 0,5	–
Resistente	≥ 64	≥ 1	≥ 1	≥ 2

SDD – sensível dose-dependente.

µg/ml – micrograma por mililitro

≤ – menor ou igual a

≥ – maior ou igual a

* Anfotericina B não possui pontos de corte pelo documento CLSI, 2002. Foi utilizado o critério de suscetibilidade segundo estudo de Klein & Ribeiro, 2006.

4.4. Análise da epidemiologia molecular

As amostras previamente identificadas por métodos fenotípicos, foram submetidas à análise genética pelas técnicas que mostram polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*-RFLP), polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (*Random Amplified Polymorphic DNA* – RAPD) e eletroforese em campo pulsátil (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* - PFGE).

4.4.1. Extração do DNA genômico para leveduras

Uma colônia de cada levedura isolada foi semeada em placa de ágar Sabouraud dextrose e incubada por até 96 horas a 30°C; para extração do DNA genômico foi utilizado o protocolo descrito por Bolano e cols (2001). Para este procedimento, todas as colônias obtidas foram transferidas para um tubo de microcentrífuga de 2 ml, contendo 500 µl de tampão de lise TENTIS (Anexo I). Seguiu-se a adição de um volume relativo a 200 µl de pérolas de vidro (2 mm de diâmetro), posteriormente foi adicionado 500 µl de fenol e 500 µl de clorofórmio, respectivamente. Os tubos foram agitados em vórtex por 2 minutos, para a obtenção de uma solução homogênea, e em seguida, centrifugados a 15.700 g por 15 minutos em temperatura ambiente.

Após essa etapa, a fase superior foi transferida para um novo tubo (2 ml) previamente identificado, sendo adicionado 500 µl de etanol 100% gelado (-20°C). O DNA foi precipitado a -20°C durante uma hora, com posterior centrifugação a 15.700g por 15 minutos (temperatura ambiente). Após descarte do sobrenadante, o sedimento foi suspenso em 500 µl do tampão Tris-EDTA (TE) com RNase A (Fermentas; 10 mg/ml) (Anexo I) e incubado a 37°C por 30 min. Adicionou-se novamente 500 µl de fenol e 500 µl de clorofórmio. Nova centrifugação, a fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo (1,5 ml) previamente identificado. À fase aquosa foi adicionado 20 µl de NaCl (5M) (Anexo I), seguido por 500 µl de etanol 100% gelado (-20°C). O DNA foi precipitado a -20°C por uma hora (ou “overnight”). Seguiu-se ao processo de centrifugação, onde o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 500 µl de etanol 70% (Anexo I) centrifugado por 15 minutos; após a remoção do sobrenadante, o sedimento foi ressuspenso em 40 µl de tampão Tris-EDTA (TE) (Anexo I).

Com o objetivo de analisar a pureza do DNA, utilizou-se espectrofotômetro com comprimento de onda 260/280 nm (Biophotometer Eppendorf). A razão entre as leituras DO_{260}/DO_{280} permitiu a estimativa da pureza do DNA, ideal entre 1,8 e 2,0. Quando a razão apresentou valor abaixo de 1,6 indicava grande quantidade de contaminantes e proteínas, e na sua ocorrência, a extração era realizada novamente.

4.4.1.1 RFLP

4.4.1.1.1 Sequências iniciadoras

Segundo Trost e cols (2004), a metodologia de RFLP, baseada na lise do DNA com enzimas de restrição, foi adotada com o objetivo de estabelecer a definição das espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Para tanto, os *primers* CD1 (SIGMA) (5'-GTC AAA CTT GGT CAT TTA-3') e CD2 (SIGMA) (5'-TTC TTT TCC TCC GCT TAT TGA-3') foram utilizados para amplificar os fragmentos dos genes ribossomais (Anexo I).

4.4.1.1.2 Reações de amplificação

Para a reação de PCR, realizada num volume de 50 µl, foram adicionados 5,0 µl de Tampão 10X-Buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl), 3,0 µl de $MgCl_2$ (50mM), 0,25 µl de dNTP (10mM), 1,0 µl de cada *primer* (20 pmol/µl), 0,1 µl de Taq-DNA polymerase (Fermentas; 5U/µl), 36,15 µl de água DEPC (Gibco) e 5,0 µl de DNA (40 ng/µl). A reação de PCR foi realizada no termociclador GeneAmp® PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA), segundo a programação: ciclo inicial de 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e um último de extensão de 72°C por 10 minutos.

4.4.1.1.3 Eletroforese

Os produtos obtidos na reação de PCR foram visualizados na eletroforese em gel de agarose (400 mA a 100 volts durante 1 hora) na concentração de 2,0% (Anexo I) em solução tampão TBE 1,0X (Tris/Borato/EDTA) (Anexo I) com solução de 0,08 µl brometo de etídio (Invitrogen; 10 mg/ml) (Anexo I) em 100 ml de água destilada.

4.4.1.1.4 Digestão enzimática

De acordo com o protocolo descrito por Trost e cols (2004), para realizar a digestão enzimática, foi utilizado 12 µl do produto da PCR, 2,0 µl do Tampão 1X NEBuffer 3 (100 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, 10 mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol, pH 7,9), 0,2 µl da enzima MwoI (Bio Labs; 5U/ml) e 5,8 µl de água DEPC (Gibco). A mistura foi incubada a 60°C por 2 horas.

Os fragmentos da digestão foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2,0% utilizando o tampão TBE 1,0X com solução de 0,08 µl brometo de etídio (Invitrogen; 10 mg/ml) em 100 ml de água destilada. Foram adicionados 10 µl dos produtos de PCR a 2 µl de tampão Blue Juice e a eletroforese incidiu com os seguintes parâmetros: 400 mA a 100 volts durante 1 hora. Utilizou-se o marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas). Para visualização das bandas se utilizou o software Kodak Gel Logic 2200 Imaging System (Molecular Imaging Software).

4.4.1.2 RAPD

4.4.1.2.1 Sequências iniciadoras e reações de amplificação

A metodologia do RAPD foi adotada com o objetivo de reconhecer padrões genéticos entre as leveduras em estudo. Para isso foram utilizados 5 *primers*: B14 (SIGMA) - (5' – GAT CAA GTC C - 3'); CDU (Bio Neer) - (5' – GCG ATC CCC A - 3'); M2 (SIGMA) - (5' – CTT GAT TGC C - 3'); OPE-18 (SIGMA) - (5' – GGA CTG CAG A - 3') e o *primer* 6 (SIGMA) - (5' – CCC GTC AGC A - 3').

O *primer* B14, baseado no protocolo descrito por Mariano e cols (2003), foi utilizado frente aos isolados de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis*. A reação de RAPD ocorreu num volume de 25 µl onde foram adicionados 40ng do DNA genômico, 2,5 µl de Tampão 10X-Buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl; 3,5 mM MgCl₂), 4,0 µl de dNTP (1,25 mM), 0,4 µM de *primer* (50 pmol/µl), 0,5% (vol/vol) de Tween 20 e 1 unidade de Taq-DNA polymerase (Fermentas; 5U/µl). As condições de amplificação, realizadas em termociclador GeneAmp® PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA), consistiram em desnaturação inicial de 94°C por 1 minuto seguido de 45 ciclos a 94°C por 1 minuto, 40°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos. No último ciclo a temperatura de 72°C foi mantida por um período de extensão de 10 minutos.

Para o estudo dos isolados de *C. glabrata* assim como de *C. guilliermondii*, foi utilizado o *primer* OPE-18 (BOLDO et al., 2003). Com adaptações, a reação de RAPD ocorreu num volume de 25 µl onde foram adicionados 40ng do DNA genômico, 25 µl da reação de RAPD contendo 2,5 µl de Tampão 10X-Buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl; 3,5 mM MgCl₂), 4,0 µl de dNTP (1,25 mM), 0,4 µM de *primer* (50 pmol/µl), 0,5% (vol/vol) de Tween 20, 1 U de Taq-DNA polymerase (Fermentas; 5U/µl). Com variação, o protocolo descrito tanto para *C. guilliermondii* como para *C. glabrata* correspondeu à desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos seguido de 38 ciclos a 94°C por 1 minuto, 36°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, e com uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

Segundo o estudo realizado por Melo e cols (1998), o *primer* M2 foi utilizado para genotipagem de *C. tropicalis*. A reação de RAPD ocorreu num volume de 25 µl onde foram adicionados 40ng do DNA genômico, 2,5 µl de Tampão 10X-Buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl; 3,5 mM MgCl₂), 4,0 µl de dNTP (1,25 mM), 0,4 µM de *primer* (50 pmol/µl), 0,5% (vol/vol) de Tween 20, 1 unidade de Taq-DNA polymerase (Fermentas; 5U/µl). As condições de amplificação consistiram em desnaturação inicial de 94°C por 1 minuto seguido de 45 ciclos a 94°C por 1 minuto, 40°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos. No último ciclo a temperatura de 72°C foi mantida por um período de extensão de 10 minutos.

Seguiu-se o protocolo de Pasqualotto e cols (2005), para o qual o *primer* CDU foi utilizado para genotipagem de *Pichia anomala*. A reação de RAPD ocorreu num volume de 25 µl onde foram adicionados 40ng do DNA genômico, 2,5 µl de Tampão 10X-Buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl; 3,5 mM MgCl₂), 5,0 µl de dNTP (1,25 mM), 0,4 µM de *primer* (50 pmol/µl), 0,5% (vol/vol) de Tween 20, 1 unidade de Taq-DNA polymerase (Fermentas; 5U/µl). A ciclagem inicial foi de 94°C por 5 minutos seguida de 45 ciclos a 94°C por 1 minuto, 40°C por 1 minuto, 72°C por 2,5 minutos, e com uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

Isolados de *Trichosporon asahii*, foram avaliados utilizando o *primer* 6, cuja metodologia foi descrita por Silva e cols (2008). Devido a ausência do protocolo de amplificação no trabalho realizado por Silva e cols (2008), houve uma padronização da reação de RAPD, a qual ocorreu num volume de 25 µl com 40ng do DNA genômico, 2,5 µl de Tampão 10X-Buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl; 3,5 mM MgCl₂), 4,0 µl de dNTP (1,25 mM), 0,4 µM de *primer* (50 pmol/µl), 0,5% (vol/vol) de Tween 20, 1 unidade de Taq-DNA polymerase (Fermentas; 5U/µl). A amplificação dos isolados de *T. asahii* decorreu

de uma desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos seguida de 45 ciclos a 95°C por 1 minuto, 36°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, e com uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

4.4.1.2.2 Eletroforese

Foi utilizado gel de agarose (Ultra Pure Agarose, Invitrogen) na concentração de 1,5%, em solução tampão TBE 1X com solução de 0,8 µl de brometo de etídio (Invitrogen; 10mg/ml) em 100 µl de água destilada. Foram adicionados 10 µl dos produtos de PCR a 2 µl de tampão Blue Juice e a eletroforese incidiu com os seguintes parâmetros: 400 mA a 100 volts durante 3 horas. Utilizou-se o marcador de peso molecular 1 kb (Fermentas) e o de 100 pb (Fermentas). Para visualização das bandas se utilizou o aparelho Kodak Gel Logic 2200 Imaging System (Molecular Imaging Software).

4.4.1.2.3 Avaliação da similaridade dos padrões de bandas

A análise dos resultados gerados pelo método do RAPD foi realizada por dendrograma utilizando o programa GEL COMPAR II versão 4.5 Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) através de análise de agrupamento, de acordo com a similaridade dos padrões de bandas obtidos.

Os géis foram comparados entre si, após o aporte de suas imagens pelo programa Gel Compar II. Este programa corrige distorções, como padrões de sorriso, detectados no gel através da comparação com um padrão universal e seleciona automaticamente as bandas presentes no gel. Na construção dos dendrogramas, níveis de similaridade entre os perfis foram calculados utilizando o coeficiente de Dice e as análises das matrizes de similaridade foram realizadas utilizando o método aritmético para dados não pareados (UPGMA). A tolerância escolhida para comparar as bandas foi de 2% (Soll, 2000).

4.4.2 PFGE

4.4.2.1 Extração do DNA cromossômico para leveduras

O preparo das células para extração do DNA cromossômico foi realizado segundo o método preconizado por Lemes & Colombo (1998) com modificações. Assim, colônias de leveduras (10 a 20 UFC), isoladas a partir de culturas puras de 48 horas em ágar Sabouraud dextrose, foram inoculadas em 10 ml de caldo YPD (Yeast Peptone Dextrose) (Anexo I) e

mantidas a 30°C sob agitação, “overnight”. Após esse período, transferiu-se para tubos de microcentrífuga e foram centrifugadas a 4°C por 15 minutos (0.800 g). Após descartar o sobrenadante, as células foram ressuspensas com 500 µl de água milli Q e realizada nova centrifugação; agora o sobrenadante foi desprezado e o tubo foi pesado. Este peso (final) foi subtraído do peso inicial e a diferença em mg, foi adicionada em µl à volume igual de 50 mM EDTA (pH 8,0) (Anexo I). A suspensão de células foi agitada e 150 µl transferidos para outro tubo estéril. As células foram lavadas com 200 µl da solução de EDTA (50 mM, pH 8,0), agitadas e centrifugadas novamente por dois minutos e o sobrenadante desprezado. Foram adicionados ao sedimento 150 µl de EDTA (50 mM, pH 8,0), 80 µl de solução de “Lyticase” (SIGMA; 100 U/80 µl) (Anexo I) e incubado à 37°C, por 30 minutos. À suspensão foram acrescentadas 560 µl de agarose Low melt (Bio-Rad) (Anexo I), na concentração de 1%, dissolvida em EDTA (0,5 M, pH 7,5), dispensando em moldes de acrílico (Bio-Rad) para a preparação dos pequenos blocos de gel de agarose. O conjunto foi mantido em refrigeração, a 4°C por período mínimo de 60 minutos. Após essa etapa, os blocos foram imersos em proteinase K, na concentração de 1 mg/ml em solução tampão (Anexo I) e incubados a temperatura de 50°C “overnight”. A proteinase K foi então retirada, e seguiram cinco lavagens com solução de EDTA (50 mM, pH 8,0). A cada lavagem a placa era levada ao mixer por 30 minutos, à temperatura ambiente. Ao final, adicionou-se nova solução de EDTA (50 mM, pH 8,0) e o conjunto foi mantido a 4°C por até 6 meses.

4.4.2.2 Condições eletroforéticas

O gel de agarose para a cariotipagem (Bio-Rad Laboratories) foi usado na concentração de 1,0% (Anexo I) em solução tampão TBE 0,5X (Anexo I). Os blocos de agarose, contendo o DNA cromossômico, foram colocados na base dos dentes do pente e envolvidos pela agarose liquefeita, à temperatura de 45 a 50°C.

O aparelho CHEF DRII foi utilizado e a programação seguiu com tempo inicial de 120 segundos e o final de 480, com um tempo de corrida equivalente a 25 horas. A temperatura do tampão TBE 0,5X concentrado foi mantida em 14°C com voltagem de 4,5 volts/cm e o ângulo de 120°.

Ao término da corrida, o gel foi corado com solução de brometo de etídio, em água destilada com uma concentração final de 1,0 µg/ml (Anexo I), durante 15 minutos, descorado

em água destilada, visualizado sob luz UV e fotografado no aparelho Kodak Gel Logic 2200 Imaging System (Molecular Imaging Software).

4.4.2.3 Avaliação da similaridade dos padrões de bandas

Os padrões genéticos obtidos após cariotipagem foram analisados por dendrograma utilizando o programa GEL COMPAR II versão 4.5 Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) de onde os níveis de similaridade foram calculados utilizando o coeficiente de Dice e as análises das matrizes de similaridade foram construídas utilizando o método aritmético para dados não pareados (UPGMA). A tolerância escolhida para comparar as bandas foi de 2% (Soll, 2000).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Identificação das amostras

Foram analisados 119 episódios de candidemia ocorridos em 98 pacientes internados nas duas Instituições em estudo, no período entre agosto de 2007 a outubro de 2009.

Na Tabela 2 observa-se a distribuição dos casos de candidemia de acordo com a faixa etária do paciente, os quais foram frequentes em pacientes com idade inferior a 1 ano e superior a 60 anos. De 26 casos observados na população pediátrica, cerca de 98% das crianças tinham idade até 4 anos (H1 e H2).

Com relação ao gênero, a distribuição foi correspondente para ambas Instituições de origem, H1 e H2; 48% e 51% corresponderam aos percentuais do gênero feminino e masculino, respectivamente. A evolução dos pacientes com candidemia correlacionada às espécies fúngicas estão apresentadas na Tabela 3.

Considerando-se o período de internação (grupo geral), observou-se uma média de 35 dias. No entanto, 12 pacientes foram internados em função da infecção (H1 e H2).

A frequência de óbitos observada nesta investigação foi de 61%. Conforme observado na Tabela 3, houve predominância, com relação ao grupo de óbitos dos adultos em relação às crianças (68% e 39%, respectivamente), e frente à unidade de internação, UTIs e enfermarias (68% e 26%, respectivamente). Separado por espécie fúngica, em 35 ocorrências de candidemia por *C. albicans*, observou-se óbito em 23 pacientes.

Tabela 2 – Distribuição dos casos de candidemia por faixa etária no Hospital 1 e no Hospital 2, agosto/2007–novembro/2009.

Idade (anos)	H1		H2	
	N	%	N	%
< 1	0	0	18	24
1 a 4	1	4	6	8
5 a 9	0	0	1	1,5
10 a 14	0	0	0	0
15 a 19	0	0	3	4
20 a 29	0	0	1	1,5
30 a 39	2	9	7	9
40 a 49	1	4,5	7	9
50 a 59	4	17,5	9	12
60 a 64	3	13	6	8
>65	12	52	17	23
Total	23	100	75	100

H1: Hospital 1

H2: Hospital 2

N: Número

%; Porcentagem

<: Menor

>: Maior

Tabela 3 – Evolução dos 98 pacientes com candidemia e distribuição microbiana (Hospital 1 e Hospital 2), agosto/2007–novembro/2009.

Características	Óbitos		Sobreviventes		Total	
	H1 (%)	H2 (%)	H1 (%)	H2 (%)	H1 (%)	H2 (%)
Gênero						
Feminino	3 (13)	23 (31)	8 (35)	15 (20)	11 (48)	38 (51)
Masculino	7 (30)	26 (35)	5 (22)	11 (14)	12 (52)	37 (49)
Total	10 (43)	49 (66)	13 (57)	26 (34)	23 (100)	75 (100)
Idade						
Criança (≤ 14)	0 (0)	11 (14,5)	3 (13)	14 (18,5)	3 (13)	25 (33)
Adulto	10 (43,5)	38 (51)	10 (43,5)	12 (16)	20 (87)	50 (67)
Total	10 (43,5)	49 (65,5)	13 (56,5)	26 (34,5)	23 (100)	75 (100)
Espécies						
<i>C. albicans</i>	7 (26)	16 (17)	5 (19)	7 (7,5)	12 (46)	23 (25)
<i>C. dubliniensis</i>	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
<i>C. glabrata</i>	0 (0)	0 (0)	1 (4)	1 (1)	1 (4)	1 (1)
<i>C. metapsilosis</i>	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
<i>C. orthopsilosis</i>	2 (8)	5 (5)	0 (0)	2 (2)	2 (8)	7 (7)
<i>C. parapsilosis</i>	2 (8)	15 (16)	5 (19)	11 (12)	7 (27)	26 (28)
<i>C. tropicalis</i>	2 (8)	16 (17)	2 (8)	7 (7,5)	4 (15)	23 (25)
<i>P. anomala</i>	0 (0)	4 (4)	0 (0)	8 (9)	0 (0)	12 (12)
Total	13 (50)	57 (61)	13 (50)	36 (39)	26 (100)	93 (100)

$\leq$: Menor ou igual a

C: *Candida*

P: *Pichia*

UTI Neo.: Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal

UTI Ped.: Unidade de Tratamento Intensivo Pediátrica

5.2. Distribuição das candidemias

Os índices gerais de correlação de candidemia com as espécies fúngicas, considerando-se as respectivas áreas de internação, estão apresentados nas Tabelas 4A e B.

Amostras seriadas foram identificadas em 12 pacientes (seis óbitos), com isolamento de 33 leveduras. Dentre esses pacientes, o múltiplo episódio de fungemia foi detectado para um único dia, até quatro meses, cujas espécies corresponderam a: *C. parapsilosis* (6), *P. anomala* (4), *C. orthopsilosis* (2) de ocorrência no Hospital 2 e *C. albicans* (1), no Hospital 1. De um único caso, foram encontradas duas espécies responsáveis pela infecção sistêmica, isoladas em períodos distintos: de 14/03/2009 a 08/10/2009, com *C. parapsilosis* (N=5) e *P. anomala* (N=3), respectivamente; sendo que, o primeiro episódio, ocorreu após um mês da internação (UTI Neonatal), com re-isolamento para a mesma espécie fúngica em outros 4 episódios. Após sua transferência para UTI Pediátrica foi observada uma mudança na etiologia, para *P. anomala*, reconhecendo-se que o tempo de permanência nesta unidade foi de 30 dias.

A distribuição geográfica dos isolados no **Hospital 1**, mostrou que *C. albicans* foi prevalente nas UTIs Gerais, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* nas enfermarias (Tabela 4A). Já no **Hospital 2**, a distribuição geográfica foi incidente para UTIs Gerais, com *C. albicans* e *C. tropicalis* e UTI Neonatal para *C. parapsilosis* (Tabela 4B).

Tabela 4A – Distribuição das espécies isoladas de hemoculturas nas unidades hospitalares (Hospital 1).

Espécies	Enfermarias		UTIs		UTI		Total	
			Gerais		Ped.			
	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>C. albicans</i>	4	16	8	30	0	0	12	46
<i>C. glabrata</i>	1	4	0	0	0	0	1	4
<i>C. orthopsilosis</i>	1	4	1	4	0	0	2	8
<i>C. parapsilosis</i>	5	19	1	4	1	4	7	27
<i>C. tropicalis</i>	3	11	1	4	0	0	4	15
Total	14	54	11	42	1	4	26	100

C. = *Candida*

UTI = Unidade de Tratamento Intensivo

UTI Ped. = Unidade de Tratamento Intensivo Pediátrica

Tabela 4B – Distribuição das espécies isoladas de hemoculturas nas unidades hospitalares (Hospital 2).

Espécies	Enfermarias		UTIs		UTI		UTI		Total	
			Gerais		Neo.		Ped.			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>C. albicans</i>	3	3	16	17	0	0	4	4,5	23	25
<i>C. dubliniensis</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>C. glabrata</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>C. metapsilosis</i>	0	0	2	2	0	0	0	0	2	2
<i>C. orthopsilosis</i>	2	2	5	5	0	0	0	0	7	7
<i>C. parapsilosis</i>	1	1	2	2	16	17	5	5	24	26
<i>C. tropicalis</i>	2	2	18	19	0	0	3	3	23	25
<i>P. anomala</i>	0	0	0	0	1	1	11	12	12	13
Total	8	8	45	49	17	18	23	25	93	100

C. = *Candida*

P. = *Pichia*

UTI = Unidade de Tratamento Intensivo

UTI Neo. = Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal

UTI Ped. = Unidade de Tratamento Intensivo Pediátrica

5.3. Leveduras isoladas do leito hospitalar

Dos leitos hospitalares, 198 amostras foram coletadas, distribuídas antes (99) e após (99) a limpeza terminal dos mesmos. Para cada caso confirmado de candidemia, o leito era avaliado microbiologicamente, sendo que mediante alta, óbito ou transferência, este mesmo leito era reavaliado, antes e após a limpeza terminal. De um paciente com candidemia, foram realizadas duas investigações, considerando-se a transferência de ambiente hospitalar e a detecção de duas espécies distintas nos episódios de candidemia.

A análise geral revelou que apenas 43 amostras (22%) foram positivas para leveduras, sendo 15 e 28 encontradas nos hospitais 1 e 2, respectivamente.

Considerando o **Hospital 1**, 11 casos (73%) foram recuperados nas enfermarias, 3 casos (20%) das UTIs Gerais e 1 (7%) da UTI Pediátrica. A tabela 5A apresenta percentuais de ambientes positivos e negativos por áreas hospitalares. Avaliando-se a distribuição das espécies fúngicas do gênero *Candida*, foi possível detectar 12 *C. parapsilosis*, 2 *C. guilliermondii* e 1 *C. glabrata* cuja ocorrência em áreas intra hospitalares está apresentada na tabela 5B.

Diferentemente, no **Hospital 2**, 16 (57%) foram recuperadas das amostras das UTIs Gerais, 5 (18%) da UTI Pediátrica, 4 (14%) da UTI Neonatal e 3 (11%) nas enfermarias (Tabela 6A). Aqui, foram identificadas cinco espécies: 12 *T. asahii*, 7 *C. parapsilosis*, 4 *C. albicans*, 3 *C. tropicalis*, 1 *C. guilliermondii* e 1 *C. metapsilosis*, tabela 6B.

Tabela 5A – Distribuição de ocorrência de leveduras nos leitos e unidades hospitalares (H1).

Unidades	Positivo		Negativo		Total	
	NAL (%)	NDL (%)	NAL (%)	NDL (%)	NAL (%)	NDL (%)
Enfermarias	7 (28)	4 (16)	6 (24)	9 (36)	13 (52)	13 (52)
UTIs Gerais	2 (8)	1 (4)	9 (36)	10 (40)	11 (44)	11 (44)
UTI Ped.	1 (4)	0 (0)	0 (0)	1 (4)	1 (4)	1 (4)
Total	10	5	15	20	25	25
(%)	(40)	(20)	(60)	(80)	(100)	(100)

NAL = Número de casos antes da limpeza do leito

NDL = Número de casos depois da limpeza do leito

UTI = Unidade de Tratamento Intensivo

UTI Ped. = Unidade de Tratamento Intensivo Pediátrica

Tabela 5B – Distribuição das espécies de leveduras isoladas de leito nas unidades hospitalares (H1).

Espécies	Enfermarias		UTIs Gerais		UTI Ped.		Total	
	NAL (%)	NDL (%)	NAL (%)	NDL (%)	NAL (%)	NDL (%)	NAL (%)	NDL (%)
<i>C. glabrata</i>	1 (12,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)
<i>C. guilliermondii</i>	0 (0)	2 (28)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (29)
<i>C. parapsilosis</i>	4 (50)	4 (57)	2 (25)	1 (14)	1 (12,5)	0 (0)	7 (87,5)	5 (71)
Total	5	6	2	1	1	0	8	7
(%)	(62,5)	(86)	(25)	(14)	(12,5)	(0)	(100)	(100)

C. = *Candida*

NAL = Número de casos antes da limpeza do leito

NDL = Número de casos depois da limpeza do leito

UTI = Unidade de Tratamento Intensivo

UTI Ped. = Unidade de Tratamento Intensivo Pediátrica

Tabela 6A – Distribuição de ocorrência de leveduras nos leitos e unidades hospitalares (H2).

Unidades	Positivo		Negativo		Total	
	NAL (%)	NDL (%)	NAL (%)	NDL (%)	NAL (%)	NDL (%)
Enfermarias	2 (2,5)	1 (1,5)	5 (7,5)	6 (8)	7 (9,5)	7 (9,5)
UTIs Gerais	11 (15)	5 (6,5)	30 (40,5)	36 (49)	41 (55,5)	41 (55,5)
UTI Neo.	4 (5,5)	0 (0)	5 (6,5)	9 (12)	9 (12)	9 (12)
UTI Ped.	2 (2,5)	3 (4)	15 (20)	14 (19)	17 (23)	17 (23)
Total	19	9	55	65	74	74
(%)	(25,5)	(12)	(74,5)	(89)	(100)	(100)

NAL = Número de casos antes da limpeza do leito

NDL = Número de casos depois da limpeza do leito

UTI = Unidade de Tratamento Intensivo

UTI Neo. = Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal

UTI Ped. = Unidade de Tratamento Intensivo Pediátrica

Tabela 6B – Distribuição das espécies de leveduras isoladas de leite nas unidades hospitalares (H2).

Espécies	Enfermarias		UTIs Gerais		UTI Neo.		UTI Ped.		Total	
	NAL	NDL	NAL	NDL	NAL	NDL	NAL	NDL	NAL	NDL
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
<i>C. albicans</i>	2	0	1	1	0	0	0	0	3	1
	(11)	(0)	(5)	(11)	(0)	(0)	(0)	(0)	(16)	(11)
<i>C.guilliermondii</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(5)	(0)	(5)	(0)
<i>C. metapsilosis</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
	(0)	(0)	(0)	(0)	(5)	(0)	(0)	(0)	(5)	(0)
<i>C. parapsilosis</i>	0	0	2	2	3	0	0	0	5	2
	(0)	(0)	(10)	(22)	(16)	(0)	(0)	(0)	(26)	(22)
<i>C. tropicalis</i>	0	0	3	0	0	0	0	0	3	0
	(0)	(0)	(16)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(16)	(0)
<i>T. asahii</i>	0	1	5	2	0	0	1	3	6	6
	(0)	(11)	(26)	(22)	(0)	(0)	(5)	(34)	(31)	(67)
Total	2	1	11	5	4	0	2	3	19	9
(%)	(11)	(11)	(58)	(55)	(21)	(0)	(10)	(34)	(100)	(100)

C. = Candida
NAL = Número de casos antes da limpeza
NDL = Número de casos depois da limpeza
T. = Trichosporon
UTI = Unidade de Tratamento Intensivo
UTI Neo. = Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal
UTI Ped. = Unidade de Tratamento Intensivo Pediátrica

5.4. Correlação entre as leveduras isoladas de hemocultura e leito

O número total de leveduras a partir de hemocultura (26) e leito (oito antes e sete depois da limpeza) identificadas no **Hospital 1** distribuíram-se como: 25 nas enfermarias, 14 nas UTIs Gerais e 2 na UTI Pediátrica. No **Hospital 2**, o número de leveduras a partir de hemocultura foi 93 e dos leitos, 19 antes da limpeza e 9, depois, totalizando 121 isolados assim distribuídos: 61 UTIs Gerais, 28 UTI Pediátrica, 21 UTI Neonatal e 11 nas enfermarias.

A tabela 7A salienta a correlação existente entre paciente e leito do **Hospital 1**, tanto antes como depois da limpeza terminal frente às diferentes espécies fúngicas. *C. parapsilosis* caracterizou-se como evento único, em que o isolamento se deu tanto de hemocultura, como do leito correspondente.

Já a tabela 7B salienta os mesmos parâmetros para o **Hospital 2**. Diferentemente do H1, a simultânea ocorrência se deveu às espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, distribuídas, à exceção da UTI pediátrica, em todas as áreas hospitalares.

P. anomala ocorreu apenas nos isolados clínicos do **Hospital 2**, bem como *T. asahii* apenas no leito; já *C. guilliermondii*, nos isolados ambientais do **Hospital 1**.

Tabela 7A – Distribuição das espécies de leveduras isoladas em pacientes e nos leitos do **Hospital 1**.

Espécies	Enfermarias			UTIs Gerais			UTI Ped.			Total
	(n = 25)			(n = 14)			(n = 2)			(n = 41)
	Pac.	AL	DL	Pac.	AL	DL	Pac.	AL	DL	
<i>C. albicans</i>	4	0	0	8	0	0	0	0	0	12
<i>C. glabrata</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>C. guilliermondii</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2
<i>C. orthopsilosis</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
<i>C. parapsilosis</i>	5	4	4	1	2	1	1	1	0	19
<i>C. tropicalis</i>	3	0	0	1	0	0	0	0	0	4
Total	14	5	6	11	2	1	1	1	0	41

AL = Antes da Limpeza
C.= *Candida*

DL = Depois da Limpeza
Pac. = Paciente

UTI = Unidade de Tratamento Intensivo
UTI Ped. = Unidade de Tratamento Intensivo Pediátrica

Tabela 7B – Distribuição das espécies de leveduras isoladas em pacientes e leito do **Hospital 2**.

Espécies	Enfermarias (n = 11)				UTIs Gerais (n = 61)				UTI Neo. (n = 21)				UTI Ped. (n = 28)				Total (n = 121)
	Pac.	AL	DL	Pac.	AL	DL	Pac.	AL	DL	Pac.	AL	DL	Pac.	AL	DL	DL	
<i>C. albicans</i>	3	2	0	16	1	1	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	27
<i>C. dubliniensis</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>C. glabrata</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>C. guilliermondii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>C. metapsilosis</i>	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>C. orthopsilosis</i>	2	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
<i>C. parapsilosis</i>	1	0	0	2	2	2	16	3	0	5	0	0	0	0	0	0	31
<i>C. tropicalis</i>	2	0	0	18	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	26
<i>P. anomala</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	11	0	0	0	0	0	0	12
<i>T. asahii</i>	0	0	1	0	5	2	0	0	0	0	1	0	0	1	3	0	12
Total	8	2	1	45	10	5	17	4	0	23	2	3	2	2	3	3	121

AL = Antes da Limpeza

C. = *Candida*

DL = Depois da Limpeza

Pac. = Paciente

P. = *Pichia*T. = *Trichosporon*

UTI = Unidade de Tratamento Intensivo

UTI Neo. = Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal

UTI Ped. = Unidade de Tratamento Intensivo Pediátrica

5.5. Análise Genética

5.5.1 Perfil do “PCR-RFLP” para distinção entre *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*.

As amostras clínicas e ambientais obtidas no presente estudo, qualificadas como *C. albicans* (40), foram submetidas ao PCR-RFLP revelando apenas um isolado de *C. dubliniensis*. Caracteristicamente, o perfil genético de *C. albicans* apresentou bandas de amplificação com massas moleculares de 141 a 261 pares de base, conforme demonstrado na Figura 1, canaletas 3-7. Já, com relação a *C. dubliniensis*, os padrões de amplificação foram obtidos diante da presença de bandas de 264 e 325 pares de base, canaleta 2 (Figura 1).

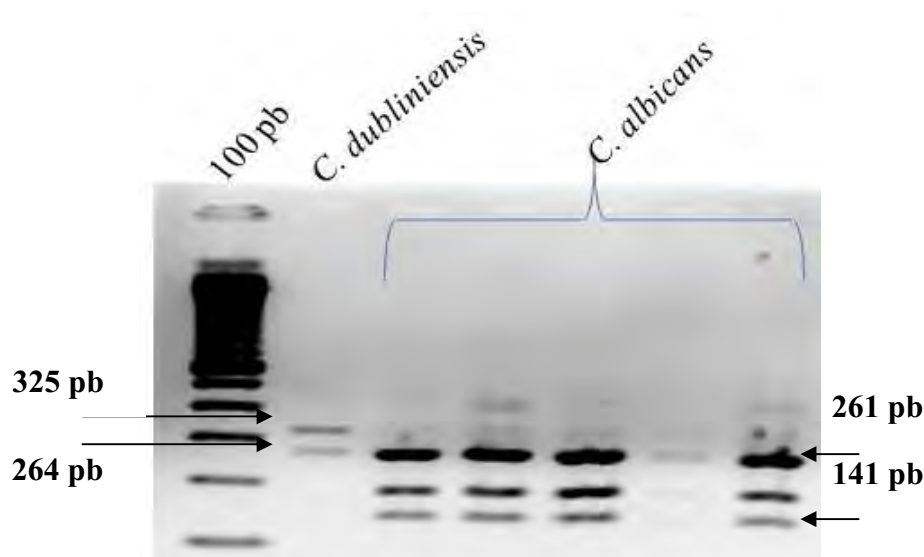


Figura 1 - Gel de agarose exibindo padrões genéticos de isolados de *C. albicans* e *C. dubliniensis* por PCR-RFLP. Colunas: C1, padrão de peso molecular (100 pb); C2 a C7 isolados de hemoculturas de ambas instituições.

5.5.2 Perfil das leveduras submetidas ao “RAPD”

Todas os isolados clínicos e ambientais foram submetidos a análise molecular por RAPD, à exceção de três (18-AL, 84-h1 e 97-h1) que não foram tipados.

5.5.2.1 *Candida albicans*

A similaridade genotípica entre as amostras levou a formação de cinco grupos clonais independentes.

Considerando-se o Hospital 2, foi observada identidade genética total entre os isolados clínicos 61-h1 UTI Geral do 7º andar e 62-h1 UTI Emergência, assim como entre os isolados 65-h1 UTI Geral do 7º andar e 58-h1 UTI Emergência, agrupados num único cluster. A formação de identidade completa foi detectada entre os isolados clínicos 90-h1 UTI Geral do 7º andar e 96-h1 UTI Geral do 5º andar.

Para duas ocorrências foi possível mostrar *C. albicans* na hemocultura e leite. No entanto, pós RAPD foi observada correlação genética em torno de 90% apenas para um caso, paciente 49, cuja internação ocorreu na Enfermaria do 4º andar do Hospital 2. Já a relação de identidade observada entre os isolados clínicos e ambientais obtidos de pacientes distintos, foi observada na UTI Geral do 7º andar (88-h1 e 90-DL).

Os demais isolados apresentaram-se distribuídos aleatoriamente, sem nenhuma formação clonal específica.

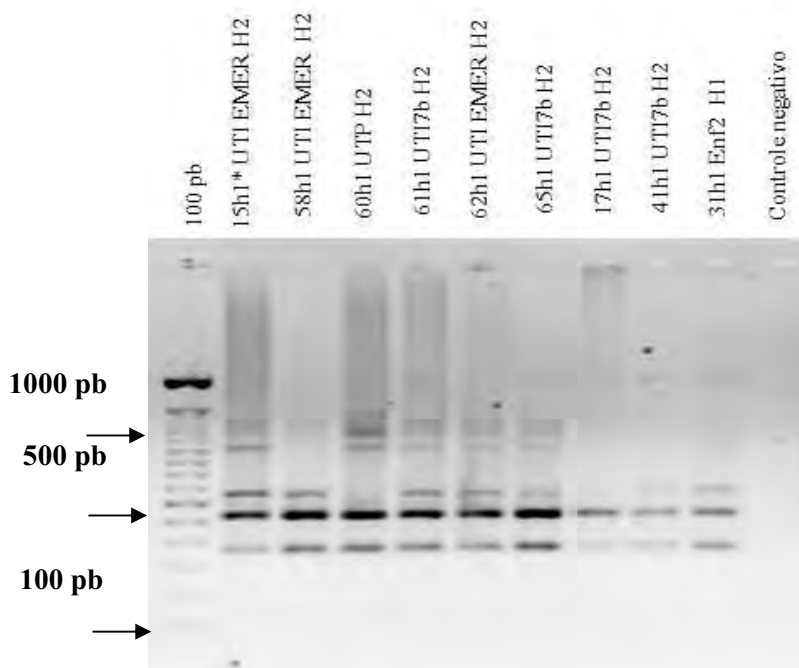


Figura 2 – Gel de agarose exibindo padrões genéticos de isolados de *C. albicans* pós RAPD.

* h1: Primeiro episódio de candidemia.

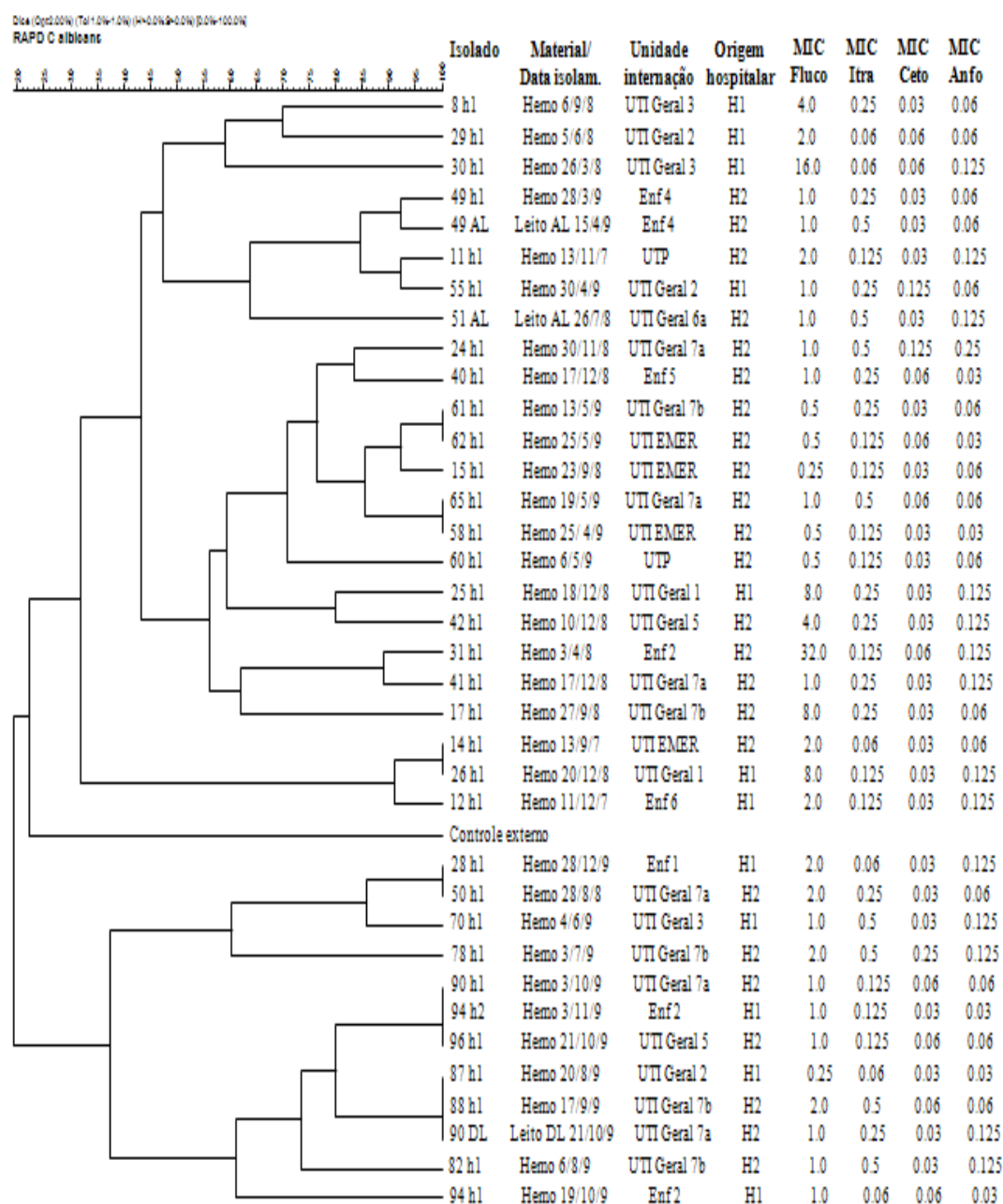


Figura 3 – Dendrograma obtido através dos perfis de bandas gerados com o *primer* B14 para as 36 cepas de *C. albicans*. O cálculo de similaridade foi realizado utilizando o coeficiente de Dice (UPGMA).

5.5.2.2 *Candida glabrata*

A figura 4 ilustra o perfil genético de isolados clínicos e ambientais de *C. glabrata*. Os padrões idênticos observados nas colunas 3 e 5, pertenceram a cepas originárias de hospitais distintos, portanto, sem nenhuma relação epidemiológica específica.

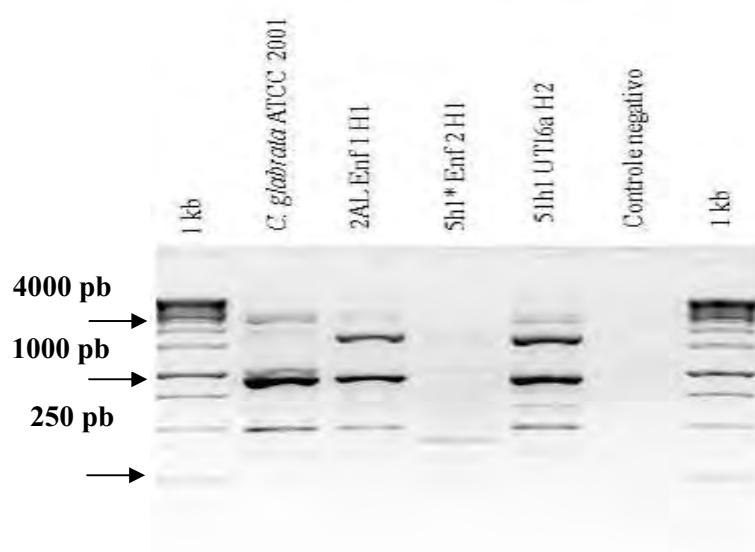


Figura 4 – Gel de agarose exibindo padrões genéticos de isolados de *C. glabrata* pós RAPD.* h1: Primeiro episódio de candidemia.

Dice (Opt:2.00%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
C. glabrata

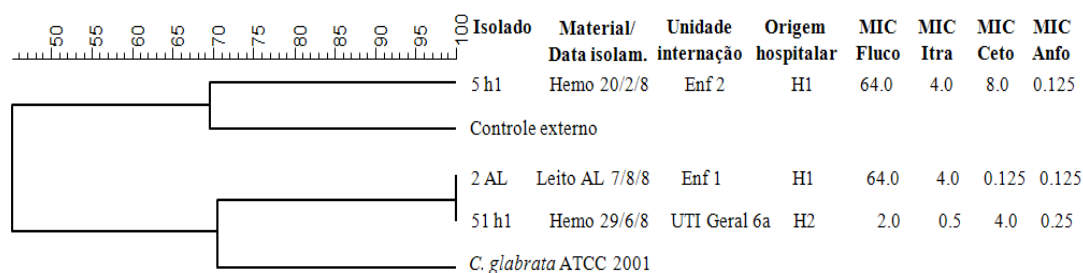


Figura 5 – Dendrograma obtido através dos perfis de bandas gerados com o *primer* OPE-18 para as três cepas de *C. glabrata*. O cálculo de similaridade foi realizado utilizando o coeficiente de Dice (UPGMA).

5.5.2.3 *Candida guilliermondii*

A figura 4 ilustra o perfil genético de isolados ambientais (3) de *C. guilliermondii* (H1 e H2). Salienta-se a ocorrência de 2 deles num mesmo ambiente hospitalar

(Enfermaria), detectados apenas após a limpeza terminal do leito; o terceiro, encontrado na UTI Pediátrica, antes da limpeza.

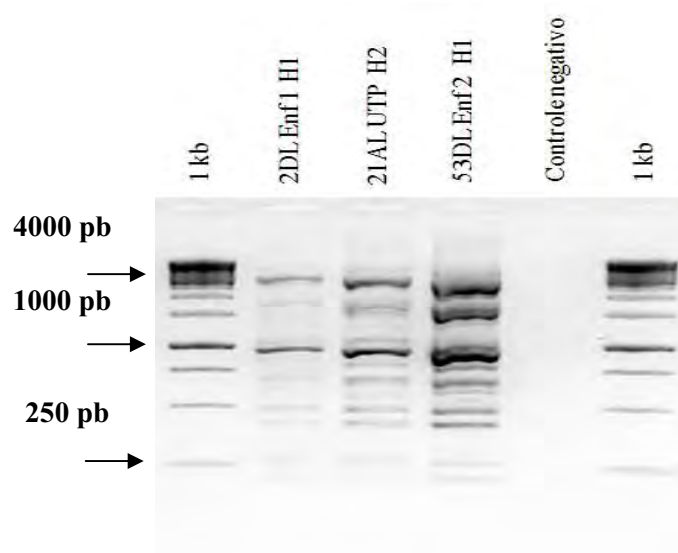


Figura 6 – Gel de agarose exibindo padrões genéticos de isolados de *C. guilliermondii* pós RAPD (H1).

Dice (Opt 2.00%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
RAPD *C. guilliermondii*

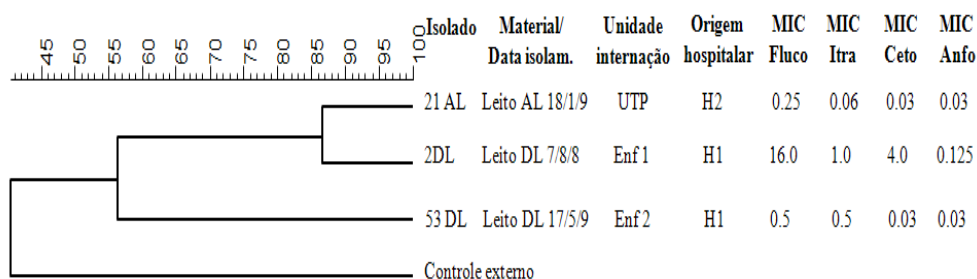


Figura 7– Dendrograma obtido através dos perfis de bandas gerados com o *primer* OPE-18 para as três cepas de *C. guilliermondii*. O cálculo de similaridade foi realizado utilizando o coeficiente de Dice (UPGMA).

5.5.2.4 *Candida metapsilosis*, *Candida orthopsilosis* e *Candida parapsilosis*

Através da técnica de RAPD foi possível obter a classificação das amostras em *C. metapsilosis* (três), *C. orthopsilosis* (nove) e *C. parapsilosis* (47), de acordo com o padrão de amplificação das respectivas ATCCs, *C. metapsilosis* ATCC 96143, *C. orthopsilosis* ATCC 96141, *C. parapsilosis* ATCC 22019. O perfil eletroforético de isolados oriundos dos dois hospitais é apresentado na figura 8, de onde se nota ampla similaridade genética para maioria deles. A identidade genética de *C. parapsilosis* esteve presente nas amostras seriadas de dois pacientes (16 e 46) locados na UTI Neonatal. Ainda, observou-se identidade genética total entre amostras seriadas de *C. orthopsilosis*, obtidas do paciente 74, localizado na UTI Geral do 5º andar.

Entre isolados clínicos de pacientes distintos, a relação clonal esteve presente nos isolados: 45-h1/46-h1/57-h1 UTI Neonatal, 13-h1/18-h1 UTI Pediátrica e Enfermaria do 6º andar, 22-h1/35-h1 UTI Neonatal e UTI Pediátrica, 35-h2/56-h1 UTI Pediátrica, todos referentes ao Hospital 2.

Relação clonal entre isolados clínicos e ambientais foi detectada em três pacientes: **Hospital 1**, um caso (7-h1/ 7-DL Enfermaria); **Hospital 2**, um caso (13-h1/14-AL UTP e UTI Emergência).

Comparando-se os isolados dos leitos, observou-se total relação genética no **Hospital 1** entre: 63-AL/63-DL Enfermaria e 7-DL/8-DL Enfermaria 1 e UTI Geral do terceiro andar. Para **Hospital 2**, nenhuma relação clonal esteve presente.

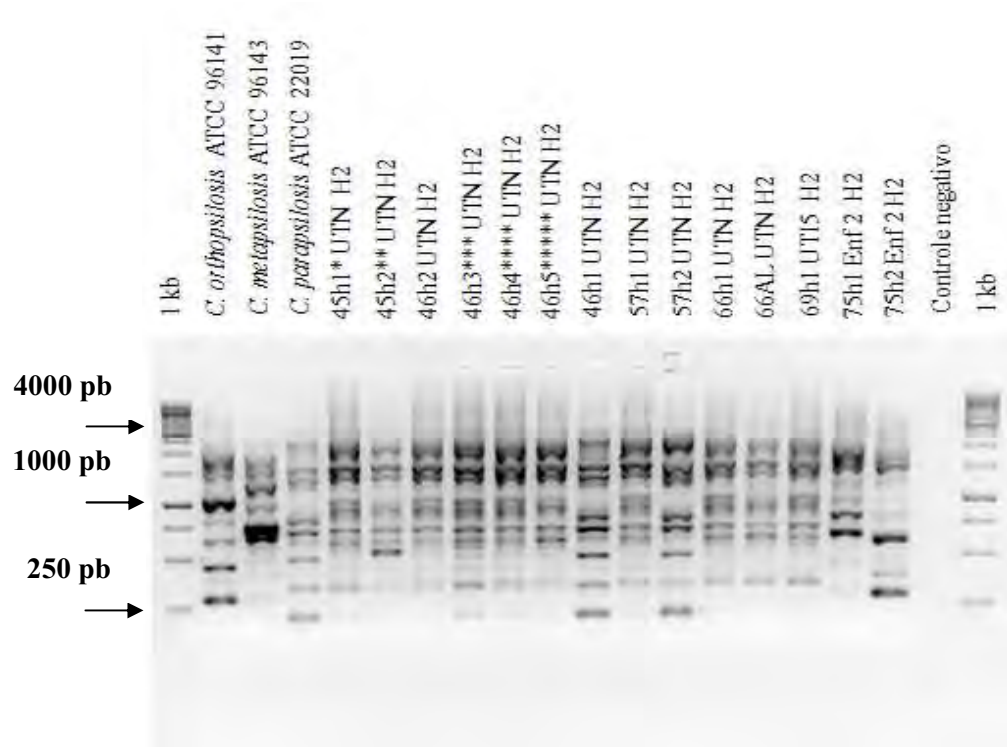


Figura 8 – Gel de agarose exibindo padrões genéticos de *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis* pós RAPD (H2). * h1: Primeiro episódio de candidemia.**h2: Segundo episódio de candidemia.***h3: Terceiro episódio de candidemia.****h4: Quarto episódio de candidemia.*****h5: Quinto episódio de candidemia.

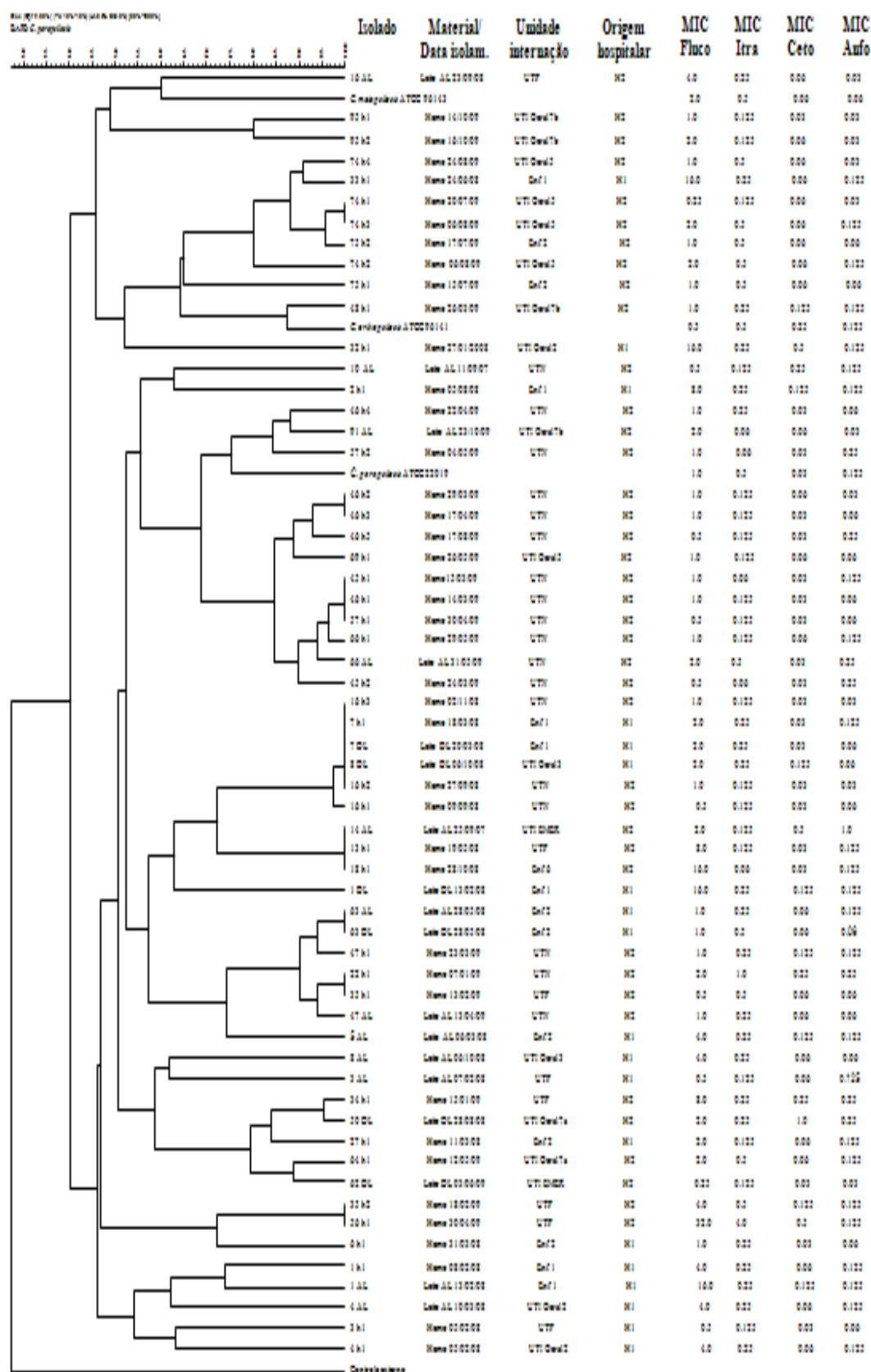


Figura 9 – Dendrograma obtido através dos perfis de bandas gerados com o *primer* B14 para as 59 cepas de *C. parapsilosis*. O cálculo de similaridade foi realizado utilizando o coeficiente de Dice (UPGMA).

5.5.2.5 *Candida tropicalis*

A similaridade genotípica entre as amostras, observada na figura 10, levou a formação de três grupos clonais principais. Formação clonal de isolados clínicos com 100% de similaridade foi observada para, **Hospital 1**: 23-h1 e 53-h1 Enfermaria; **Hospital 2**: 37-h1 e 71-h1 UTI Geral 7º andar, 20-h1 e 52-h1 UTI Emergência, 9-h1 (UTI Geral 5º andar), 36-h1 e 72-h1 UTI Geral 7º andar.

A análise comparada entre os isolados clínicos e ambientais do **Hospital 2** revelou a presença de similaridade superior a 90% para as amostras 20-h1/20-AL, ambas obtidas de um paciente internado na UTI da Emergência.

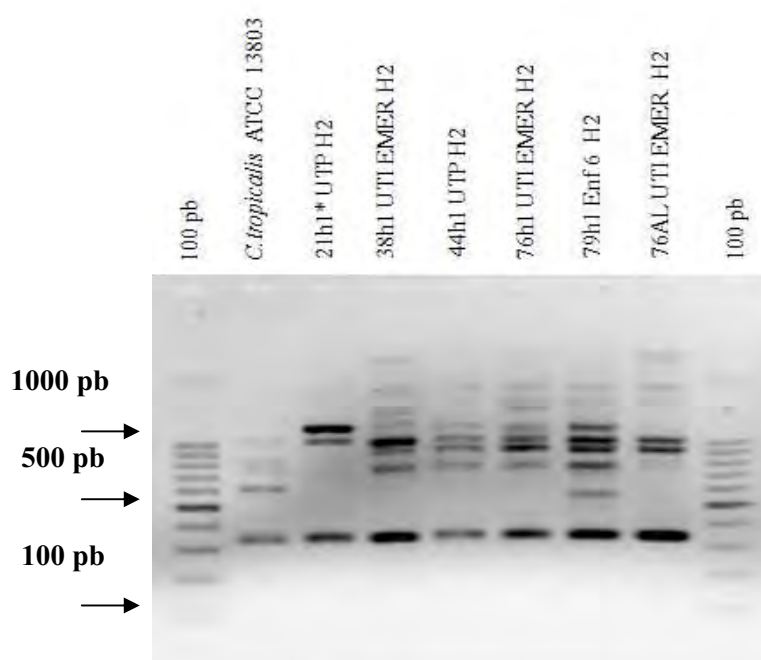


Figura 10 – Gel de agarose exibindo padrões genéticos de *C. tropicalis* pós RAPD (H2). * h1: Primeiro episódio de candidemia.

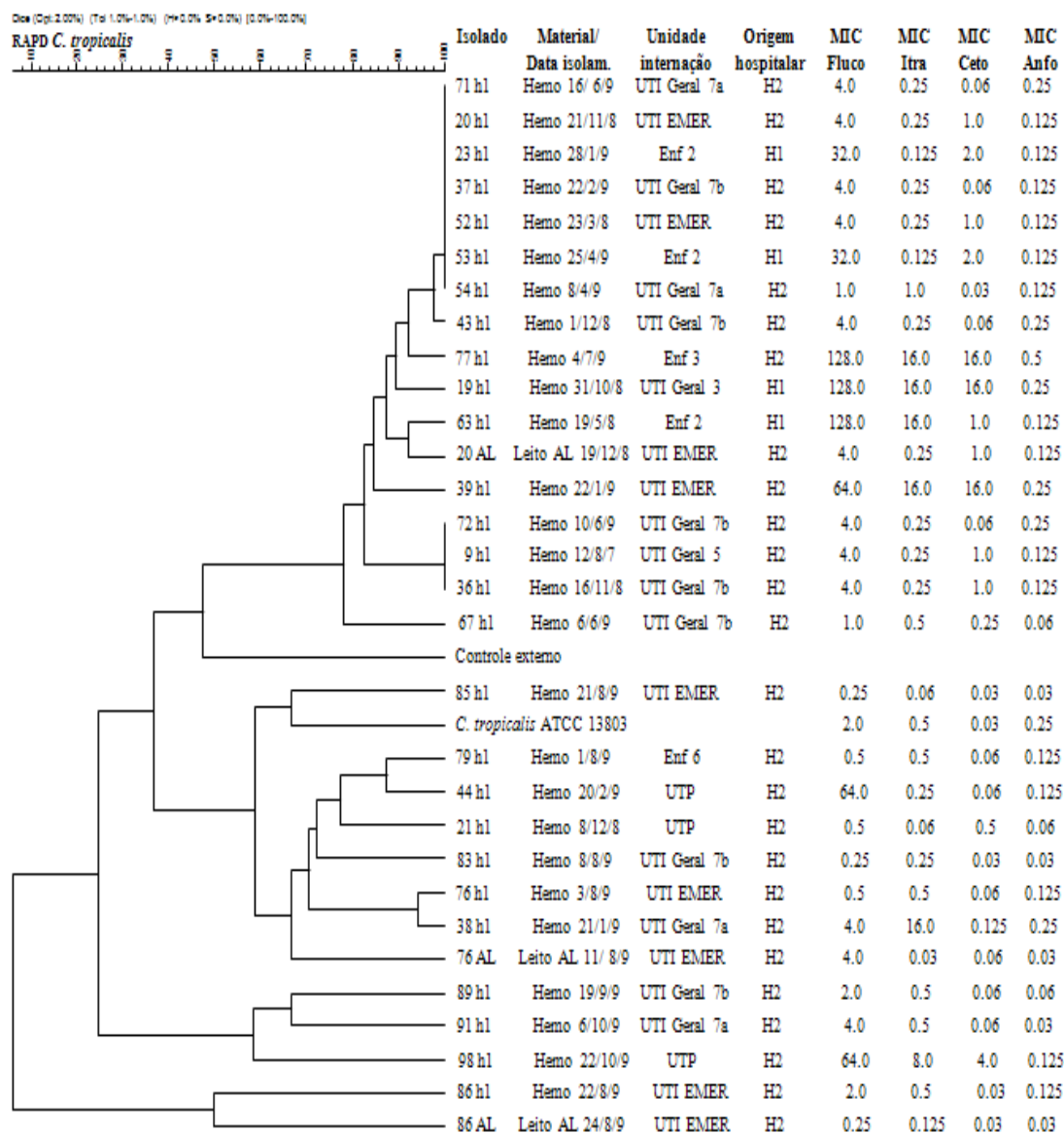


Figura 11 – Dendrograma obtido através dos perfis de bandas gerados com o *primer* M2 para as 30 cepas de *C. tropicalis*. O cálculo de similaridade foi realizado utilizando o coeficiente de Dice (UPGMA).

5.5.2.6 *Pichia anomala*

A figura 12 apresenta isolados clínicos de *P. anomala*, detectados no Hospital 2. A similaridade genotípica entre as amostras levou a formação de um grupo clonal revelado por três isolados obtidos de pacientes distintos localizados na UTI Pediátrica (73-h2, 92-h2 e 93-h1. Os demais isolados apresentaram-se distribuídos aleatoriamente, sem nenhuma formação clonal específica.

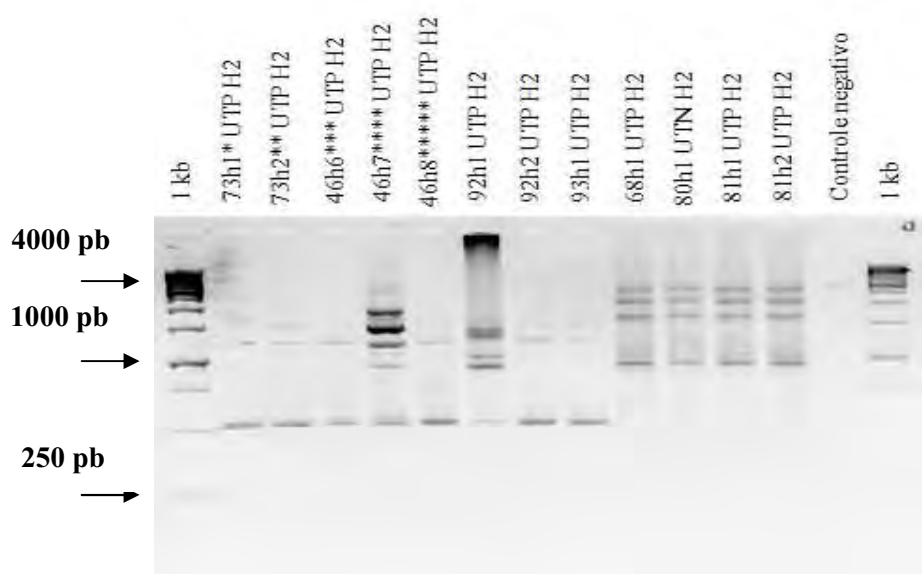


Figura 12 – Gel de agarose exibindo padrões genéticos de *P. anomala* pós RAPD (H2). * h1: Primeiro episódio de candidemia. **h2: Segundo episódio de candidemia. ***h6: Sexto episódio de candidemia. ****h7: Sétimo episódio de candidemia. *****h8: Oitavo episódio de candidemia.

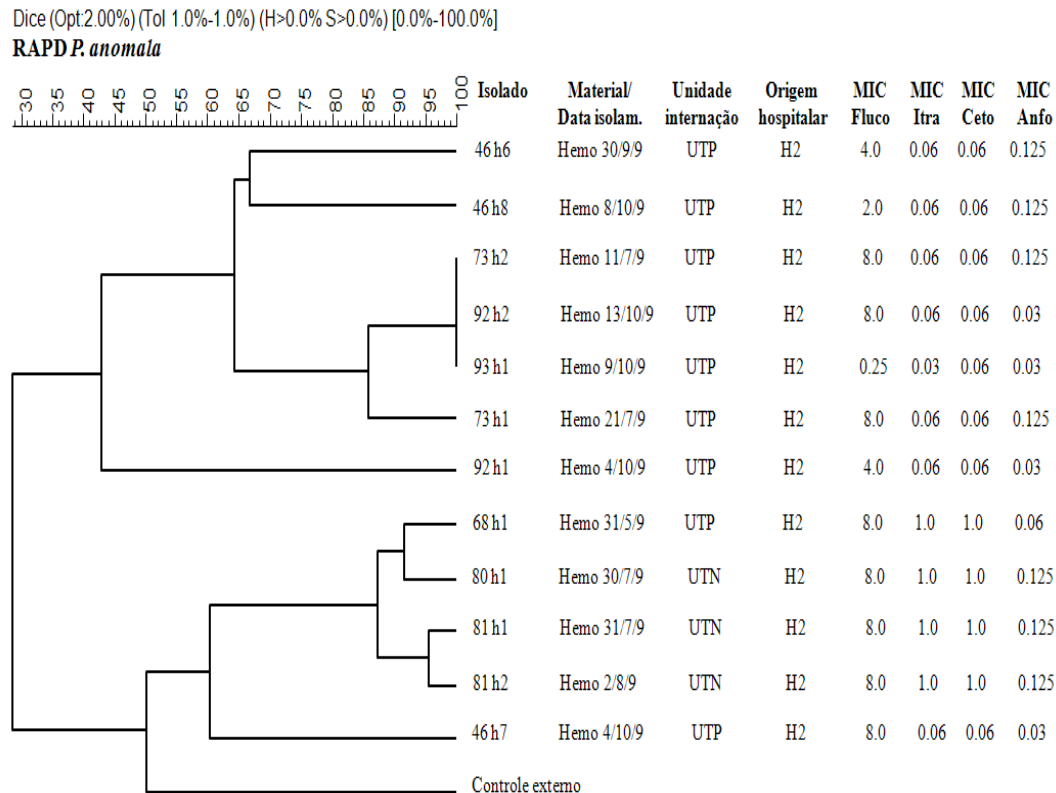


Figura 13 – Dendrograma obtido através dos perfis de bandas gerados com o *primer* CDU para as 12 cepas de *P. anomala*. O cálculo de similaridade foi realizado utilizando o coeficiente de Dice (UPGMA).

5.5.2.7 *Trichosporon asahii*

A figura 14 apresenta os isolados ambientais, de *T. asahii* encontrados no Hospital 2. A similaridade genotípica entre as amostra levou a formação de um grupo clonal representado por três isolados ambientais obtidos em localidades geográficas distintas (15-AL UTI Emergência, 91-AL UTI Geral 7º andar e 98-AL UTI Pediátrica).

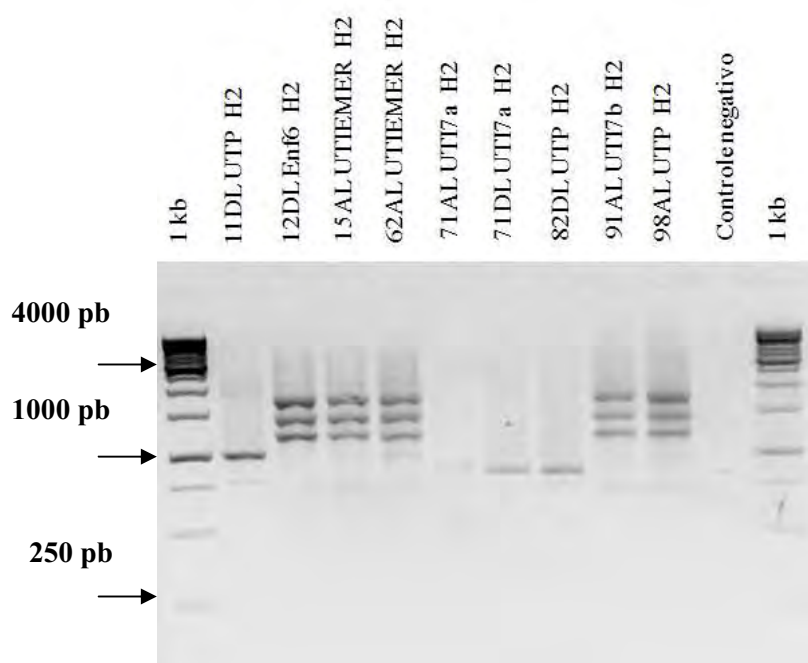


Figura 14 – Gel de agarose exibindo padrões genéticos de isolados de *T. asahii* pós RAPD (H2).

Dice (Opt:2.00%) (Tol:1.0%-1.0%) (H>0.0%<0.0%) (0.0%-100.0%)
RAPD *T. asahii*

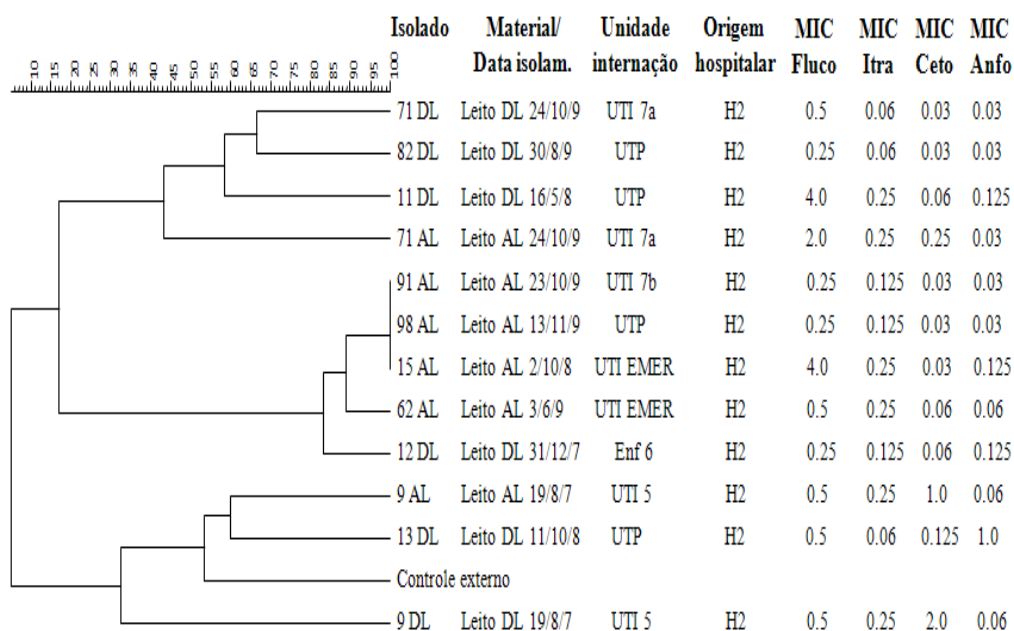


Figura 15 – Dendrograma obtido através dos perfis de bandas gerados com o *primer* 6 para as 12 cepas de *T. asahii*. O cálculo de similaridade foi realizado utilizando o coeficiente de Dice (UPGMA).

5.5.3 Perfil da Cariotipagem em Campo Pulsátil (PFGE)

Todas as leveduras (N=99) que apresentaram semelhança genética por RAPD foram submetidas à PFGE.

5.5.3.1 *Candida albicans*

A cariotipagem eletroforética de *C. albicans*, demonstrada na figura 16, revelou padrões genéticos constituídos por cinco a sete fragmentos cromossômicos, que variaram de 750 kb a 1600 kb. O tamanho dos fragmentos foi determinado por comparação com a mobilidade dos fragmentos do marcador *S. cerevisiae*.

Após comparação dos padrões de cariotipagem, houve uma discrepância quanto aos isolados considerados clonais pelo RAPD, e vice-versa. A figura 17 apresenta a origem hospitalar, assim como a unidade de internação de tais isolados clonais.

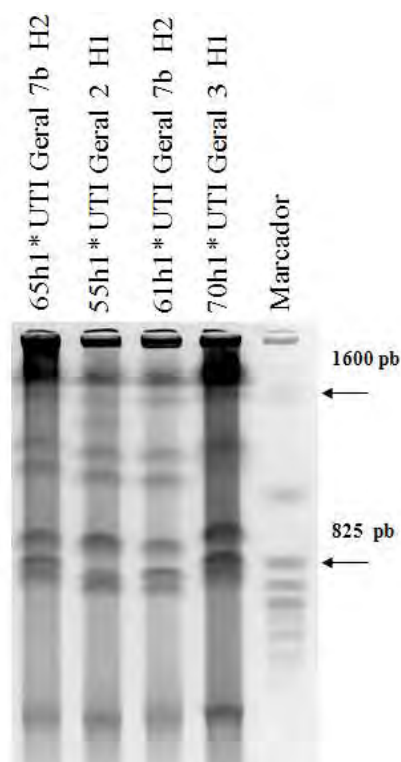


Figura 16 – Cariotipagem eletroforética de *C. albicans*: cariótipos isolados de sangue e leite de pacientes (H1 e H2). Marcador de peso molecular *S. cerevisiae* (2.200 pb). * h1: Primeiro episódio de candidemia.

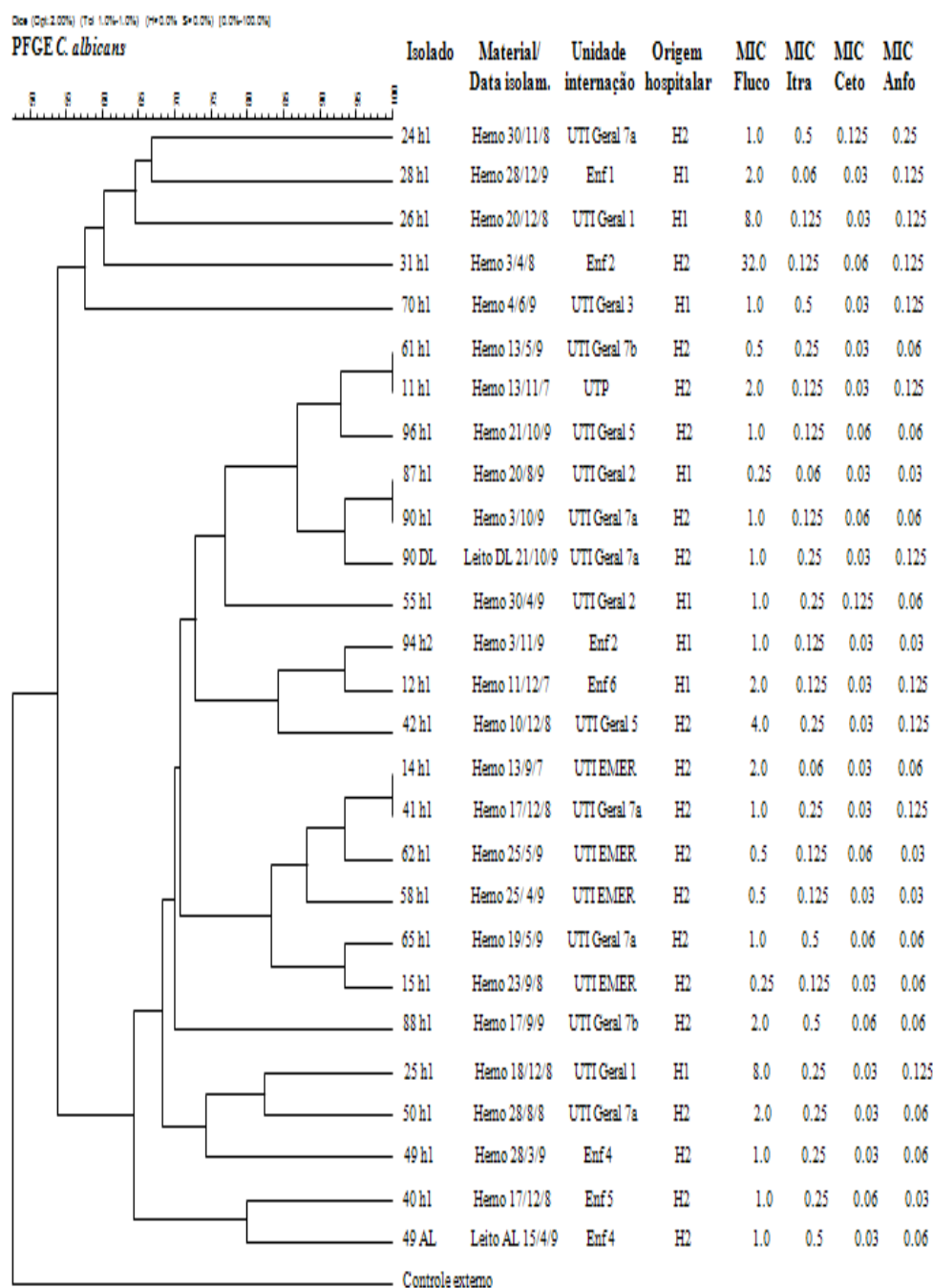


Figura 17 – Dendrograma obtido através dos perfis de bandas gerados por cariotipagem para as 27 cepas de *C. albicans*. O cálculo de similaridade foi realizado utilizando o coeficiente de Dice (UPGMA).

5.5.3.2 *Candida metapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis*

Trinta e cinco cepas classificadas como *C. parapsilosis*, provenientes das duas Instituições, assim como nove *C. orthopsilosis*, foram submetidas a cariotipagem eletroforética. O número de cromossomos obtidos para as duas espécies variou entre 6 a 9, compreendidos entre 750 kb a 1600 kb (Figura 18). As amostras de *C. orthopsilosis* idênticas pelo RAPD, diferiram pelo PFGE. A Figura 19 apresenta a origem local dos isolados clínicos obtidos do **Hospital 2**. Considerando-se *C. parapsilosis* de ambas Intituições, somente quatro confirmaram a identidade genética revelada previamente pelo RAPD (Figura 20).

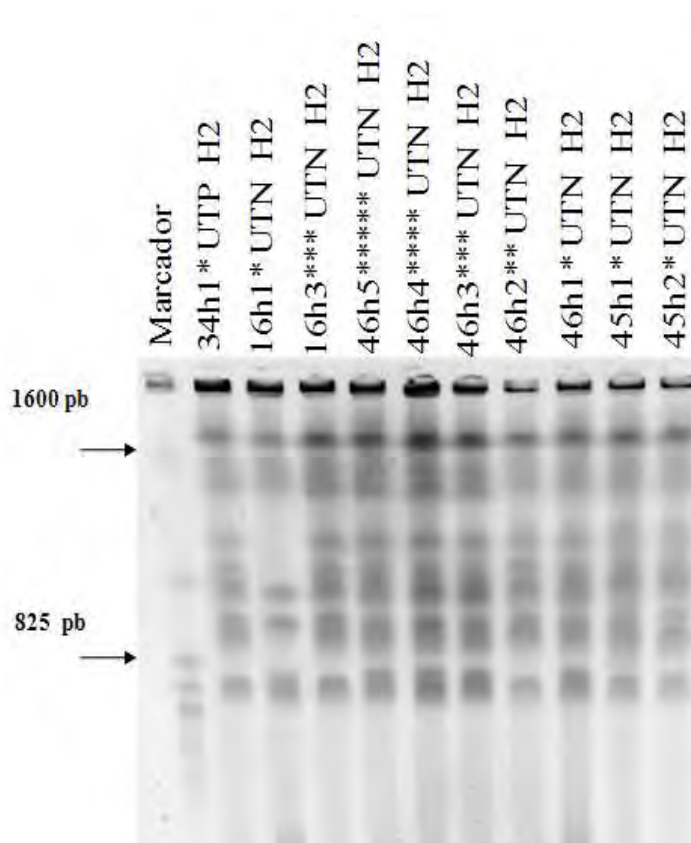


Figura 18 – Cariotipagem eletroforética de *C. parapsilosis*: cariótipos isolados de sangue (H2). Marcador de peso molecular *S. cerevisiae* (2.200 pb). * h1: Primeiro episódio de candidemia.**h2: Segundo episódio de candidemia.***h3: Terceiro episódio de candidemia.***h4: Quarto episódio de candidemia.*****h5: Quinto episódio de candidemia.

Dice (Opt:2.00%) (Tol:1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
PFGE *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*

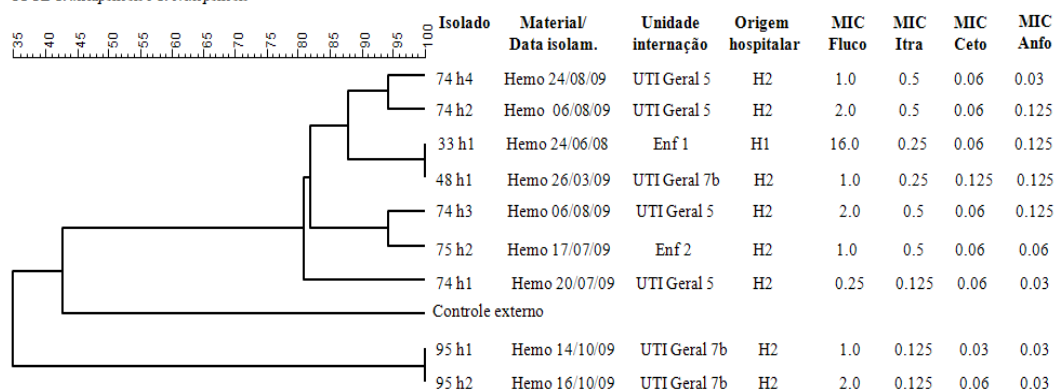


Figura 19 – Dendrograma obtido através dos perfis de bandas gerados por cariotipagem para as 2 cepas de *C. metapsilosis* e 7 cepas de *C. orthopsilosis*. O cálculo de similaridade foi realizado utilizando o coeficiente de Dice (UPGMA).

Dice (Opt:2.00%) (Tol:1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
PFGE *C. para* e *C. ortho_18-08-10*

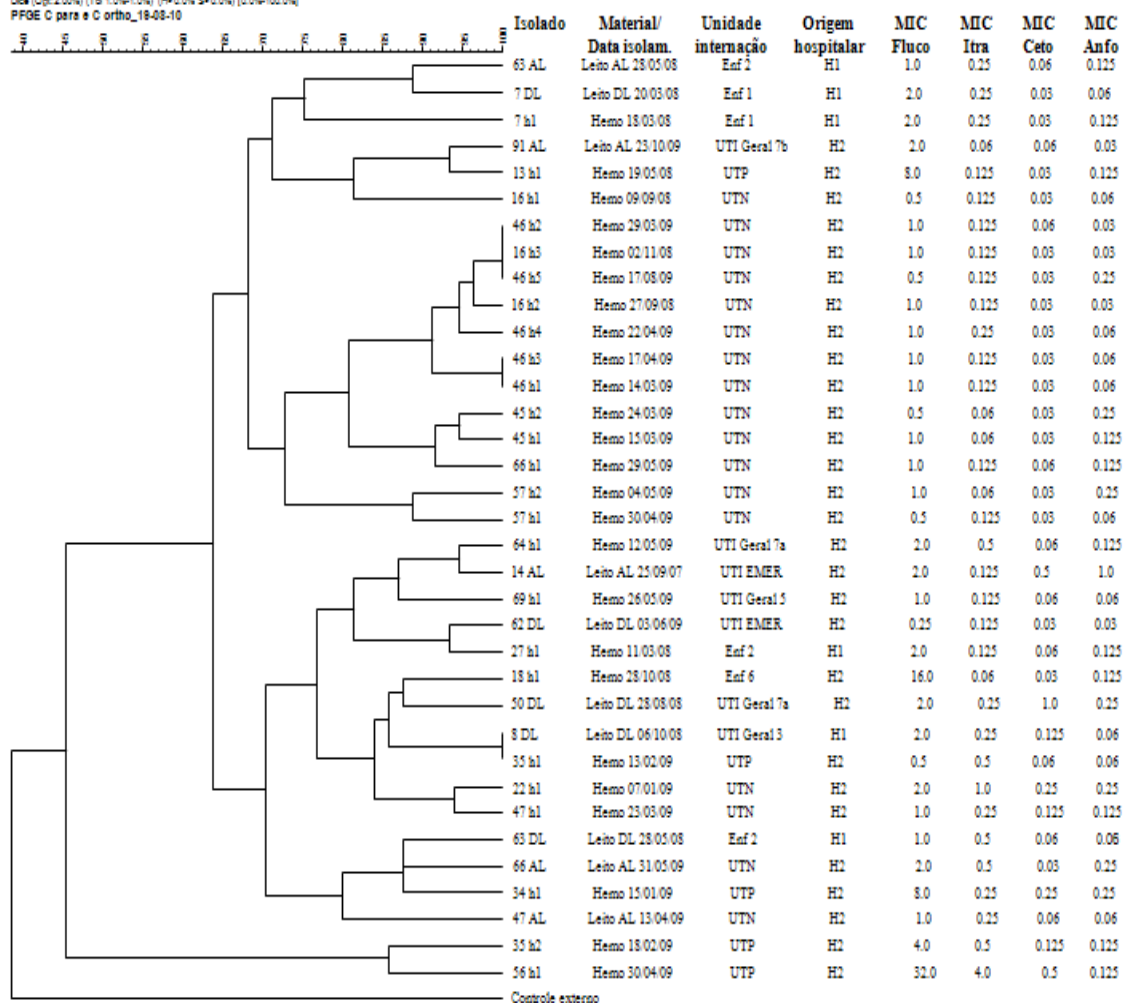


Figura 20 – Dendrograma obtido através dos perfis de bandas gerados por cariotipagem para as 35 cepas de *C. parapsilosis*. O cálculo de similaridade foi realizado utilizando o coeficiente de Dice (UPGMA).

5.5.3.3 *Candida tropicalis*

A cariotipagem eletroforética permitiu observar apenas três genótipos para 20 *C. tropicalis*, considerando-se duas origens, leite e hemocultura. Novamente, para seis isolados (20h1/52h1, 37h1/54h1 e 36h1/72h1), foi possível confirmar a identidade genética descrita previamente pelo RAPD. Tais isolados clonais, com as correspondentes áreas geográficas de ocorrência, estão apresentados na figura 22.

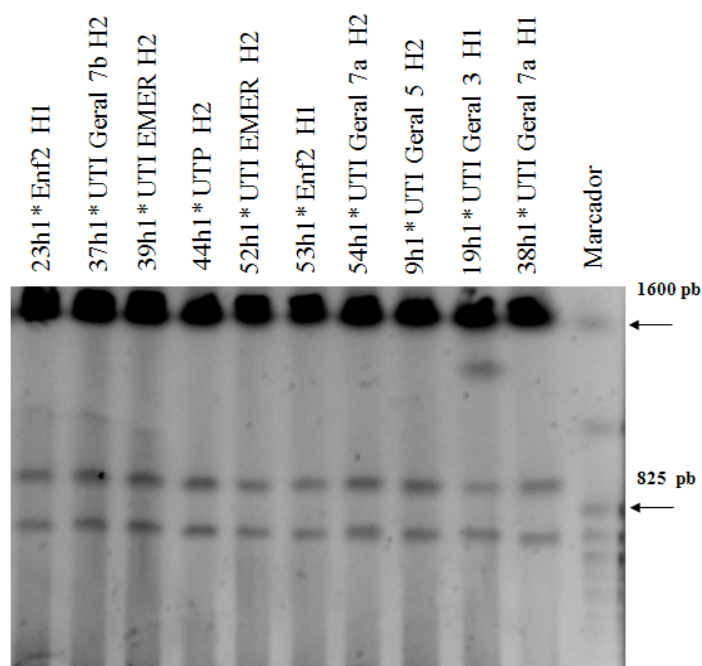


Figura 21 – Cariotipagem eletroforética de *C. tropicalis*: cariótipos isolados de sangue e leite dos hospitais analisados. Marcador de peso molecular *S. cerevisiae* (2.200 pb). *h1: Primeiro episódio de candidemia.

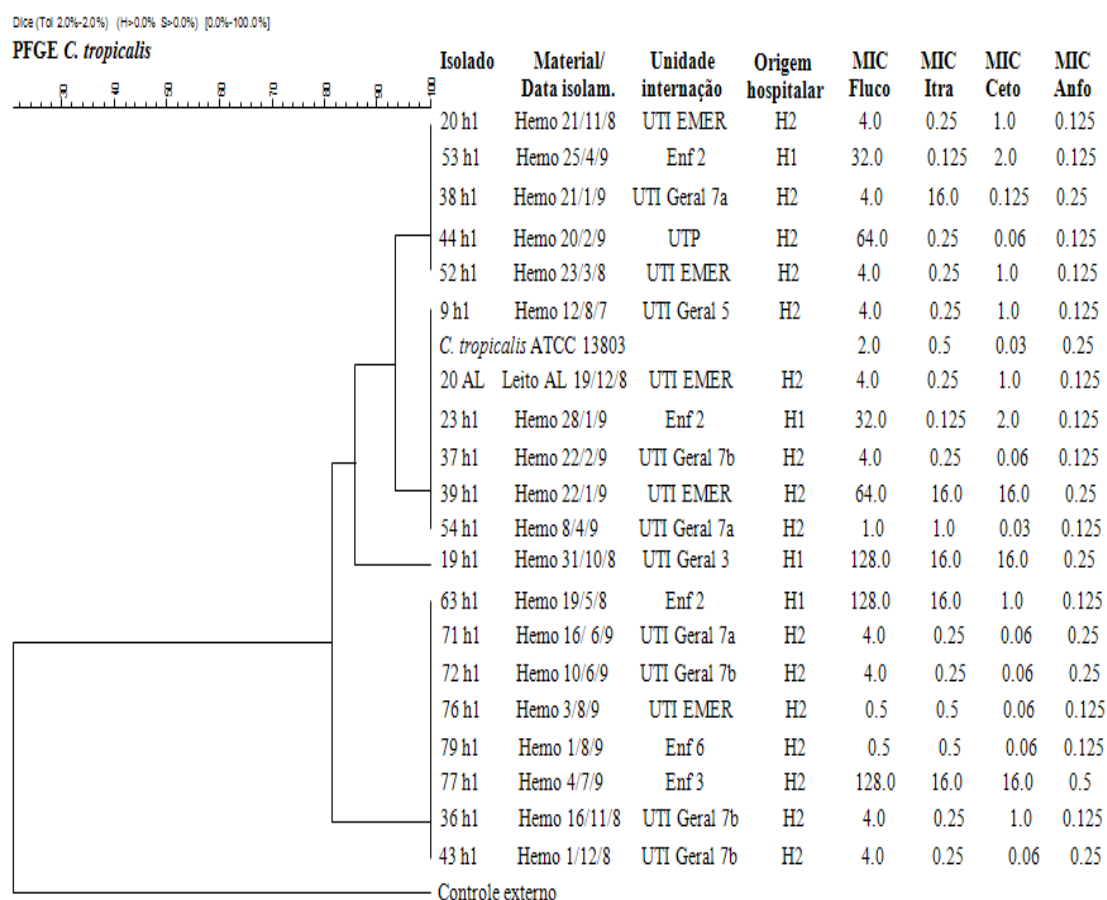


Figura 22 – Dendrograma obtido através dos perfis de bandas gerados por cariotipagem para as 20 cepas de *C. tropicalis*. O cálculo de similaridade foi realizado utilizando o coeficiente de Dice (UPGMA).

5.5.3.4 *Pichia anomala*

Foram observados de seis a oito fragmentos cromossômicos que variaram de 825 kb a 1600 kb, conforme observado na figura 23.

Dos três cariótipos distintos, somente duas amostras (73h2 e 92h2) confirmaram a identidade genética gerada pelo RAPD. Dentre tais isolados clonais, sua origem hospitalar, bem como a unidade de internação de ocorrência, estão apresentados na figura 24.

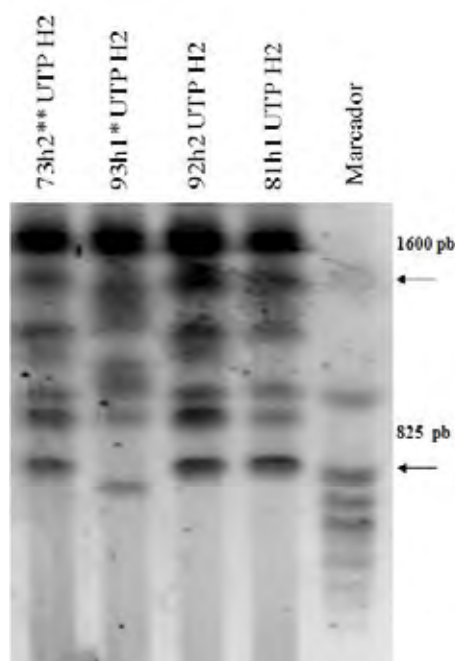


Figura 23 – Cariotipagem eletroforética de *P. anomala*: cariótipos dos isolados clínicos (H2). Marcador de peso molecular *S. cerevisiae* (2.200 pb). *h1: Primeiro episódio de candidemia. **h2: Segundo episódio de candidemia.

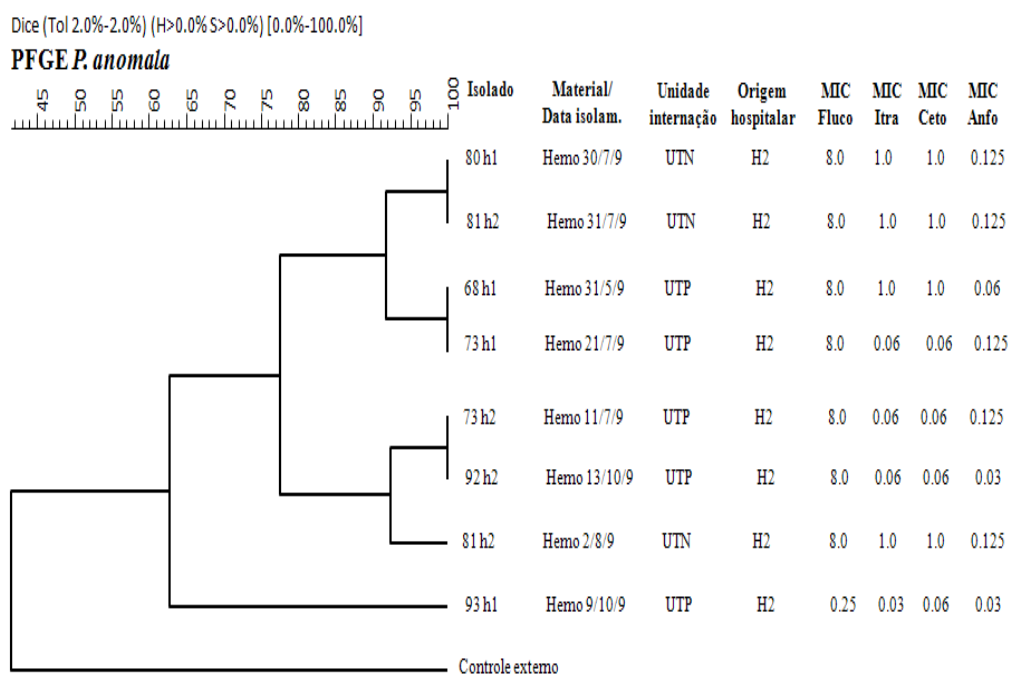


Figura 24 – Dendrograma obtido através dos perfis de bandas gerados por cariotipagem para as oito cepas de *P. anomala*. O cálculo de similaridade foi realizado utilizando o coeficiente de Dice (UPGMA).

5.6. Perfil de suscetibilidade

As tabelas 13A e 13B, assim como 14A, 14B e 14C resumem o perfil de suscetibilidade das diferentes espécies de leveduras isoladas de pacientes e leitos dos **Hospitais 1 e 2**, respectivamente. Considerando-se todas as espécies estudadas, a ocorrência de fenótipo de resistência caracterizou-se como evento raro, entretanto, quando se identifica esse dado espécie por espécie, tem-se o seguinte resultado: no **Hospital 1, hemocultura**, com relação a *C. tropicalis*, duas amostras apresentaram resistência ao fluconazol, três ao itraconazol e quatro ao cetoconazol. Conforme esperado, *C. glabrata* apresentou resistência aos três azólicos. Considerando-se as espécies prevalentes, observou-se que o fenótipo sensível dose dependente ocorreu principalmente para *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*. No **leito antes e depois da limpeza**, o fenótipo de resistência foi observado para *C. parapsilosis* frente aos azólicos.

No **Hospital 2, hemocultura**, *C. tropicalis* e *P. anomala* apresentaram expressiva resistência frente aos azólicos. Quanto à sensibilidade dose dependência, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. orthopsilosis* corresponderam às espécies com perfis variáveis. No **leito antes e após a limpeza**, particularmente *T. asahii* e *C. parapsilosis*, apresentaram maiores índices de resistência.

Considerando-se dois hospitais, isolados clonais de *C. parapsilosis*, *T. asahii* e *P. anomala* apresentam o mesmo perfil de suscetibilidade antifúngica em 100% dos casos, clínicos e ambientais. No entanto, frente à espécie *C. tropicalis*, a taxa de concordância entre as duas análises (fenótipo e genótipo) foi 30%. Já, isolado clonal de *C. guilliermondii* (2) apresentaram respostas fenotípicas distintas.

Tabela 8A – Distribuição dos valores de CIM e perfil de suscetibilidade das espécies de leveduras isoladas de hemocultura e de leiteo (H1).

Espécies fúngicas (n isolados)	Droga antifúngica	Faixa de variação das CIMs	S			Perfil de suscetibilidade				R	
			Pac.(%)	AL(%)	DL(%)	Pac.(%)	AL(%)	DL(%)	Pac.(%)	AL(%)	DL(%)
<i>C. albicans</i> (n = 12)	FLU	0,25 - 32	10 (83,5)	0 (0)	0 (0)	2 (16,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	ITRA	0,06 - 0,5	8 (66,5)	0 (0)	0 (0)	4 (33,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	CETO	0,03 - 0,125	12 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	ANFO	0,03 - 0,125	12 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>C. glabrata</i> (n = 2)	FLU	64	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	1 (50)	0 (0)
	ITRA	4	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	1 (50)	0 (0)
	CETO	0,125 - 8	0 (0)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	0 (0)
	ANFO	0,125	1 (50)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>C. guilliermondii</i> (n = 2)	FLU	0,5 - 16	0 (0)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (50)
	ITRA	0,5 - 1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	1 (50)
	CETO	0,03 - 4	0 (0)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (50)
	ANFO	0,03 - 0,125	0 (0)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>C. orthopsilosis</i> (n = 2)	FLU	16	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	ITRA	0,25	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	CETO	0,06 - 0,5	1 (50)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	ANFO	0,125	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
AL = Antes da Limpeza			CETO = Cetoconazol			FLU = Fluconazol			R = Resistente		
ANFO = Anfotericina B			CIM = Concentração Inibitória Mínima			ITRA = Itraconazol			S = Sensível		
<i>C. Candida</i>			DL = Depois da Limpeza			Pac. = Paciente			SDD = Sensível dose dependente		

Tabela 8B – Distribuição dos valores de CIM e perfil de suscetibilidade das espécies de leveduras isoladas de hemocultura e de leite (HI).

Espécies fúngicas (n isolados)	Droga antifúngica	Faixa de variação das CIMs	Perfil de suscetibilidade						R		
			S			SDD					
			Pac.(%)	AL(%)	DL(%)	Pac.(%)	AL(%)	DL(%)	Pac.(%)	AL(%)	DL(%)
<i>C. parapsilosis</i> (n = 19)	FLU	0,5 - 8	7 (37)	7 (37)	4 (21)	0 (0)	0 (0)	1 (5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	ITRA	0,125 - 0,25	2 (10,5)	1 (5)	0 (0)	5 (26)	6 (31,5)	5 (26)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	CETO	0,03 - 0,125	7 (37)	7 (37)	5 (26)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	ANFO	0,06 - 0,125	7 (37)	7 (37)	5 (26)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>C. tropicalis</i> (n = 4)	FLU	0,5 - 128	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (50)	0 (0)	0 (0)	2 (50)	0 (0)	0 (0)
	ITRA	0,125 - 16	2 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (50)	0 (0)	0 (0)
	CETO	1,0 - 16	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (100)	0 (0)	0 (0)
	ANFO	0,125 - 0,25	4 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
AL = Antes da Limpeza			CETO = Cetoconazol			FLU = Fluconazol			R = Resistente		
ANFO = Anfotericina B			CIM = Concentração Inibitória Mínima			ITRA = Itraconazol			S = Sensível		
C. = <i>Candida</i>			DL = Depois da Limpeza			Pac. = Paciente			SDD = Sensível dose dependente		

Tabela 9A – Distribuição dos valores de CIM e perfil de susceptibilidade das espécies de leveduras isoladas de hemocultura e de leite (H2).

Espécies fúngicas (n isolados)	Droga antifúngica	Faixa de variação das CIMs	Perfil de suscetibilidade								
			S			SDD			R		
			Pac.(%)	AL(%)	DL(%)	Pac.(%)	AL(%)	DL(%)	Pac.(%)	AL(%)	DL(%)
<i>C. albicans</i> (n = 27)	FLU	0,25 - 8	23 (85)	3 (11)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	ITRA	0,06 - 1	10 (37)	1 (4)	0 (0)	12 (44)	2 (7)	1 (4)	1 (4)	0 (0)	0 (0)
	CETO	0,03 - 0,25	22 (81,5)	3 (11)	1 (4)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	ANFO	0,03 - 0,125	23 (85)	3 (11)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>C. dubliniensis</i> (n = 1)	FLU	0,5	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	ITRA	0,5	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	CETO	0,03	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	ANFO	0,06	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>C. glabrata</i> (n = 1)	FLU	2	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	ITRA	0,5	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	CETO	4	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)
	ANFO	0,25	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>C. guilliermondii</i> (n = 1)	FLU	0,25	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	ITRA	0,06	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	CETO	0,03	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	ANFO	0,03	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
AL = Antes da Limpeza			CETO = Cetoconazol			FLU = Fluconazol			R = Resistente		
ANFO = Anfotericina B			CIM = Concentração Inibitória Mínima			ITRA = Itraconazol			S = Sensível		
<i>C. = Candida</i>			DL = Depois da Limpeza			Pac. = Paciente			SDD = Sensível dose dependente		

Tabela 9B – Distribuição dos valores de CIM e perfil de suscetibilidade das espécies de leveduras isoladas de hemocultura e de leite (H2).

Espécies fúngicas (n isolados)	Droga antifúngica	Faixa de variação das CIMs	Perfil de suscetibilidade								
			S			SDD			R		
			Pac.(%)	AL(%)	DL(%)	Pac.(%)	AL(%)	DL(%)	Pac.(%)	AL(%)	DL(%)
<i>C. metapsilosis</i> (n = 3)	FLU	1,0 - 4,0	2 (67)	1 (33)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	ITRA	0,125 - 0,25	2 (67)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (33)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	CETO	0,03 - 0,06	2 (67)	1 (33)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	ANFO	0,03	2 (67)	1 (33)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>C. orthopsilosis</i> (n = 7)	FLU	0,25 - 2	7 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	ITRA	0,125 - 0,5	1 (14,5)	0 (0)	0 (0)	6 (85,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	CETO	0,06 - 0,125	7 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	ANFO	0,03 - 0,125	7 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>C. parapsilosis</i> (n = 31)	FLU	0,5 - 32	22 (71)	5 (16)	2 (6)	2 (6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	ITRA	0,06 - 4	16 (52)	3 (9)	1 (3)	6 (19)	2 (6)	1 (3)	2 (6)	0 (0)	0 (0)
	CETO	0,03 – 0,5	21 (68)	3 (9)	1 (3)	3 (9)	2 (6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (3)
	ANFO	0,03 – 0,125	24 (75)	5 (16)	2 (6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
AL = Antes da Limpeza			CETO = Cetoconazol			FLU = Fluconazol			R = Resistente		
ANFO = Anfotericina B			CIM = Concentração Inibitória Mínima			ITRA = Itraconazol			S = Sensível		
<i>C. = Candida</i>			DL = Depois da Limpeza			Pac. = Paciente			SDD = Sensível dose dependente		

Tabela 9C – Distribuição dos valores de CIM e perfil de suscetibilidade das espécies de leveduras isoladas de hemocultura e de leite (H2).

Espécies fúngicas (n isolados)	Droga antifúngica	Faixa de variação	Perfil de suscetibilidade								
			S			SDD			R		
		das CIMs	Pac.(%)	AL(%)	DL(%)	Pac.(%)	AL(%)	DL(%)	Pac.(%)	AL(%)	DL(%)
<i>C. tropicalis</i> (n = 26)	FLU	0,25 - 128	19 (73)	3 (11,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (15,5)	0 (0)	0 (0)
	ITRA	0,03 - 16	2 (7,5)	2 (7,5)	0 (0)	16 (61,5)	1 (4)	0 (0)	5 (19,5)	0 (0)	0 (0)
	CETO	0,03 - 16	14 (54)	2 (7,5)	0 (0)	2 (7,5)	0 (0)	0 (0)	7 (27)	1 (4)	0 (0)
	ANFO	0,03 - 0,5	23 (88,5)	3 (11,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>T. asahii</i> (n = 12)	FLU	0,25 - 4	0 (0)	6 (50)	6 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	ITRA	0,03 - 0,25	0 (0)	2 (16,5)	4 (33,5)	0 (0)	4 (33,5)	2 (16,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	CETO	0,03 - 2	0 (0)	4 (33,5)	5 (41,5)	0 (0)	1 (8,5)	0 (0)	0 (0)	1 (8,5)	1 (8,5)
	ANFO	0,03 - 1	0 (0)	6 (50)	6 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>P. anomala</i> (n = 12)	FLU	0,25 - 16	12 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	ITRA	0,03 - 2	8 (66,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (33,5)	0 (0)	0 (0)
	CETO	0,06 - 1	8 (66,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (33,5)	0 (0)	0 (0)
	ANFO	0,03 - 0,125	12 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
AL = Antes da Limpeza			DL = Depois da Limpeza			Pac. = Paciente			<i>T. = Trichosporon</i>		
ANFO = Anfotericina B			FLU = Fluconazol			R = Resistente					
CETO = Cetoconazol			ITRA = Itraconazol			S = Sensível					
CIM = Concentração Inibitória Mínima			<i>P. = Pichia</i>			SDD = Sensível dose dependente					

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

As infecções fúngicas causadas por leveduras do gênero *Candida* aumentaram muito na década de 1990, ocupando o quarto lugar dos agentes etiológicos implicados nas infecções sanguíneas no mundo todo, segundo o centro de referência *National Nosocomial Infectious Surveillance* (MEDRANO & RABENHORST, 2004).

Neste estudo foram avaliados 119 episódios de candidemia, os quais foram mais frequentes em pacientes com idade inferior a 1 ano e superior a 60 anos, faixas etárias onde há reduzida resposta imunológica, o que favorece o desenvolvimento dessa infecção (CHENG et al., 2005; RIBEIRO et al., 2003; RIBEIRO et al., 2004; XAVIER & CHANG, 2008).

Com relação ao gênero, a distribuição entre os sexos foi correspondente em ambas Instituições analisadas (H1 e H2), também identificado por Nogueira e cols (2009), aspecto que parece ser relacionado, tão somente, à demanda espontânea, ou seja, o tipo de assistência oferecida, que por si só faz a seleção natural da clientela.

Considerando-se a análise temporal, as infecções nosocomiais podem ser consideradas precoces, quando surgem nas primeiras 96 horas de internação, ou tardias, sendo atribuídas a inúmeras causas (DAVID, 1998). No presente estudo, o prolongado período de internação, com média geral de 35 dias, aliado à própria condição clínica do paciente, pode ter favorecido o desenvolvimento desta infecção, com a ocorrência de espécies do gênero *Candida*, dados também relatados por outros estudos (BARBERINO et al., 2006; BOUSSO et al., 1995; COLOMBO et al., 2007; GARLAND & UHING, 2009; VILLARI et al., 1998; XAVIER & CHANG, 2008). De fato os hospitais em estudo são referências para doenças graves e para cirurgia de grande porte, que muitas vezes pode debilitar o paciente, daí ser considerado potencial fator de risco.

Quanto a frequência de óbito (61%), na presente pesquisa, foi possível observar valores semelhantes ao de outro estudo nacional, o qual incluiu quatro Hospitais de nível terciário, locados na cidade de São Paulo, Brasil (COLOMBO et al., 2007). Novamente, dado que a maioria dos pacientes da presente investigação era idosa, consequentemente, os índices de mortalidade foram elevados, o que foi notificado por

outros estudos (BOAS & RUIZ, 2004; MORGAN et al., 2005; TURRINI, 2002). A explicação para a maior ocorrência do binômio *C. albicans* (espécie prevalente) e óbito, pode estar relacionada aos elevados índices de colonização por essa espécie, que, muitas vezes, favorece a infecção (AQUINO et al., 2005).

Considerando-se a área de internação intra-hospitalar, novamente, as Unidades de Tratamento Intensivo foram consideradas epicentros para infecções nosocomiais, dado que corrobora com outros estudos (COLOMBO, 2003; ELLIS et al., 2003; LEISER et al., 2007; MARRA & CAMARGO, 2002; MORAES & SANTOS, 2003; PÉMAN et al., 2002).

Quanto à etiologia das infecções na corrente sanguínea, os dados encontrados corroboram com os estudos epidemiológicos, os quais demonstram a prevalência de *C. albicans*, seguido de *C. não-albicans*, tais como, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (ABELSON et al., 2005; ALMIRANTE et al., 2005; AQUINO et al., 2005; COLOMBO et al., 2006; 2007; FRANÇA et al., 2008; HINRICHSEN et al., 2008; PATEL et al., 2005).

Estudos considerando fômites em ambiente hospitalar revelam que *Candida* spp pode sobreviver nas superfícies, caracterizada como principal fonte exógena (PFALLER, 1996). Interessantemente, dados aqui encontrados, corroboram com aqueles do estudo de Martins-Diniz e cols (2005), uma vez que, *Candida* spp e *Trichosporon* spp foram detectados nos leitos de diferentes Unidades hospitalares, especialmente em UTIs. Em adição, o atual estudo comprova a existência de um elo epidemiológico entre microbiota ambiental e fonte clínica de onde havia descrição de candidemia. De fato, segundo Vazquez e cols (1998), o meio ambiente pode ser contaminado passivamente pelos micro-organismos oriundos de colonização ou infecção, portanto, precedentes de pacientes, assim como dos profissionais de saúde que ali atuem e vice-versa.

Em identidade com a literatura atual, *C. albicans* é, sem dúvida, a espécie frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas, descrita em diversas casuísticas mundiais (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; GODOY et al., 2003). Já o relato sobre incidência de fungemia por *C. dubliniensis* é incomum; explicação plausível para essa baixa ocorrência, pode ser a classificação fenotípica equivocada dessa espécie como *C. albicans*. De fato, a exata identificação, apenas ocorre utilizando métodos moleculares, como por exemplo, o PCR (JABRA-RIZK et al., 2005). Aqui

exclui-se tal equívoco, no entanto, a baixa ocorrência foi fato observado, corroborando com outros estudos (HAJJEH et al., 2004; JABRA-RIZK et al., 2000; SANCAK et al., 2003). Os resultados gerados pós RAPD confirmaram a ampla variabilidade genética para a espécie *C. albicans*, dado previamente demonstrado por Pinto e cols (2004). A comparação da similaridade entre os isolados, através de duas técnicas de biologia molecular (RAPD e PFGE) mostrou, através da análise pelo programa Gel Compar, que houve uma discrepância entre os métodos, demonstrando que os isolados clonais pelo RAPD se diferenciaram pelo PFGE, já os isolados idênticos pelo PFGE, apresentaram-se diferentes pelo RAPD. Importante ressaltar que, a porcentagem de similaridade apresentada pelo programa nos dá um embasamento aproximado de comparação entre os isolados, mas não podemos dizer que o resultado é 100% acerto, uma vez que para esse grau de informação, somente técnicas como o sequenciamento de DNA podem nos dar (SOLL, 2000).

Em estudos norte-americanos, *C. glabrata* é apontada como o segundo agente mais frequente de candidemia (ODDS et al., 2007). Vale destacar que, assim como em outros levantamentos realizados no Brasil, o número de *C. glabrata* isolada de hemocultura na presente análise foi menor que o esperado (COLOMBO, 2000; DA MATTA et al., 2007; XAVIER et al., 2008). Com relação a análise genética destes, o padrão de identidade genética esteve presente em isolados oriundos de hospitais distintos (2AL/51h1), que apesar de ressaltar nenhuma relação epidemiológica específica, estudos complementares poderão identificar uma origem comum.

C. guilliermondii, considerada aqui como isolado exclusivo de meio ambiente, foi destacada na pesquisa realizada por Lemes e Colombo (1998), uma vez que, foi isolada de mãos de profissionais da saúde, assim como do ambiente hospitalar. A diversidade de origens, não descarta a possibilidade de um encontro com hospedeiros debilitados, podendo caracterizar-se como agente importante de colonização primária e/ou infecção, conforme já descrito na literatura (MASALA et al., 2003). Assim como o estudo realizado por Pasqualotto e cols (2006), a espécie *C. guilliermondii*, foi encontrada apenas em isolados ambientais. No entanto, em adição ao observado, na presente investigação, o índice de similaridade genética obtida através do RAPD, esteve inferior a 90%, além de uma resposta fenotípica distinta, demonstrando nenhuma relação epidemiológica específica.

Dentro do complexo *parapsilosis*, os dados obtidos pelo presente estudo corroboram com a literatura no sentido de que *C. parapsilosis* foi a espécie mais prevalente, seguida de *C. orthopsilosis* (MELO et al., 1998; TAVANTI et al., 2007; ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2000). A correlação fenotípica e genotípica detectadas para *C. parapsilosis* (amostras clínicas e ambientais) foi, mais uma vez, observada aqui e em vários estudos descritos na literatura (ASBECK et al., 2007; LEMES & COLOMBO, 1998; SHIN et al., 2001). Tais descrições revelam a responsabilidade dos profissionais de saúde na cadeia de transmissão.

O achado de isolados clínicos seriados de *C. parapsilosis*, interpretados na presente proposta, diferentemente, tem sido limitado em outros Centros de Investigação (GOMEZ-LOPEZ et al., 2008; SHIN et al., 2001). Outros, tais como, Shin e cols (2001), descrevem esse evento e apresentam a ocorrência de correlação genética e fenotípica entre eles.

Diversos casos de infecção nosocomial em neonatos vêm sendo descritos, e, portanto corroboram com dados obtidos no presente trabalho (HUANG et al., 1999, 2000; LUPETTI et al., 2002). Aqui, de pacientes que ocuparam a mesma área física (UTI Neonatal), porém em períodos distintos (setembro de 2008 a abril de 2009), quatro isolados (16h2/16h3, 46h2/46h3) altamente relacionados foram detectados. Tal fato denota a manutenção ou permanência de fungos em mobília ou utensílios hospitalares, ou ainda, a provável participação humana (staff clínico) como fonte de aquisição (LUPETTI et al., 2002).

C. tropicalis, recuperada aqui, tanto de amostra clínica como ambiental, para um dos hospitais (Hospital 2), está, conforme já descrito na literatura, implicada na maioria das infecções fúngicas invasivas. Os surtos ocasionados por *C. tropicalis*, responsabilizando o ambiente hospitalar, têm sido descrito na literatura desde 1989 (FINKELSTEIN et al., 1993; ISEMBERG et al., 1989). Mais ainda, segundo Pfaller e cols (1987), a colonização persistente por *C. tropicalis*, pode ser fator predisponente para tais infecções disseminadas. Curiosamente, no estudo atual, seis isolados clonais foram obtidos, de onde se obteve concordância para as análises fenotípicas e genotípicas em 30%. A persistência de um clone durante o intervalo temporal, em UTIs distintas (37h1/54h1) ou não (20h1/52h1; 72h1/36h1) do Hospital 2, ressalta que, assim como em outros estudos, a participação conjunta entre o meio ambiente em relação com os

humanos é fato, o que expõe em risco as infecções hospitalares (MAROL & YUCESOY, 2007; SHIN et al., 2004).

Uma pequena proporção de candidemia causada por *P. anomala* (anteriormente *Hansenula anomala*) foi observada, concordando com vários estudos (ARAGÃO et al., 2001; CHAKRABARTI et al., 2001; KALENIC et al., 2001; MESTRONI & BAVA, 2003; PASQUALOTTO et al., 2005; THULER et al., 1997). Assim como o estudo realizado por Pasqualotto e cols (2005), *P. anomala* pode ser adquirida à partir de fonte única de contaminação e disseminação. Corroborando com essa afirmativa, os isolados clonais (73h2/92h2) oriundos de pacientes distintos internados na mesma área física (UTI Pediátrica) em curto intervalo de admissão (data de internação: 4/08/09 e 21/09/09), revelou cariótipo permanente.

Assim como o estudo realizado por Lemes e Colombo (1998), *T. asahii*, considerada espécie emergente para infecção sistêmica (JÚNIOR et al., 2008), na presente, revelou identidade genética, indicando uma possível rota comum de transmissão exógena em unidades de internação distintas dentro do Hospital 2, dado este apresentado também pelo estudo realizado por Silva e cols (2008).

Com relação a suscetibilidade antimicrobiana das espécies em estudo frente a anfotericina B, nenhum isolado foi considerado resistente, dado concordante com outros estudos atuais (MÍMICA et al., 2009).

Quanto aos derivados azólicos, os dados raros de resistência apresentados no presente estudo, já foram observados previamente por vários pesquisadores (CUENCA-ESTRELLA et al., 2002). Uma porta se abre para um desafio, onde espécies não-*albicans*, com perfil de sensibilidade variável, estão assumindo um papel cada vez maior em infecções nosocomiais. No entanto, a constante investigação se faz necessária, pois, em paralelo à debilidade do paciente, altas taxas de morbidade e mortalidade são vistos (BOAS & RUIZ, 2004; MORGAN et al., 2005; TURRINI, 2002).

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* correspondem às espécies prevalentes dos casos de candidemia.
- Leitos hospitalares são contaminados por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *T. asahii*.
- Tanto os isolados clínicos como os de ambiente apresentam suscetibilidade relativa aos azólicos; mas CIM elevadas foram detectadas.
- Através da técnica de RFLP foi possível definir as espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*;
- A análise conjunta das duas ferramentas (RAPD e PFGE) permitiu a caracterização molecular para a maioria das espécies de leveduras.
- O método genotípico discrimina isolados que se mostram idênticos pelo método fenotípico.
- A correlação clonal entre isolados clínicos e ambientais comprova a probabilidade de disseminação de cepas em ambiente hospitalar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELSON, J.A.; MOORE, T.; BRUCKNER, D.; DEVILLE, J.; NIELSEN, K. Frequency of fungemia in hospitalized pediatric inpatients over 11 years at a tertiary care institution. **Pediatrics**, v. 116, p. 61-67, 2005.

ALEXANDER, B.D. Diagnosis of fungal infection. New technologies for mycology laboratory. **Transplant Infectious Disease**, v.4, s.3, p. 32-32, 2002.

AL-JASSER, A.M. & ELKHIZZI, N.A. Distribution of *Candida* species among bloodstream isolates. **Saudi Medical Journal**, v. 25, p. 566-569, 2004.

ALMEIDA, A.M.; MATSUMOTO, M.T.; BAEZA, L.C.; DE OLIVEIRA, E.; SILVA, R.B.; KLEINER, A.A.; MELHEM, M.S.; MENDES GIANNINI, M.J.; Laboratory Group on Cryptococcosis. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from São Paulo State, Brazil. **FEMS Yeast Res**, v. 7, p. 152-164, 2007.

ALMIRANTE, B.; RODRIGUEZ, D.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ALMELA, M.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; ALONSO-TARRES, C.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; PAHISSA, A. Barcelona Candidemia Project Study Group. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1681-1685, 2006.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1829-1835, 2005.

ANDRADE, D.; ANGERAMI, E.L.S.; PADOVANI, C.R. Condição microbiológica dos leitos hospitalares antes de depois da limpeza. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 2, p. 163-9, 2000.

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

AQUINO, V.R.; LUNARDI, W.L.; GOLDMANI, L.Z.; BARTH, A.L. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, p. 411-4128, 2005.

ARAGÃO, P.A.; OSHIRO, I.C.; MANRIQUE, E.I.; GOMES, C.C.; MATSUO, L.L.; LEONE, C.; MORETTI-BRANCHINI, M.L.; LEVIN, A.S. *Pichia anomala* outbreak in a nursey: exogenous source? **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 20, p. 843-848, 2001.

ARENDRUP, M.C.; FUUSD, K.; GAHRN-HANSEN, B.; JENSEN, I.M.; KNUDSEN, J.D.; LUNDGREN, B.; SCHONHEYDER, H.C.; TVEDE, M. Seminatiol surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers isolates with reduced azole susceptibility. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 4434-40, 2005.

ASBECK, E.C.; HUANG, Y.; MARKHAM, A.N.; CLEMONS, K.V.; STEVENS D.A. *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. **Mycopathologia**, v. 164, p. 287-293, 2007.

BAIRES-VARGUEZ, L.; CRUZ-GARCÍA, A.; VILLA-TANAKA, L.; SÁNCHEZ-GARCIA, S.; GAITÁN-CEPEDA, L.A.; SÁNCHEZ-VARGAS, L.O.; QUINDÓS, G.; HERNÁNDEZ-RODRIGUEZ, C. Comparison of a randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and ATB ID 32C system for identification of clinical isolates of different *Candida* species. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 24, p. 148-151, 2007.

BARBERINO, M.G.; SILVA, N.; REBOUÇAS, C.; BARREIRO, K.; ALCÂNTARA, A.P.; NETTO, E.M.; ALBUQUERQUE, L.; BRITES, C. Evaluation of blood stream infections by *Candida* in three tertiary hospitals in Salvador, Brazil: a case-control study. **Brazilian Journal of Diseases**, v. 10, p. 36-40, 2006.

BARKER, K. S. & ROGERS, P. D. Recent Insights into the Mechanisms of Antifungal Resistance. **Currents Infectious Disease Reports**, v. 8, n. 6, p. 449-456, 2006.

BLUMBERG, H.M.; JARVIS, W.R.; SOUCIE, J.M.; EDWARDS, J.E.; PATTERSON, J.E.; PFALLER, M.A.; RANGEL-FRAUSTO, M.S.; RINALDI, M.G.; SAIMAN, R.T.; WIBLIN, R.T.; WENZEL, R.P.; et al. Risk factors for *Candida* blood stream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 2, p. 177-186, 2001.

BOAS, P.J.F.V. & RUIZ, T. Ocorrência de infecção hospitalar em idosos internados em hospital universitário. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 3, p. 372-8, 2004.

BOFF, E. & ALVES, S.H. **Relação entre a suscetibilidade de *Candida* spp a anfotericina B, com óbito ou sobrevivência dos pacientes em episódios de candidemia.** [tese]. RS: Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

BOLANO, A.; STINCHI, S.; PREZIOSI, R.; BISTONI, F.; ALLEGRUCCI, M.; BALDELLI, F.; MARTINI, A.; CARDINALI, G. Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Research** 1, p. 221-224, 2001.

BOLDO, X.M.; VILLA-TANACA, L.; ZUNIGA, G.; HERNANDEZ-RODRIGUEZ, C. Genetic diversity among clinical isolates of *Candida glabrata* analyzed by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis analyses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4799-4804, 2003.

BONASSOLI, L.A.; BERTOLI, M.; SVIDZINSKI, T.I. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. **Journal of Hospital Infection**, v. 59, n. 2, p. 159-162, 2005.

BOUSSO, A.; TERRA, C.M.; MARTINS, F.R.P.; VAZ, F.A.C. Infecção hospitalar em recém-nascido. **Pediatria**, v. 17, n. 1, p. 10-37, 1995.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Portaria n. 2616. Dispõe sobre: Programa de controle de infecção hospitalar. **Diário Oficial**, Brasília de 12 de maio de 1998.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Curso básico de controle de infecção hospitalar: Caderno C: Métodos de proteção antiinfecçiosa. Brasília (DF): **ANVISA**, 2000.

BRILHANTE, R.S.; COREDIRO, R.A.; MEDRANO, D.J. Onychomycosis in Ceara (Northeast Brazil): epidemiological and laboratory aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 131-135, 2005.

BRION, J.P.; EGGIMANN, P.; GRILLOT, R.; HERBRECHT, R.; LORTHOLARY, O.; PITTET, D.; POULAIN, D.; SOLLET, J.P.; VOSS, A.; VERWEIJ, P.; WOLFF, M. Les candidoses systémiques. **1ère Journée Interdisciplinaire sur les infections Fongiques (JIDFI) Optimed Editions**, Paris, 2001.

BRITO, L.R.; GUIMARÃES, T.; NUCCI, M.; ROSAS, R.C.; ALMEIDA, L.P.; MATTA, D.A.; COLOMBO, A.L. Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *C. parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, v. 44, p. 261-266, 2006.

CANO, M.V.; PERZ, J.F.; CRAIG, A.S. Candidemia in pediatric outpatients receiving home total parenteral nutrition. **Medical Mycology**, v. 43, n. 3, p. 219-225, 2005.

CANTÓN, E.; VIUDES, A.; PEMÁN, J. Infección sistêmica nosocomial por levaduras. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, n. 2, p. 51-55, 2001.

CANUTO, M. M. & RODERO, G. F. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 550-563, 2002.

CAREGNATO, R.C.A.; ALTMANN, A.R.; OLGUINS, J.S.; TAVARES, S.L.; WYZYKOWSKI, C. Vantagens e desvantagens do ácido peracético comparando com glutaraldeído. In: **Anais do 8º Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar; Curitiba, Brasil**. Curitiba: APECIH; 2002.

CHAKRABARTI, A.; SINGH, K.; NARANG, A.; SINGHI, S.; BATRA, R.; RAO, K.L.N.; RAY, P.; GOPALAN, S.; DAS, S.; GUPTA, V.; GUPTA, A.K.; BOSE, S.M.; MACNEIL, M.M. Outbreak of *Pichia anomala* infection in the pediatric service of a

tertiary-care center in Northern India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 1702-1706, 2001.

CHEN, K.W.; LO, H.J.; LIN, Y.H.; LI, S.Y. Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of *Candida albicans* clinical isolates in Taiwan. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, p. 249-258, 2005.

CHENG, M.F.; YANG, Y.L.; YAO, T.J.; LIN, C.Y.; LIU, J.S.; TANG, R.B.; YU, K.W.; FAN, Y.H.; HSIEH, K.S.; HO, M.; LO, H.J. Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida*. **BMC Infectious Diseases**, v. 5, p. 1-5, 2005.

CHONG, P.P.; HADI, S.R.A.; LEE, Y.L.; PHAN, C.L.; TAN, B.C.; NG, K.P.; SEOW, H.F. Genotyping and drug resistance profile of *Candida* spp. in recurrent and one-off vaginitis, and high association of non-*albicans* species with non-pregnant status. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, 4 ed., p. 449-456, 2007.

CHONG, P.P.; LEE, Y.L.; TAN, B.C.; NG, K.P. Genetic relatedness of *Candida* strains isolated from women with vaginal candidiasis in Malaysia. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 657-666, 2003.

CLARK, T.A.; SLAVINSKI, S.A.; MORGAN, J.; LOTT, T.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; BRANDT, M.E.; WEBB, R.M.; CURRIER, M.; FLOWERS, R.H.; FRIDKIN, S.K.; HAJJEH, R.A. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4468-4472, 2004.

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*. Approved standard – second edition M-27A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2002.

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*. Approved standard – third edition M-27A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2008.

COLOMBO, A.L. Epidemiology and treatment of hematogenous candidiasis: a Brazilian prospective. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, v. 4, p. 261-266, 2000.

COLOMBO, A.L. **Contribuições para o entendimento da epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. e para sua abordagem terapêutica** [Tese de Livre-Docência]. São Paulo (SP): Universidade Federal de São Paulo, 2003.

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

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

COLOMBO, A.L.; PERFECT, J.; DINUBILE, M.; BARTIZAL, K.; MOTYL, M.; HICKS, P.; LUPINACCI, R.; SABLE, C.; KARTSONIS, N. Global distribution and outcomes for *Candida* species causing invasive candidiasis: results from an international randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin B for the treatment of invasive candidiasis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 22, p. 470-474, 2003.

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

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

COSTA, S.F.; MARINHO, I.; ARAÚJO, E.A.; MANRIQUE, A.E.; MEDEIROS, E.A.S.; LEVIN, A.S. Nosocomial fungaemia: a 2-year prospective study. **Journal of Hospital Infections**, v. 45, p. 69-72, 2000.

CUENCA-ESTRELLA, M.; RODERO, L.; GARCÍA-EFFRÓN, G.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; Antifungal susceptibilities of *Candida* spp. isolated from blood in Spain and Argentina, 1996-1999. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 981-987, 2002.

CUENCA-ESTRELLA, M.; GOMEZ-LOPEZ, A.; MELLADO, E.; BUITRAGO, M. J.; MONZON, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 50, n. 3, p. 917-921, 2006.

CURTIS, L.T. Prevention of hospital-acquired infections: review of non-pharmacological interventions. **Journal of Hospital Infection**, v. 69, n. 3, p. 204-219, 2008.

DA MATTA, D.A.; ALMEIDA, L.P.; MACHADO, A.M.; AZEVEDO, A.C.; KUSANO, E.J.U.; TRAVASSOS, N.F.; SALOMÃO, R.; COLOMBO, A.L. Antifungal susceptibility of 1,000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 57, n. 4, p. 399-404, 2007.

DATRY, A.; THELLIER, M.; TRAORÉ, B.; CISSÉ, O.A.; DANIS, M. Utilisation des antifongiques dans le Traitement des Candidoses systémiques: antifongigramme, point

sur les resistances, données pharmacologiques. **Ann. Fr. Anesth. Reanim**, v. 20, p. 389-393, 2001.

DAVID, C.M.N. Infecção em UTI. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 31, p. 337-348, 1998.

DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A.; JONES, R.N. Age-related trends in pathogen frequency and antimicrobial susceptibility of bloodstream isolates in North America. Sentry Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2000. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 20, p. 412-418, 2002.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **The Lancet Infectious Diseases**, London, v. 3, p.685-702, 2003.

ELLIS, M. Invasive Fungal Infections: evolving challenges for diagnosis and therapeutics. **Molecular Immunology**, v. 38, p. 947-957, 2002.

ELLIS, M.; HEDSTROM, U.; JUMAA, A.; BENER, A. Epidemiology, presentation, management and outcome of candidemia in a tertiary care teaching hospital in the United Arab Emirates, 1995-2001. **Medical Mycology**, v. 41, p. 521-528, 2003.

ERGON, M.C. & GULAY, Z. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from urine at an intensive care unit. **Mycoses**, v. 48, p. 126-31, 2005.

ESPINEL-INGROFF, A. Clinical utility of *in vitro* antifungal susceptibility testing. **Rev. Esp. Quimioter.** v. 13, n. 2, p. 1-7, 2000.

ESPINEL-INGROFF, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, n. 2, p. 101-106, 2008.

ESPINEL-INGROFF, A.; VAZQUEZ, J.A.; BOIKOV, D.; PFALLER, M.A. Evaluation of DNA-based typing procedures for strain categorization of *Candida* spp. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, p. 231-239, 1999.

FALLAAS, M.E.; APOSTOLOU, K.E.; PAPPAS, V.D. Attributable mortality of candidemia: a sistematic review of matched cohort and case-control studies. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 25, p. 419-25, 2006.

FERNANDES, A.T.; OLIVIA, M.; FERNANDES, V.; RIBEIRO, N.F. **Infecção Hospitalar e suas interfaces na área da saúde**. São Paulo: Atheneu, v. 1, 2000.

FIDEL, P.L.; VAZQUEZ, J.A.; SOBEL, J.D. *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.1, p. 80-96, 1999.

FINKELSTEINS, R.; REINHERTZ, G.; HASHMAN, N.; MERZBACH, D. Outbreak of *Candida tropicalis* fungemia in a Neonatal Intensive Care Unit. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 14, n. 10, p. 587-590, 1993.

FOONGLADDA, S.; SAKULMAIWATANA, P.; PETLUM, P.; VAMPRAPAR, N. *Candida* species, genotypes and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from blood samples of patients at the largest tertiary care hospital in Thailand during 1999-2002. **Journal Medical Association Thailandia**, v. 87, p.92-99, 2004.

FRANÇA, J.C.B & FILHO, F.Q.T. **Estudo das candidemias no hospital de clínicas no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2004**. [tese]. Paraná: Universidade Federal do Paraná, 2006.

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

GAGNE, J.J.; BREITBART, R.E.; MAIO, V.; HORN, D.L.; HARTMANN, C.W.; SWANSON, R.; GOLDFARB, N.I. Costs associated with candidemia in a hospital setting. **P & T**, v. 31, p. 586, 619, 2006.

GAREY, K.W.; REGE, M.; PAI, M.P.; MINGO, D.E. SUDA, K.J.; TURPIN, R.S.; BEARDEN, D.T. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 25-31, 2006.

GARLAND, J.S. & UHING, M.S. Strategies to prevent bacterial and fungal infection in the Neonatal Intensive Care Unit. **Clinics in Perinatology**, v. 36, p. 1/13, 2009.

GODOY, P.; TIRABOSCHI, I.N.; SEVERO, L.C.; BUSTAMANTE, B.; CALVO, B.; DA MATTA, D.A.; COLOMBO, A.L. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. Bloodstream isolates from Latin American hospitals. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 401-405, 2003.

GOLDANI, L.Z. & MARIO, P.S. *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. **Journal of Infection**, v. 46, p. 150-160, 2003.

GOMEZ-LOPEZ, A.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; RODRIGUEZ, D.; ALMIRANTE, B.; PAHISSA, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; CUENCA-ESTRELLA, M.; Barcelona Candidemia Project Study Group. Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1506-1509, 2008.

GUANNOUM, M.A. & RICE, L.B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 501-517, 1999.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A.M. Developments in Fungal taxonomy. **Clinical Microbiology reviews**, v.12, p. 454-500, 1999.

GUDLAUGSSON, O.; GILLESPIE, S.; LEE, K.; VANDE, J.; HU, J.; MESSER, S.; HERWALDT, M.; PFALLER, M.; DIEKEMA, D. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, p. 1172-1177, 2003.

GUPTA, N.; MITTAL, N.; SOOD, P. Candidemia in neonatal intensive care unit. **Indian Journal Pathology Microbiology**, v.44, n.1, p. 45-48, 2001.

HAJJEH, R.A.; SOFAIR, A.N.; HARRISON, L.H.; LYON, G.M.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; MIRZA, S.A.; PHELAN, M.; MORGAN, J.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M.A.; BENJAMIM, L.E.; SANZA, L.T.; HUIE, S.; YEO, S.F.; BRANDT, M.E.; WARNOCK, D.W. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998-2000 in a population-based active surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology** v. 2, n. 4, p. 1519-1527, 2004.

HANNULA, J.; JOUSIMIES-SOMER, H.; TAKALA, A.; SYRJANEN, R.; KONONEM, E.; ASIKAISNEM, S. Age-related acquisition of oral and nasopharyngeal yeast species and stability of colonization in young children. **Oral Microbial Immunology**, v. 14, p. 176-182, 1999.

HERSCHLEB, J.; ANANIEV, G.; SCHWARTZ, D.C. Pulsed-field gel electrophoresis. **Nature Protocols**, v. 2, n. 3, p. 667-684, 2007.

HINRICHSSEN, S.L.; FALCÃO, E.; VILELLA, T.A.S.; COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; MOURA, L.; RÊGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 394-398, 2008.

HOOG, G.S. & GUARRO, J. **Atlas of clinical fungi**. Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands/Universitat Rovira i Virgili, p. 125-237, 2001.

HUANG, Y.C.; LIN, T.Y.; LEU, H.S.; PENG, H.L.; WU, J.H.; CHANG, H.Y. Outbreak of *Candida parapsilosis* fungemia in neonatal intensive care units: clinical implications and genotyping analysis. **Infection**, v. 27, p. 71-102, 1999.

HUANG, Y. C.; LIN, T. Y.; LIEN, R. I.; CHOU, Y. H.; KUO, C. Y.; YANG, P. H.; HSIEH, W. S. Candidemia in special care nurseries: comparison of *albicans* and *parapsilosis* infection. **Journal of Infection**, v. 40, p. 171-175, 2000.

IROBI, J.; SCHOOF, A.; GOOSENS, H. Genetic identification of *Candida* species in HIV-positive patients using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of its DNA. **Mol Cell Probes**, vol. 14, p. 401-406, 1999.

ISEMBERG, H.D.; TUCCI, V.; CINTRON, F.; SINGER, C.; WEINSTEIN, G.S.; TYRAS, D.H. Single-source outbreak of *Candida tropicalis* complicating coronary bypass surgery. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 11, p. 2426-28, 1989.

JABRA-RIZK, M.A.; FALKLER, W.A.; MERZ, W.G.; BAQUI, A.A.M.A.; KELLEY, J.I.; MEILLER, T.F. Retrospective identification and characterization of *Candida*

dubliniensis isolates among *Candida albicans* Clinical Laboratory isolates from Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected and Non-HIV-Infected Individuals. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 2423–2426, 2000.

JABRA-RIZK, M.A.; JOHNSON, J.K.; FORREST, G.; MANKES, K.; MEILLER, T.F.; VENEZIA, R.A. Prevalence of *Candida dubliniensis* Fungemia at a Large Teaching Hospital. **Clinical Infectious Diseases**, v.41, p. 1064-67, 2005.

JANG, S.J.; HAN, H.L.; LEE, S.H.; RYU, S.Y.; CHAULAGAIN, B.P.; MOON, Y.L.; KIM, D.H.; JEONG, O.Y.; SHIN, J.H.; MOON, D.S.; PARK, Y.J. PFGE-based epidemiological study of an outbreak of *Candida tropicalis* candiduria: the importance of medical waste as a reservoir of nosocomial infection. **Japanese Journal Infectious Diseases**, v. 58, p. 2263-267, 2005.

JÚNIOR, A.A.P.F.; CARVALHO, R.T.; FOCACCIA, R.; FERNADEZ, J.G.; ARAÚJO, H.B.N.; STRABELLI, T.M.V.; KOPEL, L.; LAGE, S.G. Emergência de infecção por *Trichosporon asahii* em pacientes portadores de insuficiência cardíaca em Unidades de Terapia Intensiva Cardiológica. Relato de caso e revisão da literatura. **RBTI**, v. 20, n. 1, p. 106-109, 2008.

KALENIC, S.; JANDRLIC, M.; VEGAR, V.; ZUECH, N.; SEKULIC, A.; MLINARIC-MISSONI, E. *Hansenula anomala* outbreak at a surgical intensive care unit: a search for risk factors. **European Journal of Epidemiology**, v. 17, p. 491-496, 2001.

KANAFANI, Z. A. & PERFECT, J. R. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 1, p. 120-128, 2008.

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

KLEPSER, M. E. Antifungal resistance among *Candida* species. **Pharmacotherapy**, v. 21, n. 8S, p. 124S-132S, 2001.

KRAMER, A.; SCHWEBKE, I.; KAMPF, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. **BMC Infectious Diseases**, vol. 6 (130), p. 1-8, 2006.

KREMERY, V. Is there *in vivo-in vitro* correlation between antifungal susceptibility, species of *Candida* spp and clinical outcome? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, p. 537-539, 2000.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. 9. ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos, 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. **Revista Ciência, Cuidado e Saúde**, v. 6, n. 2, p. 181-186, 2007.

LEMES, R.M.L. & COLOMBO, A.L. **Análise fenotípica e genotípica de leveduras isoladas de ambiente hospitalar, profissionais de saúde e pacientes: implicações na colonização e rota de infecção** [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1998.

LEMOES, J.A.; COSTA, C.R.; ARAÚJO, C.R.; SOUZA, L.K.H.; SILVA, M.R.R. Teste de suscetibilidade de *Candida albicans* isoladas da mucosa orofaríngea de pacientes HIV+, ao fluconazol, anfotericina B e caspofungina: Cinética de morte de caspofungina e anfotericina B contra isolados fluconazol resistentes e suscetíveis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 163-169, 2009.

LEVIN, A.S.; COSTA, S.F.; MUSSI, N.S.; BASSO, M.; SINTO, S.I.; MACHADO, C.; GEIGER, D.C.; VILLARES, M.G.; SCHEIBER, A.Z.; BARONE, A.A.; BRANCHINI, M.L. *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semi-implantable central venous catheters and the hands of health care workers. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, p. 243-249, 1998.

LIN, M.Y.; CARMELI, Y.; ZUMSTEG, J.; FLORES, E.L.; TOLENTINO, J.; SREERAMOJU, P.; WEBER, S. Prior antimicrobial therapy and risk for Hospital-acquired *Candida glabrata* and *Candida krusei* fungemia: a case-control study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4555-4560, 2005.

LOEFFLER, J. & STEVENS, D. A. Antifungal drug resistance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36 (Suppl. 1), p. S31-41, 2003.

LOPEZ-SATRE, J.B.; COTO COTALLO, G.D.; FERNANDEZ COLOMER, B.; Grupo de Hospitales Castillo. Neonatal intensive candidiasis: a prospective multicenter study of 118 cases. **American Journal Perinatology**, v. 20, n. 3, p. 153-163, 2003.

LUPETTI, A.; TAVANTI, A.; DAVINI, P.; GHELARDI, E.; CORSINI, V.; MERUSI, I.; BOLDRINI, A.; CAMPA, M.; SENESI, S. Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* Candidemia in a neonatal intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2363-2369, 2002.

MAGADIA, R.R. & WEINSTEIN, M.P. Laboratory Diagnosis of Bacteremia and Fungemia. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 15, p. 1-13, 2001.

MALANI, P.N.; BRADLEY, S.F.; LITTLE, R.S.; KAUFFMAN, C.A. Trends in species causing fungemia in a tertiary care medical centre over 12 years. **Mycoses**, v. 44, p. 446-9, 2001.

MALANI, A.; HMOUD, J.; CHIU, L.; CARVER, P.L.; BIELACZYK, A.; KAUFFMAN, C.A. *Candida glabrata* Fungemia: Experience in a Tertiary Care Center. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. 975-81, 2005.

MARCHETTI, O.; BILLE, J.; FLUCKIGER, U. EGGIMANN, P.; RUEF, C.; GARBINO, J.; CALANDRA, T.; GLAUSER, M.P.; TAUBER, M.G.; PITTET, D. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 311-320, 2004.

MARIANO, P.L.S.; MILAN, E.P.; MATTA, D.A.; COLOMBO, A.L. *Candida dubliniensis* identification in Brazilian yeast stock collection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 4, p. 533-538, 2003.

MAROL, S. & YUCESOY, M. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens of intensive care unit patients. **Mycoses**, v. 51, p. 40-49, 2007.

MARR, K.A.; SEIDEL, K.; WHITE, T.C.; BOWDEN, R.A. Candidemia in allogeneic blood and marrow transplant recipients: evolution of risk factors after the adoption of prophylactic fluconazole. **Journal Infectious Diseases**, v.181, p. 309-16, 2000.

MARRA, A. & CAMARGO, L.F.A. Fluconazol ou anfotericina B no tratamento de candidemias em pacientes internados na UTI. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 48, n 2, p. 107, 2002.

MARTINS-DINIZ, J.N.; SILVA, R.A.M.; MIRANDA, E.T. MENDES-GIANNINI, M.J.S. Monitoramento de fungos anemófilos e de leveduras em unidade hospitalar. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 3, p. 398-405, 2005.

MASALA, L.; LUZZATI, R.; MACCACARO, L.; ANTOZZI, L.; CONCIA, E.; FONTANA, R. Nosocomial cluster of *Candida guilliermondii* fungemia in surgical patients. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.22, p. 686-688, 2003.

MATOS, D.; STROB, A.J.; RODRIGUEZ-LOPES, D.V. Fungos e bactérias em ar ambiente hospitalar avaliação do impacto de medidas de higienização. **In: Programa oficial e Anais do 4º Congresso Brasileiro de Micologia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto**, p.122, 2004.

MATSUMOTO, F.E.; GANDRA, R.F.; RUIZ, L.S.; AULER, M.E.; MARQUES, S.A.; PIRES, M.F.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a public hospital of Sao Paulo, Brazil. **Mycopathologia**. v.154, n. 2, p. 63-69, 2002.

MATTA, D.A.; ALMEIDA, L.P.; MACHADO, A.M.; AZEVEDO, A.C.; KUSANO, E.J.U.; TRAVASSOS, N.F.; SALOMÃO, R.; COLOMBO, A.L. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates of 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, n. 4, p. 399-404, 2007.

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

MEDRANO, D.J.A. & RABENHORST, S.H.B. **Perfil de sensibilidade e genotipagem de leveduras isoladas de pacientes com candidemia em dois hospitais de referência terciária de Fortaleza - Ceará** [tese]. Ceará: Universidade Federal do Ceará, 2004.

MELLADO, E.; CUENCA-ESTRELLA M.; RODRÍGUEZ-TUDELA J. L. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. **Enferm. Infec. Microbiol. Clin.**, v. 20, p. 523-530, 2002.

MELO, A.S.A.; ALMEIDA, L.P.; COLOMBO, A.L.; BRIONES, M.R.S. Evolutionary distances and identification of *Candida* species clinical isolates by Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD). **Mycopathologia**. v. 142, n. 2, p. 57-66, 1998.

MERZ, W.G. *Candida albicans* strain delineation. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, p. 321-334, 1990.

MESTRONI, S.A. & BAVA, A.L. *Hansenula anomala* fungemia. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 35, p. 54-56, 2003.

MÍMICA, L.M.J.; UEDA, S.M.Y.; MARTINO, M.D.V.; NAVARINI, A.; MARTINI, I.J. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n.1, p.17-23, 2009.

MIRANDA, L. N. & LEVIN, A.S.S. **Colonização por *Candida* em indivíduos com candidemia** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2007.

MIRHENDI, H.; MAKIMURA, K.; ZOMORODIAN, K.; MAEDA, N.; OHSHIMA, T.; YAMAGUCHI, H. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* using a single-enzyme PCR-RFLP method. **Journal of Infectious Diseases**, vol. 58, p. 235-237, 2005.

MISHRA, N. N.; PRASAD, T.; SHARMA, N.; PAYASI, A.; PRASAD, R.; GUPTA, D. K.; SINGH, R. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. A review. **Acta Microbiol. Immunol. Hung.**, v. 54, n. 3, p. 201-235, 2007.

MOBIN, M. & SALMITO, M.A. Microbiota fúngica dos condicionadores de ar nas unidades de terapia intensiva de Teresina, PI. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 6, p. 556-559, 2006.

MORAES, A.A.P. & SANTOS, R.L.D. Infecção em UTI geral de um hospital universitário. **Rev. Bras. Ter. Intensiva**, v. 15, n. 4, p. 135-41, 2002.

MORGAN, J. Global trends in candidemia: review of reports from 1995-2005. **Clinical Infectious Disease Report**, v. 7, p. 429-439, 2005.

MORGAN, J.; MELTZER, M.I.; PLIKAYTIS, B.D.; SOFAIR, A.N.; HUIE-WHITE, S.; WILCOX, S.; HARRISON, L.H.; SEABERG, E.C.; HAJJEH, R.A.; TEUTSCH,

S.M. Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. **Infection Control Hospital Epidemiology**, v.26, n.6, p. 540-7, 2005.

MORRELL, M.; FRASER, V.J.; KOLLEF, M.H. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, p. 3640-3645, 2005.

NOGUEIRA, P.S.F.; MOURA, E.R.F.; COSTA, M.M.F.; MONTEIRO, W.M.S.; BRONDI, L. Perfil de infecção hospitalar em um hospital universitário. **Rev. Enf.** v. 17, n. 1, p. 96-101, 2009.

NONAKA, C.F.W.; NASCIMENTO, G.J.F.; GOULART FILHO, J.A.V.; LIMA, K.C.; MILAN, E.P. *Candida dubliniensis* – levedura emergente associada à candidose oral. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 37, n. 2, p. 125-132, 2008.

NUCCI, M. & ANAISSE, E. Revisiting the source of candidemia: Skin or gut? **Clinical Infectious Diseases**, v.33, p. 1959-1967, 2001.

ODDS, F.C.; HANSON, M.F.; DAVIDSON, A.D.; JACOBSEN, M.D.; PAULINE, W.; WHYTE, J.A.; GOW, N.A.R.; JONES, B.L. One year prospective survey of *Candida* bloodstream infectious in Scotland. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 1066-1075, 2007.

OLIVE, D.M. & BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1661-1669, 1999.

PANNUTI, C.S. A importância do meio ambiente hospitalar. In: Rodriguez EAC et al. **Infecções hospitalares: prevenção e controle**. São Paulo: Sarvier, p. 449-54, 1997.

PAPPAS, P.G.; REX, J.H.; LEE, J.; HAMILL, R.J.; LARSEN, R.A.; POWDERLY, W.; KAUFFMAN, C.A.; HYSLOP, N.; MANGINO, J.E.; CHAPMAN, S.; HOROWITZ, H.W.; EDWARDS, J.E.; DISMUKES, W.E. For The NIAID Mycoses Study Group. A prospective observation study of candidemia: epidemiology, therapy and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, p. 634-643, 2003.

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

PASQUALOTTO, A.C.; NEDEL, W.I.; MACHADO, T.S.; SEVERO, L.C. A 9-year study comparing risk factors and the outcome of pediatrics and adults with nosocomial candidemia. **Mycopathologia**, v. 160, p. 111-116, 2005.

PASQUALOTTO, A.C.; SUKIENNIK, T.C.T.; SEVERO, L.C.; AMORIM, C.S.; COLOMBO, A.L. An outbreak of *Pichia anomala* fungemia in a brazilian pediatric

intensive care unit. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 26, n. 6, p. 553-558, 2005.

PASSOS, X.S. & SILVA, M.R.R. **Caracterização de fungos envolvidos em infecções nosocomiais – Goiânia [tese]**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2007.

PATEL, M.; KUNZ, D.F.; TRIVEDI, V.M.; JONES, M.G.; MOSER, S.A.; BADDLEY, J.W. Initial management of candidemia at an academic medical center: Evaluation of the IDSA guidelines. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 52, p. 29-34, 2005.

PÉMAN, J.; CANTON, E.; ORERO, A.; VIUDES, A.; FRASQUET, J.; GOBERNADO, M. Estudio multicéntrico sobre la epidemiología de las candidemias em España. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 19, p. 30-35, 2002.

PEREA, S. & PATTERSON, T. F. Antifungal resistance in pathogenic fungi. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 1073-1080, 2002.

PFALLER, M.A.; CABEZUDO, I.; KOONTZ, F.; BALE, M.; GINGRICH, R. Predictive value of surveillance cultures for systemic due to *Candida* species. **European Journal of Clinical Microbiology**, v. 6, p. 628-633, 1987.

PFALLER, M.A.; CABEZUDO, I.; HOLLIS, R.; HUSTON, B.; WENZEL, R.P. The use of biotyping and DNA fingerprinting in typing *Candida albicans* from hospitalized patients. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 13, p. 481-489, 1990.

PFALLER, M.A. Epidemiology and Control of Fungal Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22 (Suppl 2), S89-94, 1996.

PFALLER, M.A. & DIEKEMA, D.J. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4419-4431, 2004.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; JONES, R.N.; SADER, H.S.; FLUIT, A.C.; HOLLIS, R.J.; MESSER, S.A.; SENTRY Participant Group. International surveillance of bloodstream infectious 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p.3254-3259, 2001.

PFALLER, M.A.; JONES, R.N.; DOERN, G.V.; SADER, H.S.; MESSER, S.A.; HOUSTON, A.; COFFMAN, S.; HOLLIS, R.J. Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 747-751, 2000.

PINTO, P.M.; RESENDE, M.A.; KOGA-ITO, C.Y.; TENDLER, M. Genetic variability analysis among clinical *Candida* spp. isolates using Random Amplified Polymorphic DNA. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 147-152, 2004.

PLAYFORD, E. G.; EGGIMANN, P.; CALANDRA, T. Antifungals in the ICU. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, n. 6, p. 610-619, 2008.

PRASAD, R & KAPOOR, K. Multidrug resistance in yeast *Candida*. **International Review of Cytology**, v. 242, p. 215-248, 2005.

PUZNIAK, L.; TEUTSCH, S.; POWDERLY, W.; POLISH, L. Has the epidemiology of nosocomial candidemia changed? **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 25, p. 628-633, 2004.

RANGEL-FRAUSTO, M.S.; WIBLIN, T.; BLUMBERG, H.M.; SAIMAN, L.; PATTERSON, J.; RINALDI, M.; PFALLER, M.; EDWARDS, G.E.; JARVIS, JrW.; DAWSON, J.; WENZEL, R.P. National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, p.253-258, 1999.

REISS, E.; TANAKA, K.; BRUKER, G.; CHAZALET, V.; COLEMAN, D.; DEBEAUPUIS, J.P.; HANAZAWA, R.; LATGE, J.P.; LORTHOLARY, J.; MAKIMURA, K.; MORRISON, C.J.; MURAYAMA, S.Y.; NAOE, S.; PARIS, S.; SARFATI, J.; SHIBUYA, K.; SULLIVAN, D.; UCHIDA, K.; YAMAGUSHI, H. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. **Medical Mycology**, v. 36, p. 249-257, 1998.

RIBEIRO, E.L.; CASTRO, K.R.C.; NOLETO, M.B.; FERREIRA, W.M.; CARDOSO, C.G.; NAVES, P.L.F. Ocorrência de leveduras de *Candida* em hemoculturas originadas de infecções nosocomiais. **NewsLab**, ed. 60, p.78-83, 2003.

RIBEIRO, E.L.; GUIMARÃES, R.I.; INÁCIO, M.C.C.; FERREIRA, W.M.; CARDOSO, C.G.; DIAS, S.M.; NAVES, P.L.F. Aspectos das leveduras de *Candida* vinculadas as infecções nosocomiais. **NewsLab**, ed. 64, 2004.

RICHT, H.; ROUX, P.; DES CHAMPS, C.; ESNAULT, Y.; ANDREMONT, A. Candidemia in French hospitals: incidence rates and characteristics. **Clinical Microbiological Infectious**, v. 8, p. 405-12, 2002.

RODRIGUEZ, J.L.N. & MOREIRA, J.L.B. Infecções Fúngicas Nosocomiais. In: ROGERS, T. R. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, Suppl. 1, p. 7-11, 2006.

SAIMAN, L.; LUDINGTON, E.; DAWSON, J.; PATTERSON, J.E.; RANGEL-FRAUSTO, S.; WIBLIN, R.T.; BLUMBERG, H.M.; PFALLER, M.; RINALDI, M.; EDWARDS, J.E.; WENZEL, R.P.; JARVIS, W. and the National Epidemiology of Mycoses Study Group. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 20, p. 1119-1124, 2001.

SALDAR, A.; PERLIN, D.S.; ARMSTRONG, D. Hematogenous infections due to *Candida parapsilosis*: changing trends in fungemic patients at a comprehensive cancer center during the last four decades. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 44, p. 11-16, 2002.

SANCAK, B.; REX, J.H.; PAETZNICK, V.; CHEN, E.; RODRIGUEZ, J. Evaluation of a method for identification of *Candida dubliniensis* bloodstream isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 489-491, 2003.

SANDVEN, P.; BEVANGER, L.; DIGRANES, A.; HAUKLND, H.H.; MANNSAKER, T.; GAUSTAD, P. Candidemia in Norway (1001 to 2003): results from a nationwide study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1977-1981, 2006.

SANDVEN, P. Epidemiology of candidemia. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.17, p. 73-81, 2000.

SANGLARD, D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeast. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 20, n. 9, p. 462-470, 2002.

SANGLARD, D. & ODDS, F.C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 73-85, 2002.

SHIN, J.H.; KIM, M.; SHIN, D.H.; JUNG, S.; KIM, K.J.; CHO, D.; KEE, S.J.; SHIN, M.G.; SUH, S.P.; RYANG, D.W. Genetic Relatedness among *Candida tropicalis* isolates from sporadic cases of fungemia in two university hospitals in Korea. **Infection Control and Hospital epidemiology**, p. 634-640, 2004.

SHIN, J.H.; SHIN, D.H.; SONG, J.W.; KEE, S.J.; SUH, S.P.; RYANG, D.W. Eletrophoretic karyotype of sequential *Candida parapsilosis* isolates from patients with persistent or peccurrent fungemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 1258-1263, 2001.

SHORR, A.F.; GUPTA, V.; JOHANNES, R.S.; SUN, X.; SPALDING, J.; TABAK, Y.P. Burden of early-onset candidemia: analysis of culture-positive bloodstream infections from a large US database. **Critical Care Medicine**, v. 37, p. 2519-2526, 2009.

SILVA, R.B.O.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MATSUMOTO, M.T.; BAEZA, L.C.; BENADUCCI, T.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Genetic diversity and antifungal susceptibility testing of *Trichosporon asahii* isolated of intensive care units patients, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 585-592, 2008.

SOLL, D.R. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi, **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 332-370, 2000.

STOLL, P. & MOREIRA, L.B. **Impacto da implantação das unidades de ambiente protegido no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS**. [tese]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

SVIDZINSKI, A.E.; POSSETO, I.; PÁDUA, R.A.F.; TAVARES, T.R.; SVIDZINSKI, T.I.E. Eficiência do ácido peracético no controle de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente. **Revista Ciencia, Cuidado e Saúde**, v. 6, n. 3, p. 312-318, 2007.

TAVANTI, A.; HENSGENS, L.A.; GHELARDI, E.; CAMPA, M.; SENESI, S. Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by AFLP reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within the same patient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1455-1462, 2007.

TAYLOR, J.W.; GEISER, D.M.; BURT, A.; KOFOPOANOU, V. The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 126-146, 1999.

THULER, L.C.S.; FAIVICHENCO, S.; VELASCO, E.; MARTINS, C.A.; NASCIMENTO, C.R.G.; CASTILHO, I.A.M.A. Fungemia caused by *Hansenula anomala*: na outbreak in a câncer hospital. **Mycoses**, v. 40, p. 193-196, 1997.

TORTORANO, A.M.; PEMAN, J.; BERNHARDT, H.; KLINGSPOR, L.; KIBBLER, C.C.; FAURE, O.; BIRAGHI, E.; CANTON, E.; ZIMMERMANN, K.; SEATON, S.; GRILLOT, R.; ECMM WORKING GROUP ON CANDIDAEMIA. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 23, p. 317-322, 2004.

TURRINI, R.N.T. Infecção hospitalar e mortalidade. **Revista da Escola de Enfermagem USP**, v. 36, n. 2, p. 177-83, 2002.

TROST, A.; GRAF, B.; EUCKER, J.; SEZER, O.; POSSINGER, K.; GOBEL, U.B.; ADAM, T. Identification of clinically relevant yeasts by PCR/RFLP. **Journal of Microbiology Methods**, v. 56, p. 201-211, 2004.

VALÉRIO, H.M.; WEIKERT-OLIVEIRA, R.C.B.; RESENDE, M.A. Differentiation of *Candida* species obtained from nosocomial candidemia using RAPD-PCR technique. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 2, p. 174-178, 2006.

VAZQUEZ, J.A.; SANCHEZ, V.; VAZQUEZ, M.; SOBEL, J.D.; DMUCHOWSKI, C.; ZERVOS, M.J. Nosocomial *Candida glabrata* Colonization: An Epidemiologic Study, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 421-26, 1998.

VILLARI, P.; IACUZIO, L.; TORRE, I.; SCARCELLA, A. Molecular epidemiology as an effective tool in the surveillance of infections in the neonatal intensive care unit. **Journal of Infection**, v. 37, p. 274-281, 1998.

VISCOLI, C.; GIRMENIA, C.; MARINUS, A.; COLLETTE, L.; MARTINO, P.; VANDERCAM, B.; DOYEN, C.; LEBEAU, B.; SPENCE, D.; KRCMERY, V.; DE PAUW, B.; MEUNIER, F. Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European

Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, p. 1071-9, 1999.

VIUDES, A.; PEMAN, J.; CANTON, E.; ÚBEDA, P.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; GOBERNADO, M. Candidemia at a Tertiary-Care Hospital: Epidemiology, Treatment, Clinical Outcome and Risk Factors for Death. **European Journal of Microbiology Infectious Diseases**, vol. 21, p.767-774, 2002.

WARNOCK, D.W. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 48, p. 1-12, 2007.

WEY, S.B.; MORI, M.; FALLER, M.A.; WOOLSON, R.F.; WENZEL, R.P. Hospital-acquired candidemia: the attributable mortality and excess length of stay. **Arch. Intern. Med.** v. 148, p. 2642-5, 1988.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S.M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R.P.; EDMOND, M.B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p. 309-317, 2004.

XAVIER, P.C.N. & CHANG, M.R. **Análise epidemiológica molecular de candidemia em pacientes internados no NHU-UFMS** [tese]. Campo Grande – MS: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2008.

XAVIER, P.C.N.; CHANG, M.R.; NUNES, M.O.; PALHARES, D.B.; SILVA, R.A.; BONFIM, G.F.; JUNIOR, N.F.A. Candidemia neonatal, em hospital público do Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 459-463, 2008.

ZANCONATO, R.V.; PEREIRA, W.K.V.; ABEGG, M.A. Condição microbiológica de colchões hospitalares antes e após sua desinfecção. **Prática Hospitalar**, n. 52, p. 68-72, 2007.

ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; JAMES, M.J.; DEROSI, A.P.; SAMPAIO, J.L.M.; MUNIZ, M.M.; LI, R.K.; NASCIMENTO, A.S.A.; PERALTA, J.M.; REISS, E. Strains characterization of *Candida parapsilosis* fungemia by molecular typing methods. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 19, p. 514-520, 2000.

ZAOUTIS, T.E.; ARGON, J.; CHU, J.; BERLIN, J.A.; WALSH, T.J.; FEUDTNER, C. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. 1232-1239, 2005.

APÊNDICE

9. APÊNDICE

Distribuição dos isolados encontrados a partir do tipo de material, origem, data da colheita, unidade de internação e data de internação.

Paciente	Número isolado	Material	Origem da cepa	Data da colheita	Unidade de internação	Data internação
1	1-h1	Hemocultura	Hospital 1	8/2/2008	Enfermaria 1	3/2/2008
	1-AL	Leito AL	Hospital 1	13/2/2008	Enfermaria 1	3/2/2008
	1-DL	Leito DL	Hospital 1	13/2/2008	Enfermaria 1	3/2/2008
2	2-h1	Hemocultura	Hospital 1	5/8/2008	Enfermaria 1	4/8/2008
	2-DL	Leito DL	Hospital 1	7/8/2008	Enfermaria 1	4/8/2008
3	3-h1	Hemocultura	Hospital 1	5/2/2008	UTI Pediátrica	5/2/2008
	3-AL	Leito AL	Hospital 1	7/2/2008	UTI Pediátrica	5/2/2008
4	4-h1	Hemocultura	Hospital 1	5/2/2008	UTI Geral 2	31/1/2008
	4-AL	Leito AL	Hospital 1	10/3/2008	UTI Geral 2	31/1/2008
5	5-h1	Hemocultura	Hospital 1	20/2/2008	Enfermaria 2	15/2/2008
	5-AL	Leito AL	Hospital 1	6/3/2008	Enfermaria 2	15/2/2008
6	6-h1	Hemocultura	Hospital 1	31/3/2008	Enfermaria 2	28/2/2008
	6-AL	Leito AL	Hospital 1	26/3/2008	Enfermaria 2	28/2/2008
	6-DL	Leito DL	Hospital 1	26/3/2008	Enfermaria 2	28/2/2008
7	7-h1	Hemocultura	Hospital 1	18/3/2008	Enfermaria 1	18/3/2008
	7-DL	Leito DL	Hospital 1	20/3/2008	Enfermaria 1	18/3/2008
8	8-h1	Hemocultura	Hospital 1	6/9/2008	UTI Geral 3	1/9/2008
	8-AL	Leito AL	Hospital 1	6/10/2008	UTI Geral 3	1/9/2008
	8-DL	Leito DL	Hospital 1	6/10/2008	UTI Geral 3	1/9/2008
9	9-h1	Hemocultura	Hospital 2	12/8/2007	UTI Geral 5	19/7/2007
	9-AL	Leito AL	Hospital 2	19/8/2007	UTI Geral 5	19/7/2007
	9-DL	Leito DL	Hospital 2	19/8/2007	UTI Geral 5	19/7/2007
10	10-h1	Hemocultura	Hospital 2	30/8/2007	UTI Neonatal	17/8/2007
	10-AL	Leito AL	Hospital 2	11/9/2007	UTI Neonatal	17/8/2007
11	11-h1	Hemocultura	Hospital 2	13/11/2007	UTI Pediátrica	12/8/2007
	11-DL	Leito DL	Hospital 2	16/5/2008	UTI Pediátrica	12/8/2007
12	12-h1	Hemocultura	Hospital 2	11/12/2007	Enfermaria 6	11/12/2007
	12-DL	Leito DL	Hospital 2	31/12/2007	Enfermaria 6	11/12/2007
13	13-h1	Hemocultura	Hospital 2	19/5/2008	UTI Pediátrica	13/5/2008
	13-DL	Leito DL	Hospital 2	11/10/2008	UTI Pediátrica	13/5/2008
14	14-h1	Hemocultura	Hospital 2	13/9/2007	UTI Emergência	22/8/2007
	14-AL	Leito AL	Hospital 2	25/9/2007	UTI Emergência	22/8/2007
15	15-h1	Hemocultura	Hospital 2	23/9/2008	UTI Emergência	3/9/2008

	15-AL	Leito AL	Hospital 2	2/10/2008	UTI Emergência	3/9/2008
16	16-h1	Hemocultura	Hospital 2	9/9/2008	UTI Neonatal	27/7/2008
	16-h2	Hemocultura	Hospital 2	27/9/2008	UTI Neonatal	27/7/2008
	16-AL	Leito AL	Hospital 2	23/9/2008	UTI Neonatal	27/7/2008
	16-h3	Hemocultura	Hospital 2	2/11/2008	UTI Neonatal	27/7/2008
17	17-h1	Hemocultura	Hospital 2	27/9/2008	UTI Geral 7b	3/10/2008
18	18-h1	Hemocultura	Hospital 2	28/10/2008	Enfermaria 6	10/9/2008
	18-AL	Leito AL	Hospital 2	12/12/2008	Enfermaria 6	10/9/2008
19	19-h1	Hemocultura	Hospital 1	31/10/2008	UTI Geral 3	26/10/2008
20	20-h1	Hemocultura	Hospital 2	21/11/2008	UTI Emergência	7/10/2008
	20-AL	Leito AL	Hospital 2	19/12/2008	UTI Emergência	7/10/2008
21	21-h1	Hemocultura	Hospital 2	8/12/2008	UTI Pediátrica	25/11/2008
	22-AL	Leito AL	Hospital 2	18/1/2009	UTI Pediátrica	25/11/2008
22	22-h1	Hemocultura	Hospital 2	7/1/2009	UTI Neonatal	30/12/2008
23	23-h1	Hemocultura	Hospital 1	28/1/2009	Enfermaria 2	23/1/2009
24	24-h1	Hemocultura	Hospital 2	30/11/2008	UTI Geral 7a	31/10/2008
25	25-h1	Hemocultura	Hospital 1	18/12/2008	UTI Geral 1	13/12/2008
26	26-h1	Hemocultura	Hospital 1	20/12/2008	UTI Geral 1	15/12/2008
27	27-h1	Hemocultura	Hospital 1	11/3/2008	Enfermaria 1	6/3/2008
28	28-h1	Hemocultura	Hospital 1	28/12/2008	Enfermaria 1	27/12/2008
29	29-h1	Hemocultura	Hospital 1	5/6/2008	UTI Geral 2	30/5/2008
30	30-h1	Hemocultura	Hospital 1	26/3/2008	UTI Geral 3	21/3/2008
31	31-h1	Hemocultura	Hospital 1	3/4/2008	Enfermaria 2	28/3/2008
32	32-h1	Hemocultura	Hospital 1	27/1/2008	UTI Geral 2	22/1/2008
33	33-h1	Hemocultura	Hospital 1	24/6/2008	Enfermaria 1	23/6/2008
34	34-h1	Hemocultura	Hospital 2	15/1/2009	UTI Pediátrica	6/1/2009
35	35-h1	Hemocultura	Hospital 2	13/2/2009	UTI Pediátrica	9/2/2009
	35-h2	Hemocultura	Hospital 2	18/2/2009	UTI Pediátrica	9/2/2009
36	36-h1	Hemocultura	Hospital 2	16/11/2009	UTI Geral 7b	6/11/2008
37	37-h1	Hemocultura	Hospital 2	22/2/2009	UTI Geral 7b	8/2/2009
38	38-h1	Hemocultura	Hospital 2	21/1/2009	UTI Geral 7a	7/1/2009
39	39-h1	Hemocultura	Hospital 2	22/1/2009	EMER UTI	1/2/2009
40	40-h1	Hemocultura	Hospital 2	17/12/2008	Enfermaria 5	17/11/2009
41	41-h1	Hemocultura	Hospital 2	17/12/2008	UTI Geral 7a	11/12/2008
42	42-h1	Hemocultura	Hospital 2	10/12/2008	UTI Geral 5	21/11/2008
43	43-h1	Hemocultura	Hospital 2	1/12/2008	UTI Geral 7b	3/11/2008
44	44-h1	Hemocultura	Hospital 2	20/2/2009	UTI Pediátrica	2/4/2009
45	45-h1	Hemocultura	Hospital 2	15/3/2009	UTI Neonatal	6/3/2009
	45-h2	Hemocultura	Hospital 2	24/3/2009	UTI Neonatal	6/3/2009
46	46-h1	Hemocultura	Hospital 2	14/3/2009	UTI Neonatal	12/2/2009
	46-h2	Hemocultura	Hospital 2	29/3/2009	UTI Neonatal	12/2/2009
	46-h3	Hemocultura	Hospital 2	17/4/2009	UTI Neonatal	12/2/2009
	46-h4	Hemocultura	Hospital 2	22/4/2009	UTI Neonatal	12/2/2009

	46-h5	Hemocultura	Hospital 2	17/8/2009	UTI Neonatal	12/2/2009
	46-h6	Hemocultura	Hospital 2	30/9/2009	UTI Pediátrica	18/8/2009
	46-h7	Hemocultura	Hospital 2	4/10/2009	UTI Pediátrica	18/8/2009
	46-h8	Hemocultura	Hospital 2	8/10/2009	UTI Pediátrica	18/8/2009
47	47-h1	Hemocultura	Hospital 2	23/3/2009	UTI Neonatal	14/2/2009
	47-AL	Leito AL	Hospital 2	13/4/2009	UTI Neonatal	14/2/2009
48	48-h1	Hemocultura	Hospital 2	26/3/2009	UTI Geral 7b	23/2/2009
49	49-h1	Hemocultura	Hospital 2	28/3/2009	Enfermaria 4	27/3/2009
	49-AL	Leito AL	Hospital 2	15/4/2009	Enfermaria 4	27/3/2009
50	50-h1	Hemocultura	Hospital 2	28/8/2008	UTI Geral 7a	27/8/2009
	50-DL	Leito DL	Hospital 2	28/8/2008	UTI Geral 7a	27/8/2009
51	51-h1	Hemocultura	Hospital 2	29/6/2008	UTI Geral 6	29/6/2009
	51-AL	Leito AL	Hospital 2	26/7/2008	UTI Geral 6	29/6/2009
52	52-h1	Hemocultura	Hospital 2	23/3/2008	EMER UTI	15/2/2008
53	53-h1	Hemocultura	Hospital 1	25/4/2009	Enfermaria 2	4/3/2009
	53-h2	Hemocultura	Hospital 1	17/5/2009	Enfermaria 2	4/3/2009
54	54-h1	Hemocultura	Hospital 2	8/4/2009	UTI Geral 7a	17/3/2009
55	55-h1	Hemocultura	Hospital 1	30/4/2009	UTI Geral 2	23/3/2009
56	56-h1	Hemocultura	Hospital 2	30/4/2009	UTI Pediátrica	11/4/2009
57	57-h1	Hemocultura	Hospital 2	30/4/2009	UTI Neonatal	11/4/2009
	57-h2	Hemocultura	Hospital 2	4/5/2009	UTI Neonatal	11/4/2009
58	58-h1	Hemocultura	Hospital 2	25/4/2009	UTI Emergência	8/4/2009
59	59-h1	Hemocultura	Hospital 2	4/5/2009	UTI Emergência	2/5/2009
60	60-h1	Hemocultura	Hospital 2	6/5/2009	UTI Pediátrica	6/5/2009
61	61-h1	Hemocultura	Hospital 2	13/5/2009	UTI Geral 7b	8/5/2009
62	62-h1	Hemocultura	Hospital 2	25/5/2009	UTI Emergência	5/5/2009
	62-AL	Leito AL	Hospital 2	3/6/2009	UTI Emergência	5/5/2009
	62-DL	Leito DL	Hospital 2	3/6/2009	UTI Emergência	5/5/2009
63	63-h1	Hemocultura	Hospital 1	19/5/2009	Enfermaria 2	2/4/2009
	63-AL	Leito AL	Hospital 1	28/5/2009	Enfermaria 2	2/4/2009
	63-DL	Leito DL	Hospital 1	28/5/2009	Enfermaria 2	2/4/2009
64	64-h1	Hemocultura	Hospital 2	12/5/2009	UTI Emergência	20/4/2009
65	65-h1	Hemocultura	Hospital 2	19/5/2009	UTI Geral 7a	13/4/2009
66	66-h1	Hemocultura	Hospital 2	29/5/2009	UTI Neonatal	20/5/2009
	66-AL	Leito AL	Hospital 2	19/6/2009	UTI Neonatal	20/5/2009
67	67-h1	Hemocultura	Hospital 2	6/6/2009	UTI Geral 7b	5/6/2009
68	68-h1	Hemocultura	Hospital 2	31/5/2009	UTI Pediátrica	21/5/2009
69	69-h1	Hemocultura	Hospital 2	26/5/2009	UTI Geral 5	26/5/2009
70	70-h1	Hemocultura	Hospital 2	4/6/2009	UTI Geral 3	21/5/2009
71	71-h1	Hemocultura	Hospital 2	16/6/2009	UTI Geral 7a	4/6/2009
	71-AL	Leito AL	Hospital 2	24/10/2009	UTI Geral 7a	4/6/2009
	71-DL	Leito DL	Hospital 2	24/10/2009	UTI Geral 7a	4/6/2009
72	72-h1	Hemocultura	Hospital 2	10/6/2009	UTI Geral 7b	7/5/2009

73	73-h1	Hemocultura	Hospital 2	21/7/2009	UTI Pediátrica	4/8/2009
	73-h2	Hemocultura	Hospital 2	11/7/2009	UTI Pediátrica	4/8/2009
74	74-h1	Hemocultura	Hospital 2	20/7/2009	UTI Geral 5	8/7/2009
	74-h2	Hemocultura	Hospital 2	6/8/2009	UTI Geral 5	8/7/2009
	74-h3	Hemocultura	Hospital 2	6/8/2009	UTI Geral 5	8/7/2009
	74-h4	Hemocultura	Hospital 2	24/8/2009	UTI Geral 5	8/7/2009
75	75-h1	Hemocultura	Hospital 2	15/7/2009	Enfermaria 2	17/7/2009
	75-h2	Hemocultura	Hospital 2	17/7/2009	Enfermaria 2	17/7/2009
76	76-h1	Hemocultura	Hospital 2	23/7/2009	UTI Emergência	23/7/2009
	76-AL	Leito AL	Hospital 2	11/8/2009	UTI Emergência	23/7/2009
77	77-h1	Hemocultura	Hospital 2	4/7/2009	Enfermaria 3	23/7/2009
78	78-h1	Hemocultura	Hospital 2	3/7/2009	UTI Geral 7b	23/7/2009
79	79-h1	Hemocultura	Hospital 2	1/8/2009	Enfermaria 6	13/7/2009
80	80-h1	Hemocultura	Hospital 2	30/7/2009	UTI Neonatal	16/6/2009
81	81-h1	Hemocultura	Hospital 2	31/7/2009	UTI Pediátrica	3/7/2009
	81-h2	Hemocultura	Hospital 2	2/8/2009	UTI Pediátrica	3/7/2009
82	82-h1	Hemocultura	Hospital 2	6/8/2009	UTI Pediátrica	26/6/2009
	82-DL	Leito DL	Hospital 2	30/8/2009	UTI Pediátrica	26/6/2009
83	83-h1	Hemocultura	Hospital 2	8/8/2009	UTI Geral 7b	30/7/2009
84	84-h1	Hemocultura	Hospital 2	20/8/2009	UTI Pediátrica	10/8/2009
85	85-h1	Hemocultura	Hospital 2	2/8/2009	UTI Emergência	2/8/2009
86	86-h1	Hemocultura	Hospital 2	22/8/2009	UTI Emergência	20/7/2009
	86-AL	Leito AL	Hospital 2	24/8/2009	UTI Emergência	20/7/2009
87	87-h1	Hemocultura	Hospital 1	20/8/2009	UTI Geral 2	23/7/009
88	88-h1	Hemocultura	Hospital 2	17/9/2009	UTI Emergência	9/8/2009
89	89-h1	Hemocultura	Hospital 2	19/9/2009	UTI Geral 7b	6/9/2009
90	90-h1	Hemocultura	Hospital 2	3/10/2009	UTI Geral 7a	25/9/2009
	90-DL	Leito DL	Hospital 2	21/10/2009	UTI Geral 7a	25/9/2009
91	91-h1	Hemocultura	Hospital 2	6/10/2009	UTI Geral 7b	23/9/2009
	91-AL	Leito AL	Hospital 2	23/10/2009	UTI Geral 7b	23/9/2009
	91-DL	Leito DL	Hospital 2	23/10/2009	UTI Geral 7b	23/9/2009
92	92-h1	Hemocultura	Hospital 2	4/10/2009	UTI Pediátrica	21/9/2009
	92-H2	Hemocultura	Hospital 2	13/10/2009	UTI Pediátrica	21/9/2009
93	93-h1	Hemocultura	Hospital 2	9/10/2009	UTI Pediátrica	23/9/2009
94	94-h1	Hemocultura	Hospital 1	19/10/2009	Enfermaria 2	14/10/2009
	94-h2	Hemocultura	Hospital 1	3/11/2009	Enfermaria 2	14/10/2009
95	95-h1	Hemocultura	Hospital 2	14/10/2009	UTI Geral 7b	22/9/2009
	95-h2	Hemocultura	Hospital 2	16/10/2009	UTI Geral 7b	22/9/2009
96	96-h1	Hemocultura	Hospital 2	21/10/2009	UTI Geral 5	1/9/2009
97	97-h1	Hemocultura	Hospital 2	25/10/2009	UTI Geral 3	21/9/2009
98	98-h1	Hemocultura	Hospital 2	22/10/2009	UTI Pediátrica	25/9/2009
	98-AL	Leito AL	Hospital 2	13/11/2009	UTI Pediátrica	25/9/2009

ANEXOS

10. ANEXO I

Descrição de fórmulas e modo de preparo de meios e reagentes utilizados no estudo

10.1 Meios e reagentes utilizados

10.1.1 Meios para isolamento das leveduras

Solução Salina 0,85% esterilizada

- NaCl (Vetec).....0,85 g
- Água destilada.....100 ml

Em um balão de 100 ml, foi adicionado cloreto de sódio à água destilada, agitado até completa dissolução, completado o volume para 100 ml, distribuído 2 ml em cada tudo de ensaio e autoclavado à 121°C por 15 minutos.

Ágar Sabouraud dextrose

- Sabouraud dextrose agar (Oxoid).....65 g
- Água destilada q.s.p1000 ml

Em um balão de 2000 ml, o Sabouraud foi adicionado à água destilada e homogeneizado. Após homogeneização, o meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos e distribuído em placas de Petri 90 X 15 mm.

10.1.2 Meios e soluções para identificação

Ágar fubá com Tween-80

- Farinha de milho.....12,5 g
- Ágar (Oxoid).....3,8 g
- Tween-80 (Becton).....3 ml

- Água destilada q.s.p300 ml

A farinha de milho foi adicionada a 300 ml de água destilada, aquecida durante uma hora a 60°C, filtrada através de gaze dobrada e o volume completado para 300 ml. O ágar foi adicionado ao preparo acima e aquecido até a sua completa fusão. Após acrescentar o Tween-80, o meio foi distribuído em alíquotas de 18 ml em tubos de ensaio e autoclavados a 121°C por 15 minutos. No momento do uso, o meio foi dissolvido e vertido em placas de Petri 90 X 15 mm.

CHROMagar *Candida*®

- CHROMagar *Candida* (CHROMagar).....47,6 g
- Água destilada q.s.p1000 ml

O meio foi aquecido em água destilada autoclavada, evitando a fervura, até que o pó estivesse completamente dissolvido. Em seguida, foi distribuído em placas de Petri 90 X 15 mm.

Coloração de Ziehl-Nielsen

Reagentes:

- Solução de fucsina fenicada de Ziehl

Solução A:

- Fucsina básica (Synth).....3,0 g
- Álcool etílico 95%100 ml

Em um gral, triturar a fucsina e pulverizá-la completamente e em seguida dissolvê-la, acrescentando o álcool etílico.

Solução B:

- Fenol liquefeito.....5,0 ml
- Água destilada95 ml

Dissolver o fenol liquefeito em água recentemente destilada. Misturar 10 ml da solução A com 90 ml da solução B. Deixar repousar. Filtrar após 24 horas.

- Solução de álcool-ácido

- Ácido clorídrico (Merck).....3,0 ml
- Álcool etílico 95%97 ml

- Corante de fundo

- Azul de metileno (Dinâmica).....0,3 g

- Água destilada100 ml

Técnica de coloração:

- Preparar o esfregaço, secar e fixar na lâmina;
- Cobrir o esfregaço com a solução de fucsina fenicada, aquecendo a lâmina com a chama do bico de Bunsen, até que sejam emitidos vapores, mas sem deixar ferver.

Continuar a aquecer a lâmina, interminantemente, durante 6 minutos;

- Descorar com a solução de álcool-ácido até que não se desprenda mais corante;
- Lavar a lâmina em água de torneira;
- Cobrir a lâmina com a solução de azul de metileno durante 30 segundos;
- Lavar em água de torneira e secar.

Meio de Gorodkova

- Peptona (Difco).....10 g
- Dextrose (Difco).....1 g
- Cloreto de Sódio (VETEC).....5 g
- Ágar (Himedia).....20 g
- Água destilada q.s.p1000 ml

Dissolver o ágar em água destilada, aquecendo em banho-maria. Adicionar peptona, glicose e sal, dissolvê-los e distribuir o meio em tubos. Autoclavar a 120°C durante 15 minutos. Guardar em refrigerador a 4°C.

Meio Yeast Carbon Base

- Fosfato monobásico de potássio (Synth).....1 g
- Sulfato de magnésio heptahidratado (CRQ).....0,5 g
- Dextrose (Difco).....20 g
- Ágar (Himedia).....20 g
- Água destilada.....1000 ml

O ágar foi adicionado a aproximadamente 800 ml de água destilada e a mistura aquecida até completa dissolução. A seguir, foram adicionados os demais componentes, previamente dissolvidos na água restante. Após homogeneização, volumes de 20 ml foram distribuídos em tubos, e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Meio Yeast Nitrogen Base

- Sulfato de amônia (Dinâmica).....5 g
- Fosfato monobásico de potássio (Synth).....1 g
- Sulfato de magnésio heptahidratado (CRQ).....0,5 g
- Ágar (Himedia).....20 g
- Água destilada.....1000 ml

O ágar foi adicionado a aproximadamente 800 ml de água destilada e a mistura aquecida até completa dissolução. A seguir, foram adicionados os demais componentes, previamente dissolvidos na água restante. Após homogeneização, volumes de 20 ml e de 10 ml foram distribuídos em tubos, e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

10.1.3 Meio para o teste de suscetibilidade**RPMI-MOPS**

- Glicose (Difco).....18 g
- RPMI (Gibco).....1 envelope
- MOPS (Sigma).....34,53 g
- Água destilada.....1000 ml

Dissolver as substâncias em 1000 ml de água destilada. Ajustar o pH com solução NaOH até atingir o equivalente a 7. Filtrar o meio preparado, em bomba a vácuo. Armazenar em frasco com tampa de rosca, em geladeira.

10.1.4 Soluções utilizadas para extração do DNA genômico**- Soluções estoque****EDTA (0,5 M pH 8,0)**

- EDTA 0,5 M pH8,0.....186,12 g
- Água destilada1000 ml

NaCl (5 M)

- NaCl (Vetec).....292,25 g
- Água destilada1000 ml

NaCl (3 M)

- NaCl (Vetec).....175,35 g
- Água destilada1000 ml

Tris HCl (1 M pH 7,5)

- Trizma base (Promega).....121,14 g
- Água destilada1000 ml

Tris HCl (0,5 M pH 8,2)

- Trizma base (Promega).....60,57 g
- Água destilada1000 ml

- Soluções de uso**Etanol 70%**

- Etanol absoluto (Merck).....70 ml
- Água destilada30 ml

Tampão Tris-EDTA (TE)

- Tris 1 M pH 7,5.....10 µl
- EDTA 0,5 M.....2 µl
- Água destilada q.s.p1000 ml

Tampão Tris-EDTA (TE) com RNase A

- Tris-HCl 0,5 M pH 8,2.....100 μ l
- EDTA 0,5 M pH8,0.....10 μ l
- RNase (Fermentas; 10mg/ml).....25 μ l
- Água destilada q.s.p5000 ml

Tampão de lise TENTS

- Tris-HCl 1,0 M pH 7,5.....60,57 g
- Tris-HCl 0,5 M pH 8,2.....60,57 g
- EDTA 0,5 M pH8,0.....186,12 g
- NaCl 5 M.....292,25 g
- NaCl 3 M.....175,35 g
- 2% Triton X-100.....20 ml
- SDS 1%.....50 ml
- Água destilada q.s.p1000 ml

10.1.5 Soluções utilizadas para digestão enzimática (RFLP)

- Soluções estoque

Primers liofilizados devem ser hidratados com água E-Pure, para um estoque com 100 μ mol de concentração. A concentração do *primer* será de 20 μ mol/ μ l.

Primers diluídos:

Concentração fornecida pelo fabricante:

CD1: 5'-GTC AAA CTT GGT CAT TTA-3' 62,7 nmol (62,7 μ l
água - 100 μ mol)

CD2: 5'-TTC TTT TCC TCC GCT TAT TGA-3' 56,9 nmol (56,9 μ l
água - 100 μ mol)

Solução de dNTP Mix

- dATP 100 mM (Invitrogen).....10 µl
- dCTP 100 mM (Invitrogen).....10 µl
- dGTP 100 mM (Invitrogen).....10 µl
- dTTP 100 mM (Invitrogen).....10 µl
- Água E-Pure60 µl

Os nucleotídeos são pipetados na ordem descrita, homogeneizados gentilmente e a solução mantida a -20°C.

Tampão TBE – Tris/Borato/EDTA – Solução estoque (10 vezes concentrado)

- Trizma base 0,89 M (Promega).....108 g
- EDTA 0,5 M pH8,0.....40 ml
- Ácido bórico (Amresco).....55 g
- Água destilada q.s.p1000 ml

Foram dissolvidos o trizma base e o ácido bórico em água destilada e adicionado o EDTA. Foi estocado à temperatura ambiente.

- Soluções de uso**Gel de Agarose para PCR-RFLP (2,0%)**

- Agarose (Ultra Pure Agarose-Invitrogen).....2 g
- TBE 1X.....100 ml

Solução de Brometo de Etídio para corar o gel (10 mg/ml)

- Brometo de etídio.....0,8 µl
- TBE 1X100 ml

Tampão TBE – Tris/Borato/EDTA – Solução diluída para uso 1X

- TBE 10X.....100 ml
- Água destilada q.s.p1000 ml

10.1.6 Soluções utilizadas para polimorfismo do DNA aleatoriamente amplificado.

- Soluções estoque

Primers liofilizados devem ser hidratados com água E-Pure, para um estoque com 100 μ mol de concentração.

<i>Primers</i> diluídos:	Concentração fornecida pelo fabricante:
B14: 5'- GAT CAA GTC C - 3'	58.7 nmol (587 μ l água – 100 μ mol)
CDU: 5'- GCG ATC CCC A - 3'	20.1 nmol (201 μ l água – 100 μ mol)
M2: 5'- CTT GAT TGC C - 3'	43.3 nmol (433 μ l água – 100 μ mol)
OPE-18: 5'- GGA CTG CAG A - 3'	48.5 nmol (485 μ l água – 100 μ mol)
<i>Primer</i> 6: 5'- CCC GTC AGC A - 3'	43.7 nmol (437 μ l água – 100 μ mol)

Solução de dNTP Mix

- dATP 100 mM (Invitrogen).....1,25 μ l
- dCTP 100 mM (Invitrogen).....1,25 μ l
- dGTP 100 mM (Invitrogen).....1,25 μ l
- dTTP 100 mM (Invitrogen).....1,25 μ l
- Água E-Pure.....95 μ l

Os nucleotídeos são pipetados na ordem descrita, homogeneizados gentilmente e a solução mantida a -20°C.

Tampão TBE – Tris/Borato/EDTA – Solução estoque (10 vezes concentrado)

- Trizma base 0,89 M (Promega).....108 g
- EDTA 0,5 M pH8,0.....40 ml
- Ácido bórico (Amresco).....55 g
- Água destilada q.s.p1000 ml

Foram dissolvidos o trizma base e o ácido bórico em água destilada e adicionado o EDTA. Foi estocado à temperatura ambiente.

- Soluções de uso**Gel de Agarose para RAPD (1,5%)**

- Agarose (Ultra Pure Agarose-Invitrogen).....1,5 g
- TBE 1X.....100 ml

Solução de Brometo de Etídio para corar o gel (10 mg/ml)

- Brometo de etídio.....0,8 µl
- TBE 1X100 ml

Tampão TBE – Tris/Borato/EDTA – Solução diluída para uso 1X

- TBE 10X.....100 ml
- Água destilada q.s.p1000 ml

10.1.7 Soluções e meios utilizados para cariotipagem eletroforética**- Soluções de estoque****5x CHEF TE, Tampão**

- Trizma base (Promega).....121,15 g
- EDTA (Promega).....372,25 g
- Água destilada q.s.p2000 ml

Dissolver as substâncias (em agitador magnético) em 1000 ml de água destilada, acrescentando NaOH em pastilhas até que o EDTA esteja dissolvido. Ajustar o pH até 7,5 com HCl ou NaOH. Completar o volume para 2000 ml. Aliquotar em frascos de 100 e 2000 ml e autoclavar a solução a 121°C durante 15 minutos.

EDTA 50mM, pH8,0

- EDTA (Promega).....18,61 g
- Água destilada q.s.p1000 ml

Dissolver o EDTA (em agitador magnético) em 700 ml de água destilada, acrescentando NaOH em pastilhas até que o EDTA esteja dissolvido. Ajustar o pH até 8,0 com HCl ou NaOH. Completar o volume para 1000 ml e autoclavar a solução a 121°C durante 15 minutos.

EDTA 0,5 mM, pH8,0

- EDTA (Promega).....186,1 g
- Água destilada q.s.p1000 ml

Dissolver o EDTA (em agitador magnético) em 700 ml de água destilada, acrescentando NaOH em pastilhas até que o EDTA esteja dissolvido. Ajustar o pH até 8,0 com HCl ou NaOH. Completar o volume para 1000 ml e autoclavar a solução a 121°C durante 15 minutos.

Fosfato de sódio monobásico, 0,1 M, pH 7,0

- NaH₂PO₄ (Fisher Scientific).....0,7 g
- Água destilada.....50 ml

Adicionar NaH₂PO₄ a 30 ml de água destilada, ajustar o pH para 7,0 com NaOH ou HCl. Completar o volume a 50 ml e autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

Fosfato de sódio monobásico, 0,1 M, pH 8,0

- NaH₂PO₄ (Fisher Scientific).....0,7 g
- Água destilada.....50 ml

Adicionar NaH_2PO_4 a 30 ml de água destilada, ajustar o pH para 8,0 com NaOH ou HCl. Completar o volume a 50 ml e autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

Glicerol

Aliquotar 100ml e autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

Solução de Lauroylsarcosine a 10%

- N-Lauroylsarcosine (Sigma).....10 g
- Água destilada q.s.p100 ml

O N-Lauroylsarcosine é dissolvido em água destilada, esterilizado por filtração e estocado à temperatura ambiente.

Tampão TBE– Tris/Borato/EDTA – Solução estoque (5 vezes concentrado)

- Trizma base (Promega).....54 g
- Ácido bórico (Amresco).....27,5 g
- EDTA 0,5 M pH8,0 (Promega).....10 ml
- Água destilada q.s.p1000 ml

Foram dissolvidos o trizma base e o ácido bórico em água destilada e adicionado o EDTA. Foi estocado à temperatura ambiente.

TRIS, 1 M pH 7,5

- Trizma base (Promega).....121,14 g
- Água destilada.....1000 ml

O trizma base é adicionado à 300 ml de água destilada e o pH é ajustado para 7,5 com NaOH ou HCl. O volume é completado para 500 ml e a solução é autoclavada a 121°C durante 15 minutos.

Caldo YPD (Yeast Peptone Dextrose)

- Extrato de leveduras (Difco).....10 g
- Dextrose (Difco).....20 g
- Peptona (Difco).....20 g
- Água destilada q.s.p500 ml

Todos os componentes foram dissolvidos em água destilada, esterilizados por filtração e distribuídos em tubos falcon de 50 ml, contendo 10 ml de caldo YPD cada.

- Soluções de uso

Agarose Low-Melt (Gel de agarose de baixo ponto de fusão para blocos)

- Agarose Low-Melt (Bio-Rad).....1 g
- EDTA 0,5 M pH7,5.....25 ml
- Água destilada.....75 ml

Diluir a agarose em EDTA e água destilada no microondas. Aliquotar em tubos de 10 ml cada e manter a 5°C ou temperatura ambiente.

CHEF TE 1X, Tampão

- CHEF TE 5X.....100 ml
- Água destilada q.s.p400 ml

Gel de agarose para PFGE (1,0%)

- Agarose ultra-pure (Bio-Rad).....1,2 g
- TBE 5X.....11,6 ml
- Água destilada.....100 ml

Dissolver no microondas e estabilizar a 58°C no banho-maria.

L-buffer ou Solução Tampão para lyticase

- Glicerol.....15 ml
- NaH₂PO₄ 0,1 M pH7,0.....1,5 ml
- NaH₂PO₄ 0,1 M pH8,0.....10 ml
- Água destilada.....12 ml

As substâncias, previamente autoclavadas, são homogeneizadas e estocadas à temperatura ambiente.

Lyticase, Solução

- Lyticase 2500 UI (Sigma).....1 frasco
- Água destilada.....2 ml

Diluir a lyticase com L-buffer (100U/80µl) e estocar em alíquotas de 1 ml a 20°C. Obs: A lyticase liofilizada deve ser mantida a 4°C.

NET (Solução Tampão para Proteinase K)

- Trizma base 1 M pH 7,5.....1 ml
- EDTA 0,5 M pH 8,0.....90 ml
- N-Lauroylsarcosine 10%.....10 ml

Misturar os componentes, previamente esterilizados, homogeneizar e estocar a temperatura ambiente.

Proteinase K, Solução Estoque

- Proteinase K (Promega).....100 mg
- Água destilada.....5 ml

Diluir a proteinase K com água destilada (20 mg/ml) e estocar em alíquotas de 0,5 ml, a -20°C. Obs: A proteinase K liofilizada deve ser mantida a 4°C.

Solução de Brometo de Etídio para corar o gel (1,0 mg/ml)

- Brometo de etídio (Invitrogen).....20 µl
- Água destilada.....200 ml

Tampão TBE – Tris/Borato/EDTA – Solução diluída para uso 0,5X

- TBE 5X.....100 ml
- Água destilada.....900 ml