

**INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE/FIOCRUZ  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE,  
SOCIEDADE E ENDEMIAS NA AMAZÔNIA**

**Estudo da incidência de candidemia e diversidade genética de  
*Candida* em pessoas internadas em Unidades Hospitalares de  
Manaus - Amazonas**

Marcelo Augusto da Eira Corrêa

Manaus  
2014

**INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE/FIOCRUZ  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE,  
SOCIEDADE E ENDEMIAS NA AMAZÔNIA**

Marcelo Augusto da Eira Corrêa

**Estudo da incidência de candidemia e diversidade genética de  
*Candida* em pessoas internadas em Unidades Hospitalares de  
Manaus - Amazonas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia como parte das exigências do Programa para a obtenção do título de Mestre em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia.

Linha de pesquisa: Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários

**Orientadora: Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura**

Manaus  
2014

### **Dedicatória**

**Dedico este trabalho às pessoas que são responsáveis pela minha existência: meus pais, Serafim e Lydia, minha irmã Dani, meu anjo Rafa, minha esposa Nely, meu filho Lucas e ao meu tio Prof. Dr. Augusto Ferreira da Eira que não pôde estar comigo na concretização deste sonho.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me mostrado os caminhos pelos quais eu deveria trilhar para alcançar os meus objetivos de vida.

À Fiocruz ó Amazônia e à todos que compõem o Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), por não terem medido esforços e terem me dado o apoio necessário para chegar até aqui.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia.

A Minha família, sempre solidária e companheira que me apoiou e me entendeu ao longo desses anos, me dando força e o ombro amigo necessários nestas horas de tensão.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Ani Beatriz Jackisch Matsuura, pela compreensão, disposição, confiança e orientação.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Karen Regina Carim da Costa pela orientação do estágio docência.

Ao Dr. Felipe Gomes Naveca pela orientação que dispensou para o cumprimento da etapa de análise das sequências e do MLST.

A minha colega Farmacêutica Msc. Mary Joyce por ter me incentivado e apoiado desde o primeiro momento que pensei em realizar este sonho.

A minha chefe Farm. Louzamira Feitoza que me incentivou desde o primeiro momento.

À equipe do Hospital Universitário Getúlio Vargas que sempre me apoiou no início do curso, quando tive que conciliar o trabalho com os estudos. Obrigado de coração as farmacêuticas Vivi, Lulu, Vivian e a bolsista Pri.

As minhas colegas do laboratório de micologia pelo apoio e incentivo que sempre me deram. Obrigado Marla, Vivian, Gleica, Stefane, Rosi e Jusse.

As minhas colegas de turma que dividiram comigo momentos de alegria e apreensão, em especial à Leka, Val e Emanuelle que dividiram as fases mais angustiantes vividas na bancada do laboratório nos últimos meses.

Aos amigos Msc. Victor e Msc. George pela ajuda e força que me deram na etapa de sequenciamento.

Aos funcionários e técnicos da Fiocruz Amazônia, em especial aos do laboratório.

Aos meus amigos que me ajudaram na coleta do TCLEs. Obrigado Themis, Neco, Viviane e Zungo.

Aos pacientes e suas famílias que contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao laboratório Reunidos em especial ao Dr. Loureiro e aos farmacêuticos Cleber e Rildo que nos ajudaram na coleta dos nossos isolados.

Ao Secretário estadual de saúde, Dr. Wilson Alecrim que autorizou que este trabalho fosse realizado nas unidades hospitalares da SUSAM e a todos os diretores, presidentes de CCIHs, e responsáveis pelo SAME que nos forneceram os valiosos dados utilizados nesse estudo.

Ao Dr. Marcus Barros e a Dr<sup>a</sup>. Solange Dourado responsáveis pela CCIH de um dos hospitais estudados no presente trabalho.

E finalmente a todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste sonho.

## RESUMO

Candidemia é a infecção de corrente sanguínea causada por leveduras do gênero *Candida*. Sua incidência varia entre 1,27 e 3,9 casos por 1000 internações no Brasil e 0,29 a 1,95 casos por 1000 internações no mundo. *C. albicans* é o principal agente etiológico com uma incidência que varia entre 25,9% a 59%. Este trabalho teve como objetivo verificar a incidência de candidemia em 11 Unidades Hospitalares de Manaus (públicas e privadas), bem como determinar a diversidade genética entre os isolados de *Candida albicans* e identificar a existência de espécies crípticas do complexo *Candida parapsilosis*. Os isolados de *Candida albicans* foram submetidos à técnica de tipagem molecular por sequenciamento de multilocus (MLST) e os identificados como *C. parapsilosis*, foram submetidos à PCR/RFLP. Ao todo foram estudados 101 isolados do gênero *Candida*. A incidência geral encontrada foi de 2,31 casos por 1000 internações e 0,61 casos por 1000 pacientes/dia. O gênero *Candida* foi o segundo causador das infecções de corrente sanguínea nas unidades hospitalares estudadas, representando 8,6% de todos os casos. A espécie mais prevalente foi *Candida albicans* representando 35,64% dos casos seguida por *Candida tropicalis* com 30,69%. O gênero masculino (68,24%) foi mais acometido por essas infecções do que o gênero feminino (31,76%). A taxa de mortalidade geral foi de 37,21% e a espécie que apresentou maiores taxas de mortalidade foi *Candida tropicalis* com 53,85%. Foram identificados 59 alelos diferentes pela técnica de MLST sendo que um alelo para o gene SYA1 foi configurado como novo alelo. Suas combinações representaram 25 genótipos diferentes, sendo que 15 foram identificados como novos genótipos. Dos 22 isolados inicialmente descritos como *C. parapsilosis*, três foram reidentificados como *C. orthopsilosis* e uma como *C. metapsilosis*. Dos 25 genótipos encontrados para *C. albicans* o principal foi o DST 90 e esse dado diverge dos dados encontrados no Brasil e no mundo, que apontam o DST 69 como o mais comum. Foram identificadas pela primeira vez em nossa região, infecções de corrente sanguíneas por espécies crípticas do complexo *C. parapsilosis*, com três casos de *C. orthopsilosis* e um caso de *C. metapsilosis*.

Palavras Chaves: Candidemia, *Candida albicans*, espécies crípticas e MLST

## ABSTRACT

Candidemia is a bloodstream infection caused by *Candida*. Its incidence varies between 1.27 and 3.9 cases per 1000 admissions in Brazil and from 0.29 to 1.95 cases per 1,000 admissions in the world. *C. albicans* is the main agent with an incidence ranging from 25.9 % to 59 %. This study aimed to determine the incidence of candidemia in 11 Hospital Units Manaus (public and private) and to determine the genetic diversity among isolates of *Candida albicans* and identify the existence of cryptic species *Candida parapsilosis* complex. The *C. albicans* isolates were subjected to molecular typing technique for multilocus sequencing (MLST) and identified as *C. parapsilosis*, were subjected to PCR/RFLP. Altogether 101 isolates were studied of the genus *Candida*. The overall incidence was found to be 2.31 cases per 1,000 admissions and 0.61 cases per 1000 patients/day. The genus *Candida* was the second cause of bloodstream infections in the studied hospitals, representing 8.6 % of all cases. The most prevalent species was *Candida albicans* representing 35.64 % of the cases followed by *Candida tropicalis* with 30.69 %. The male (68,24 %) was most affected by these infections than females (31,76 %). The overall mortality rate was 37.21 % and the species with the highest mortality rates *Candida tropicalis* was 53.85%. 58 different alleles were identified by the technique of MLST and one allele for the gene SYA1 has been set as a new allele. Their combinations represented 25 different genotypes, of which 15 were identified as new genotypes and sent to the curator for analysis. Of the 22 isolates originally described as *C. parapsilosis*, three were reidentified as *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*. Of the 25 genotypes found for *C. albicans* was the main STD 90 and this data differ from the data found in Brazil and in the world , pointing DST 69 as the most common . Were identified for the first time in our region , blood stream infections by *C. parapsilosis* cryptic species complex with three cases of *C. orthopsilosis* and one case of *C. metapsilosis*.

Key Words : Candidemia , *Candida albicans* , cryptic species and MLST

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01:** Site do MLST demonstrando a sequência inserida na base de dados e posterior identificação do alelo 102 para o gene AAT1a da amostra CMS 01 39
- Figura 02:** Site do MLST, mostrando a sequência de passos para a identificação do DST para *C. albicans*. Após a introdução de cada um dos alelos o programa informa o DST 435 como sendo o específico para esta sequência de dados 39
- Figura 03:** Apresentação de culturas de *Candida albicans* (1), *Candida guilliermondii* (2), *Candida parapsilosis* (3), *Candida glabrata* (4), *Candida pelliculosa* (5), *Candida tropicalis* (6), *Candida famata* (7), *Candida haemulonii* (8), *Candida* sp. (9)\* 42
- Figura 04:** *Kodamaea ohmeri* em Ágar Sabouraud 43
- Figura 05:** Gel de eletroforese da digestão enzimática pós amplificação do gene SADH com a enzima de restrição *Ban1*. Isolado 39 de *C. orthopsilosis* (1), Isolado 11 de *C. parapsilosis* (2), Isolado 77 de *C. metapsilosis* (3), cepa ATCC 40304 de *C. orthopsilosis* (4), cepa ATCC 40038 de *C. parapsilosis*, (5), cepa ATCC 40305 de *C. metapsilosis*, (6), pb (Marcador) 47
- Figura 06:** Gel de eletroforese de um isolado de *C. albicans* amplificados para os setes genes estudados pela técnica MLST. Marcador (pb); gene AAT1a (1), gene ACC1 (2), gene ADP1 (3), gene MP1B (4), gene SYA1 (5), gene VPS13 (6) e gene ZWF1b (7) 48
- Figura 07:** Cromatograma analisado no Programa *Geneious* v6.0.6 mostrando a heterozigose na posição 314 do Gene SYA1 para *C. albicans*, configurando um novo alelo encontrado neste trabalho 50
- Figura 08:** Cromatograma analisado pelo Programa *Geneious* v6.0.6 para o gene ZWF1b, demonstrando as heterozigose A+C=M e C+T=Y para a amostra 03 53
- Figura 09:** Diagrama gerado pelo eBurst com as ligações dos DSTs e seus respectivos grupamentos. Os DSTs com pelo menos seis alelos idênticos estão conectados entre si 55



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 01:** Lista de fragmentos de genes que foram amplificados no ensaio do MLST para *C. albicans* com as sequências dos respectivos *primers* 37
- Tabela 02:** Distribuição das espécies do gênero *Candida* isoladas das hemoculturas dos pacientes internados em 11 unidades hospitalares do município de Manaus ó AM no ano de 2013 41
- Tabela 03:** Número de culturas positivas, número de isolados e % de culturas positivas para *Candida*, número de pacientes acometidos com candidemia, número de casos e número de isolados analisados em cada uma das 11 unidade hospitalares estudadas na cidade de Manaus-AM, no ano de 2013 45
- Tabela 04:** Distribuição da faixa etária dos pacientes 45
- Tabela 05:** Incidência geral e por hospital calculada para 1000 pacientes dia e 1000 internações 46
- Tabela 06:** Distribuição das candidemias causadas pelas espécies crípticas do complexo *õpsilosisö* 48
- Tabela 07 -** Genes sequenciados, alelos encontrados, alelos mais comuns para cada um dos genes, quantidade de alelos diferentes encontradas e os respectivos tamanhos dos fragmentos e amplicons dos isolados de *C. albicans* analisados 49
- Tabela 08**ó Tabela geral dos 35 isolados de *C. albicans* estudados pela técnica de MLST, por Unidade Hospitalar, com a identificação de cada um dos genes para cada um dos isolados e respectivos DSTs 51
- Tabela 09:** Número de isolados e DSTs únicos para cada uma das unidades entre os isolados de *C. albicans* estudadas através da técnica de MLST 52
- Tabela 10:** Grupamento dos DSTs identificados e frequência dos isolados após análise do programa eBurst 54

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAT1a ó Gene relacionado à aspartato aminotransferase  
ACC1 ó Gene relacionado à acetil coenzima A carboxilase  
ADP1 ó Gene relacionado à permease ATP-dependente  
ANVISA ó Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
*Ban1* - Enzima de restrição de *Bacillus aneurinolyticus*  
CAAE ó Certificado de Apresentação para Apreciação Ética  
CCIH ó Comissão de Controle de Infecção Hospitalar  
COX3 ó Citocromo oxidase sub unidade III  
DNA ó Ácido desoxirribonucleico  
DST ó Diploid Sequence Type  
EDTA ó Ácido etilenodiamino tetra- acético  
et al. ó e colaboradores  
FUR1 ó Gene relacionado à uracil phosphoribosyltransferase  
ICS ó Infecção de Corrente Sanguínea  
ILMD ó Instituto Leônidas e Maria Deane  
INCQS ó Instituto Nacional de Controle de Qualidade de Saúde  
LIA1 ó Gene relacionado à lanosterol-alpha-demethylase  
mL ó Mililitro  
MLST ó Multilocus Sequence Typing  
mM ó MiliMol  
MPIb ó Gene relacionado à monose fosfato isomerase  
pb ó Pares de Base  
PCR ó Reação em cadeia da polimerase  
RAPD ó Random Amplification of Polymorphic DNA  
RFLP ó Restriction Fragment Length Polymorphism  
RPM ó Rotação por minuto  
SADH ó Gene relacionado à secondary alcohol dehydrogenase-encoding  
SAME ó Serviço de Arquivo Médico e Estatística  
ST ó Sequence Type  
SYA1 ó Gene relacionado à alanil RNA sintetase  
TBE ó Tampão Tris- borato-EDTA  
TCLE ó Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
VPS13 ó Gene relacionado a proteína vacuolar  
YPD ó Yeast Peptone Dextrose  
ZWF1 ó Glicose-6-fosfato desidrogenase  
 $\mu$ L ó Microlitros

## LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}\text{C}$  ó Graus *Celsius*  
 $\%$  ó Por cento  
 $\leq$  ó Menor ou igual  
 $=$  ó Igual  
 $\sim$  ó aproximadamente

## SUMÁRIO

<b>1.0. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2.0. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....</b>	<b>17</b>
2.1. O gênero <i>Candida</i> .....	17
2.2. Espécies crípticas do Complexo <i>Candida parapsilosis</i> .....	18
2.3. Candidemia.....	19
2.3.1. Candidemia no mundo.....	20
2.3.2. Candidemia no Brasil.....	25
2.4. O uso de Multilocus Sequence Typing (MLST) para tipagem de <i>Candida albicans</i> .....	27
<b>3.0. OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>32</b>
3.1. Objetivos específicos.....	32
<b>4.0. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
4.1. Modelo.....	33
4.2. Universo .....	33
4.3. Procedimento.....	35
<b>5.0. RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
5.1. Incidência das espécies, distribuição dos casos por unidade e perfil das candidemias.....	42
5.2. Espécies crípticas $\delta$ Psilosisö .....	48
5.3. Análise da tipagem molecular por MLST.....	49
<b>6.0. DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
6.1. Incidência de fungemias causadas por <i>Candida</i> .....	57
6.2. Espécies crípticas do complexo $\delta$ psilosisö .....	61
6.3. Diversidade genética de <i>Candida albicans</i> pela técnica de MLST.....	62
<b>7.0. CONCLUSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>8.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>67</b>
<b>9.0. ANEXOS .....</b>	<b>73</b>
9.1. Anexo 01.....	73
9.2. Anexo 02.....	74
9.3. Anexo 03.....	75

9.4. Anexo 04.....	80
9.5. Anexo 05.....	81
9.6. Anexo 06.....	82
9.7. Anexo 07.....	83
9.8. Anexo 08.....	85

## 1. INTRODUÇÃO

A incidência da Candidemia tem aumentado consideravelmente nos últimos anos variando a taxa no Brasil entre 1,27 e 3,9 casos/1000 admissões, enquanto que em outros países a taxa é de 0,29 a 1,95 casos/1000 admissões (Richet et al. 2002; Colombo et al. 2006; França et al. 2008; Hinrichsen et al. 2008; Motta et al. 2010; Pemán et al. 2012; Bassetti et al. 2013; Kreusch et al. 2013; Nucci et al. 2013). As altas taxas de infecções relatadas apontam como a quarta maior causa de septicemias no Brasil e na Alemanha (Colombo et al. 2006; Meyer et al. 2013) e a sétima na Suíça (Marchetti et al. 2004). Nos Estados Unidos o aumento dos casos de candidemia chegou a ser de 207% em cerca de 20 anos (Martin et al. 2003).

Vários são os fatores de risco associados, porém podemos citar como principais, as doenças de base, terapia com antimicrobianos, presença de cateter venoso central, utilização prévia de antifúngicos, ventilação mecânica, uso de nutrição parenteral e prematuridade (Viudes et al. 2002; ANVISA, 2004; Xavier et al. 2008; Mondelli et al. 2012).

A resistência das diversas espécies de *Candida* aos antifúngicos existentes no mercado também é uma preocupação crescente em todo mundo. Embora na maioria dos estudos sejam encontradas boas sensibilidades à Anfotericina B, as sensibilidades à Itraconazol e ao Fluconazol, são apenas intermediárias (Ajenjo et al. 2011; Pemán et al. 2012).

No Brasil a incidência de *C. albicans* varia de 25,9% a 59%, sendo o principal agente etiológico das fungemias. No entanto, infecções por espécies *Candida* não-*albicans* estão ganhando enorme importância nas últimas décadas. Em estudos realizados no nordeste e sudeste do país a espécie *C. parapsilosis* foi a principal causadora de Candidemia seguida de *C. tropicalis*, entre as espécies de *Candida* não-*albicans* (Richet et al. 2002; Viudes et al. 2002; Tortorano et al. 2004; Rodero et al. 2005; Aquino et al. 2005; Colombo et al. 2006; Chang et al. 2008; Xavier et al. 2008; França et al. 2008; Hinrichsen et al. 2008; Parahyn et al. 2009; Cajoto et al. 2010; Motta et al. 2010; Ajenjo et al. 2011; Mondelli et al. 2012; Pemán et

al. 2012; Moretti et al. 2013;; Bassetti et al. 2013; Blanco-Blanco et al. 2013;; Asmundsdottir et al. 2013; Kreusch et al. 2013; Moretti et al. 2013).

Para compreender o prognóstico, a epidemiologia e a terapêutica do gênero *Candida* é essencial identificar corretamente as espécies etiológicas e conhecer as similaridades e diferenças entre cada espécie.

A espécie *C. parapsilosis* tem se mostrado genotipicamente mais heterogênea do que outras espécies de *Candida* quando feitos estudos com PCR/RFLP (Page, 1996). Outras técnicas como RAPD, MLST, etc., indicaram se tratar de três grupos distintos. Esses subgrupos tiveram diferenças genotípicas suficientes para serem designados como novas espécies. Assim foram separadas em, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Dessas espécies, *Candida parapsilosis* é a mais frequente, representando cerca de 90% das infecções atribuídas às espécies do grupo *õpsilosisö* (Tavanti et al. 2005; Lockhart et al. 2008).

Estudos para determinar a diversidade genética de *Candida albicans* também têm sido feitos. No Brasil, Da Matta et al. (2010) estudaram 74 isolados de *C. albicans* de 9 estados, porém nenhum da região Norte, usando a técnica de MLST. Dessa forma foi verificado que a maioria dos isolados (56%) eram pertencentes a um único clado.

Na cidade de Manaus, num levantamento de dados junto ao laboratório terceirizado responsável pela realização das hemoculturas em sete hospitais públicos e um particular foram identificadas 1390 hemoculturas positivas, no período de janeiro a dezembro de 2012, das quais 133 (9,56%) foram positivas para *Candida*. Destas, *Candida albicans* representou 35% dos casos seguida por *C. parapsilosis* com 27% e *C. tropicalis* 26% (Dados obtidos do Laboratório Reunidos). Além disso, sabe-se que as taxas de mortalidade em episódios de candidemia são altas, podendo variar entre 21,9 a 76% (Viudes et al. 2002; Rodero et al.

2005; Aquino et al. 2005; Colombo et al. 2006; Chang et al. 2008; Xavier et al. 2008; França et al. 2008; Hinrichsen et al. 2008; Hinrichsen et al. 2009; Mondelli et al. 2012; Meyer et al. 2013).

Este é o primeiro estudo sobre candidemias e sua diversidade genética realizada na cidade de Manaus ó Amazonas, que concentra a totalidade de unidades de alta complexidade em nosso estado, o que contribuirá com informações para as Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIHS) para que se possa estabelecer novos caminhos com vistas à prevenção deste grave problema de saúde pública.



## 2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

### 2.1. O Gênero *Candida*

O primeiro relato de *Candida* no ser humano foi feito em 1839 após Langenbeck ter isolado da cavidade oral de um paciente com afta bucal aquela que posteriormente se tornaria a mais importante levedura de interesse médico, a *Candida albicans*. Mas, somente em 1923 essa espécie foi classificada por Berkhout (Barnett et al. 2000; Sidrim& Rocha, 2004).

O gênero *Candida*, compreende mais de 150 espécies, as quais apresentam células em brotamento e não tem reprodução sexual, podem formar pseudo-hifas e/ou hifas verdadeiras e a coloração de suas colônias pode variar de branca à creme ligeiramente acinzentadas. Sua textura é cremosa ou membranosa com superfície rugosa, lisa ou sulcada, brilhante ou opaca. Geralmente são circulares e as bordas podem ser regulares ou irregulares. Podem ser encontrados na maioria dos ecossistemas, estando presentes no solo, água e alimentos e colonizando homens e animais. Possui importante capacidade adaptativa e podem se desenvolver tanto em aerobiose, quanto em anaerobiose. *Candida albicans* é considerada a mais importante levedura patogênica oportunista, no entanto, nas últimas décadas as espécies *Candida* não-*albicans* têm se tornado de fundamental importância pelas altas taxas de infecções apresentadas, em especial *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Candida glabrata* (Barnett et al. 2000; Lacaz et al. 2002; Giolo et al. 2010).

As espécies patogênicas do gênero *Candida* possuem diversos fatores de virulência que podem aumentar a gravidade de uma infecção. Entre eles, estão a produção de proteinases, fosfolipases, adesinas, produção de d-arabinitol, formação de biofilme e formação de hifas (Calderone & Fonzi, 2001; Lacaz et al. 2002; Ibrahim et al. 2007).

*Candida albicans* distingue-se das outras espécies por sua capacidade de produção de clamidoconídios, isso pode ser observado quando é semeada em ágar fubá com adição de tween-80, que reduz a tensão superficial do meio. No entanto, *C. dubliniensis*, descrita como

nova espécie em 1995, também forma essas estruturas nas mesmas condições (Sullivan et al. 1995; Lacaz et al. 2002).

Na análise microscópica, *C. albicans* apresenta blastoconídios globosos ou ovais, com e sem brotamento, hifas e pseudohifas, com constrições junto aos septos, hialinos. No cultivo em lâmina, apresenta clamidoconídios ao longo ou nas extremidades das hifas e pseudohifas. Em temperatura ambiente, as colônias crescem em 24 a 72 horas e em meio Sabouraud apresentam-se com textura glabrosa e com relevo convexo (Sidrim e Moreira, 1999). A produção de tubos germinativos, ao lado de clamidoconídios, servem para caracterizar *C. albicans* (Lacaz, 2009). Além dessas técnicas há as que se baseiam na fermentação e assimilação de fontes de carbono e nitrogênio. Para facilitar esse processo existem os Kits comerciais para identificação manual ou automática como API 20C AUX e ID32C (BIOMÉRIEUX, França, Paris) ou o sistema automatizado VITEK® (BIOMÉRIEUX, França, Paris) capazes de identificar uma enorme variedade de microrganismos. No entanto, as técnicas de biologia molecular estão sendo usadas cada vez mais na rotina de identificação. Áreas preservadas dos microrganismos, como ITS1 e ITS2 são amplificadas por técnicas de PCR e posteriormente as sequências analisadas através da ferramenta BLAST, que pode ser encontrada no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Isso tem contribuído para a melhora do diagnóstico das infecções fúngicas em especial àquelas oportunistas (ARJUNA et al. 2005; LEAN et al. 2006).

## **2.2. Espécies crípticas do Complexo *Candida parapsilosis***

A aplicação das técnicas moleculares tem levado a descoberta contínua de novas espécies, como por exemplo, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*, que anteriormente eram descritas como subgrupos II e III de *C. parapsilosis*. Após análise pela técnica de Multilocus Sequence Typing (MLST) foram identificadas diferenças significativas em quatro genes

COX3, L1A1, SADH e SYA1 o que permitiu que os subgrupos ganhassem o status de novas espécies. Foi então proposto, que os subgrupos anteriormente denominados como II e III passassem a ser denominados como *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, respectivamente (Tavanti et al. 2005).

Lockhart et al. (2008) comandaram um estudo da distribuição e suscetibilidade de espécies crípticas de *Candida parapsilosis* entre os anos de 2001 e 2006. Nesse estudo, foram utilizados 1929 isolados de *C. parapsilosis* de 89 centros médicos, de 29 países em seis continentes, provenientes da coleção da Universidade de Iowa e que faziam parte do estudo ARTEMIS Global Surveillance. Através da técnica de PCR/RFLP, foram analisados 1929 isolados descritos anteriormente como *C. parapsilosis*. Após análise por técnicas genotípicas 1762 (91,3%) isolados foram confirmados como *C. parapsilosis*, 117 foram identificadas como *C. orthopsilosis* (6,1%), 34 como *C. metapsilosis* (1,8%) e 16 como *Lodderomyces elongisporus*. Não foi identificada resistência ao fluconazol nos isolados de *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, e todos os isolados testados eram sensíveis à caspofungina, anidulafungina e micafungina. Bonfietti et al. (2012), realizaram um estudo semelhante no Brasil e verificaram que embora *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* não fossem resistentes a fluconazol, os isolados de *C. orthopsilosis* exigiram maior concentração desse antifúngico (2mg/L).

### **2.3. Candidemia**

Entre todas as espécies descritas de fungos, o gênero *Candida* é o mais importante em se tratando das infecções hospitalares e representa um enorme desafio para garantir a sobrevivência dos pacientes. Sistemas de vigilância norte-americanos a notificam como o sexto principal patógeno das infecções nosocomiais, sendo o quarto mais importante agente das infecções de corrente sanguínea (ICS) (ANVISA, 2004).

Candidemia é a infecção de corrente sanguínea causada por leveduras do gênero *Candida*. A principal espécie envolvida é a *C. albicans*, porém nos últimos anos as espécies de *Candida* não-*albicans* ganharam bastante importância (Giolo, 2010; Pemán et al. 2012). Entre as principais espécies de *Candida* não-*albicans*, as mais envolvidas são: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (Viudes et al. 2002; Colombo et al. 2006; Chang et al. 2008). Essas infecções, além de aumentarem as taxas de mortalidade e o tempo de internação, produzem consideráveis aumentos nos custos hospitalares, podendo chegar em cerca de 90.000 dólares em pacientes pediátricos e 40.000 dólares em pacientes adultos (Zaoutis et al. 2005).

Embora a maioria das fungemias sejam causadas por fungos do gênero *Candida*, outros patógenos estão sendo isolados nestas infecções. Rodrigues et al. (2010) isolaram durante um estudo realizado na cidade de Bogotá *Sporobolomyces salmonicolor* como agente causador de um caso de fungemia fatal, o que demonstra que fungos existentes no meio ambiente podem causar casos graves, mesmo em pacientes sem fatores de risco aparente.

Barros et al. (2009) isolaram pela primeira vez *Kodamaea ohmeri* como agente causador de fungemia no Brasil. Na Itália, Santino et al. (2012) isolaram a mesma levedura a partir de culturas sanguíneas de dois pacientes imunocomprometidos. Mas, foi na Índia que foi realizado o maior levantamento sobre fungemias por *K. ohmeri*, onde 38 isolados, que anteriormente haviam sido identificados como *C. tropicalis*, foram identificados como *K. ohmeri* após técnicas de biologia molecular (Chakrabarti et al. 2013).

### **2.3.1. Candidemia no Mundo**

Estudo sobre a epidemiologia das septicemias, realizado nos Estados Unidos da América entre os anos de 1979 e 2000, demonstrou um incremento das sepsis fúngicas em 207% (Martin et al. 2003). Com isso, o diagnóstico das infecções sistêmicas causadas por

fungos ganha cada vez mais importância. Isso ocorre, tanto pelo alto grau de infecções apresentadas, quanto pelos altos índices de resistência e taxas de mortalidade descritas.

Em 2004, Tortorano e colaboradores publicaram um estudo da Confederação Europeia de Micologia Médica sobre candidemia analisando 2089 casos provenientes de 106 instituições de saúde espalhadas por sete países da Europa (Alemanha, Áustria, Espanha, França, Itália, Suécia e Reino Unido). Nele foram constatadas taxas de infecção que variaram entre 0,20 e 0,38 casos/1000 admissões. *C. albicans* foi a mais prevalente (56%), seguida de *C. glabrata* (13,6%), *C. parapsilosis* (13,3%) e *C. tropicalis* (7,2%). A taxa de mortalidade foi de 37,9%.

Na Espanha um estudo realizado no Hospital Universitário La Fe entre os anos de 1995 e 1997 isolou *Candida* em 145 hemoculturas, as quais apresentaram uma taxa de mortalidade global em torno de 44%, e a espécie mais prevalente foi *Candida albicans* (45,9%), seguida de *C. parapsilosis* (33,1%) e *C. krusei* (6,7%) (Viudes et al. 2002). Em Lugo, também na Espanha, Cajoto et al. (2010) identificaram *Candida rugosa* como agente causador de candidemia, o que mostra que novas espécies estão aparecendo como importantes causadoras destas infecções. Em 2012, Pemán e colaboradores, realizaram um estudo mais amplo, desta vez, envolvendo isolados provenientes de 44 hospitais espanhóis onde foram identificados 1357 episódios de fungemia. *C. albicans* (44,66%) foi a mais prevalente, seguida de *C. parapsilosis* (26,58%), no entanto, a terceira principal espécie mais isolada foi *C. glabrata* (11,47%), diferentemente do que foi descrito por Viudes et al. (2002). A taxa de infecção foi de 0,92 casos/1000 admissões tendo sido relatada resistência dos isolados de *C. glabrata* (24,1%) e *C. krusei* (81,5%) ao itraconazol (Pemán et al. 2012). Ainda na Espanha, um estudo multicêntrico avaliou 364 isolados provenientes de 44 hospitais diferentes. Todos foram previamente identificados como *C. parapsilosis*. Para esse estudo foram usadas duas técnicas de biologia molecular para a diferenciação das espécies. Primeiramente os isolados

passaram por amplificação do gene SADH, com posterior digestão enzimática pela enzima de restrição Ban1, e posteriormente foram sequenciadas as regiões ITS1 e ITS4 do gene 28S rRNA. Após análise por técnicas de biologia molecular 90,7% dos casos foram confirmados como *C. parapsilosis* seguida por *C. orthopsilosis* com 8,2% e *C. metapsilosis* com 1,1%. Todos os isolados passaram por testes de sensibilidade e resistência significativa foi encontrada somente nos isolados de *C. parapsilosis* (Cantón et al. 2011).

Em outro estudo realizado em hospitais da Espanha e Itália foram analisados 995 episódios de candidemia distribuídos entre os anos de 2008 e 2010. As taxas de infecção nos três anos analisados se mantiveram estáveis e foram de 1,55 casos por 1000 admissões. Evoluíram para óbito 381 pacientes (39,9%) e as espécies mais isoladas foram *C. albicans* com 58,4%, seguida de *C. parapsilosis* (19,5%), *C. tropicalis* (9,3%) e *C. glabrata* (8,3%) (Bassetti et al. 2013). Blanco-Blanco et al.(2013), realizaram estudo entre os anos de 2007 e 2009 em um hospital universitário da Espanha com 52 casos de candidemia. Foram realizadas análises genotípicas através da amplificação e sequenciamento das regiões ITS1 e ITS4 do gene 28S rRNA, para diferenciação do complexo *õpsilosisö*. *C. albicans* foi a mais prevalente com 30,8% dos casos, seguida de por *C. parapsilosis* (25%) e *C. orthopsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (11,5%). Toro et al. (2010) optaram pela amplificação do gene SADH e digestão enzimática utilizando a enzima de restrição Ban1, para avaliarem 122 isolados de hospitais espanhóis. Desses, 101 isolados (91%) foram confirmados como *C. parapsilosis*, 10 como *C. orthopsilosis* (8.2%) e um (0,8%) como *C. metapsilosis*.

Em Portugal, Silva et al. (2009) realizaram um estudo envolvendo 175 isolados clínicos previamente identificados como *C. parapsilosis* e por meio de técnicas moleculares 160 isolados (91,4%) foram confirmadas como *C. parapsilosis*, 4 isolados (2,3%) foram identificados como *C. orthopsilosis* e 5 isolados (2,9%) como *C. metapsilosis*. Alguns isolados de *C. parapsilosis* apresentaram resistência dose dependente ao fluconazol e à

Anfotericina B e todos os isolados de *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* foram sensíveis a estas drogas.

Na França, em um estudo comandado por Richet et al. (2002) com isolados de 25 hospitais franceses escolhidos aleatoriamente, foram encontradas taxas de infecção bem inferiores as encontradas por Pemán (2012). As taxas relatadas foram de 0,29 casos/1000 admissões e 0,035 casos/1000 pacientes-dia, sendo a espécie *C. albicans* a mais prevalente (53%).

Na Noruega, um estudo realizado entre os anos de 1991 e 2003, em todos os laboratórios de microbiologia do país identificaram *C. albicans* (70%) como a principal levedura causadora de candidemias. O número de casos por 100.000 habitantes variou entre 6,5 e 15,6 (Sandven et al. 2006).

Na Suíça, um estudo realizado em 17 Hospitais Universitários com 1137 episódios de candidemia identificou *C. albicans* como a mais prevalente, no entanto, diferente de outros trabalhos ela foi apenas a sétima causadora de ICS, perfazendo 2,9% de todos os isolados das ICS (Marchetti et al. 2004).

Na Alemanha, um estudo epidemiológico realizado entre os anos de 2006 e 2011 relatou incidência de 0,09 casos/1000 por pacientes dia. Foram estudadas 682 unidades de terapia intensiva e o gênero *Candida* foi identificado como o quarto causador das infecções de corrente sanguínea (6,5%) com taxas de mortalidade de 21,9% para *C. albicans* e 29,7% para as espécies de *Candida* não-*albicans* (Meyer et al. 2013).

Na Islândia, em estudo realizado entre os anos de 2000 e 2011 com 208 casos de candidemia, foram identificadas taxas de 5,7 casos por 100.000 habitantes tendo sido mais prevalente em crianças e idosos. As espécies mais encontradas foram *C. albicans* com 56% seguida de *C. glabrata* com 16% e *C. tropicalis* com 13% (Asmundsdottir et al. 2013).

Na China, um estudo realizado por Ma e colaboradores (2013), analisou 133 casos de candidemia entre os anos de 2009 e 2011 com a incidência variando entre 0,71 a 0,85 casos por 1000 altas hospitalares. Nesse estudo, a espécie mais prevalente foi *C. tropicalis* com 28,6% dos casos, seguida por *C. albicans* (23,3%) e *C. parapsilosis* (19,5%) e a taxa de mortalidade foi de 26% sendo que, pacientes infectados por *C. tropicalis* apresentaram taxas mais elevadas (44,7%).

Em estudo epidemiológico retrospectivo realizado em Soweto, África do Sul, foram identificados 266 casos de candidemia entre os anos de 1990 e 2007. As taxas de infecção variaram entre 2,8 a 3,6 casos por 10.000 admissões hospitalares. As espécies mais prevalentes foram *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* e as taxas brutas de mortalidade foram de 60% (Kreusch et al. 2013).

Na América do Sul também existem vários estudos sobre candidemias. Na Argentina foi realizado um estudo multicêntrico de fungemias entre abril de 1999 e abril de 2000, por Rodero et al. (2005) em 36 instituições. *C. albicans* apareceu como a espécie mais prevalente com (40,75%) dos casos, seguida por *C. parapsilosis* (28,67%) e *C. tropicalis* (15,84%). A mortalidade geral neste estudo foi de 30%. Em 2008, Cheguirian e colaboradores realizaram um levantamento em Córdoba para verificar a prevalência de microrganismos causadores de bacteremia e fungemia em pacientes oncológicos pediátricos. Dos isolados pesquisados 18,6% foram positivos para *Candida*, sendo *C. parapsilosis* a espécie mais encontrada no estudo com 63,6% de incidência. No Chile, um estudo realizado entre outubro de 2001 e agosto de 2003, apontou *C. albicans* como o principal agente etiológico das candidemias (44,4%) e as espécies *Candida* não-*albicans* representaram 55,6%, sendo entre essas espécies, *C. tropicalis* a mais prevalente (27,8%). Os isolados apresentaram alta sensibilidade à Anfotericina B (100%) e moderada sensibilidade ao Fluconazol (88,8%) e Itraconazol



(72,2%), sendo que as espécies de *Candida* não-*albicans* apresentaram os maiores níveis de resistência (Ajenjo et al. 2011).

Em pesquisa comandada por Nucci et al. (2013), sobre candidemia na América Latina, durante 24 meses em 20 centros hospitalares, e envolvendo sete países (Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Equador, Honduras e Venezuela) foram identificados 672 casos de candidemia sendo a mais prevalente *C. albicans* (37,6%), seguida por *C. parapsilosis* (26,5) e *C. tropicalis* (17,6%). A taxa geral de infecção foi de 1,18/1000 admissões e 0,23/1000 pacientes/dia. A Argentina foi o país que apresentou as taxas mais altas (1,95/1000 admissões e 0,24/1000 pacientes dia) e o Chile o que apresentou as menores taxas (0,33/1000 admissões e 0,09/1000 pacientes dia). Nesse estudo, o Brasil apresentou taxas de 1,38/1000 admissões e 0,26/1000 pacientes dia. Esse foi o maior estudo epidemiológico sobre candidemias até o presente momento realizado na América Latina.

### **2.3.2 Candidemia no Brasil**

No Brasil, vários estudos foram realizados nas últimas décadas apontando, na maioria das vezes, a espécie *C. albicans* como a mais prevalente das ICS, com taxas que variaram entre 44% e 52,2% (Aquino et al. 2005; Colombo et al. 2006; Chang et al. 2008; Xavier et al. 2008; França et al. 2008; Motta et al. 2010). Dados divergentes foram encontrados em Recife-PE e Botucatu-SP, onde a principal espécie isolada foi *C. parapsilosis* (Hinrichsen et al. 2008; Mondelli et al. 2008; Parahyn et al. 2009) e em Londrina-PR, onde a espécie mais isolada foi *C. tropicalis* (Furlaneto, 2011). Conhecer a espécie mais prevalente é de enorme importância, pois as taxas de mortalidade dessas infecções são extremamente altas, podendo variar entre 51,9 e 76% dos pacientes infectados (Aquino et al. 2005; Chang et al. 2008; Hinrichsen et al. 2008; Mondelli et al. 2008; Xavier et al. 2008; França et al. 2008).

Bonfietti et al. (2012) realizaram um estudo envolvendo espécies crípticas de *C. parapsilosis*. Por meio de técnicas de PCR/RFLP, foram estudados 152 isolados de cultura sanguínea, de 17 centros hospitalares distribuídos em dois estados distintos e coletadas entre os anos de 1997 e 2011. Desses isolados, 90,8% foram confirmados como *C. parapsilosis*, no entanto, 8,6% foram reidentificados como *C. orthopsilosis* e 0,6% como *C. metapsilosis*. Outro estudo envolvendo candidemias causadas pelo complexo *C. parapsilosis* foi realizado por Ruiz et al. (2013) que analisaram 49 isolados anteriormente identificados como *C. parapsilosis* pelos métodos convencionais. Após análise por técnicas de biologia molecular foram confirmados 83,7% dos isolados como *C. parapsilosis*, 10,2% como *C. orthopsilosis* e 6,1% como *C. metapsilosis*. Em 2013, Oliveira et al. relataram três casos de candidemia envolvendo espécies crípticas do complexo *C. parapsilosis*, sendo dois casos identificados como *C. orthopsilosis* e um caso como *C. metapsilosis*. Este trabalho foi a primeira descrição de mortes em crianças e neonatos envolvendo essas espécies no Brasil.

No Brasil, Moretti et al. (2013) fizeram um estudo retrospectivo entre os anos de 2006 e 2010 sobre as candidemias em um hospital universitário, cujas espécies mais prevalentes foram *Candida albicans* 44 %, seguida por *C. tropicalis* (21,7%), *C. parapsilosis* (14,4 %), *C. glabrata* (11,2 %), e *C. krusei* ( 3,5 % ).

Candidemias envolvendo *Candida pelliculosa* são raramente descritas na literatura. Silva et al. (2013) relataram cinco casos envolvendo essa levedura em uma UTI neonatal no estado de Pernambuco, Brasil. Todos os pacientes receberam tratamento com antifúngicos e obtiveram bons resultados. Estudos genotípicos demonstraram semelhança clonal entre os diferentes isolados o que demonstra que as leveduras provavelmente tiveram a mesma origem.

Mas, foi a Rede Nacional de Vigilância de Candidemia que realizou o primeiro e único estudo multicêntrico no Brasil pelo que se tem conhecimento. Foram coletados isolados de 11 hospitais terciários localizados em nove estados brasileiros. Participaram desse estudo

São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Paraná, Espírito Santo e Distrito Federal. Os estudos analisaram a incidência, distribuição e perfis de resistência, no qual foram detectados um total de 712 casos de candidemia, sendo 40,9% por *Candida albicans*, 20,9% por *C. tropicalis*, 20,5% por *C. parapsilosis*, 6,2% por *C. pelliculosa*, 4,9% por *C. glabrata*, 2,4% por *C. guilliermondii* e 3,7% para outras espécies. A incidência de infecção por *Candida* foi de 2,49 casos/1000 admissões e 0,37 casos/1000 paciente dia (Colombo et al. 2006). Índices de infecção diferentes foram constatados em estudo publicado em 2010, onde foram identificadas taxas de 1,87 casos/1000 internações e 0,27 casos/1000 pacientes dias (Motta et al. 2010).

Em um estudo de vigilância epidemiológica, onde foram coletadas 61 isolados de *Candida albicans* de 11 hospitais terciários de 9 estados brasileiros, foi realizada a caracterização genética através da técnica de Multilocus Sequence Typing (MLST). Nesse estudo ficou demonstrado que 56% dos isolados eram pertencentes ao clado 1, seguido por 10% dos cladros 3 e 8. O Clado 2 foi isolado pela primeira vez na América do Sul neste estudo (Da Matta et al. 2010).

#### **2.4. Uso de Multilocus Sequence Typing (MLST) para tipagem de *Candida***

As tipagens moleculares, para a caracterização de agentes patogênicos, sempre foram complicadas devido as dificuldades encontradas para comparar os mais diversos estudos pelo mundo. Em 1998, um grupo de pesquisadores americanos comandados por Maiden e colaboradores propuseram uma nova metodologia que consistia na análise de genes de um determinado microrganismo. Decidiram então, estudar 11 genes que foram denominados como *housekeeping genes* de 107 isolados de *Neisseria meningitidis*. Foi observado que os mesmos genes se repetiam em isolados com idênticos fatores de virulência, ou seja, os fatores

de virulência estavam diretamente associados à similaridade existente em cada um daqueles genes. A técnica permitia reprodutibilidade e comparação de estudos nas mais diversas partes do mundo através de um "World Wide Web Site", o que significou uma revolução das técnicas de tipagem molecular. Esse estudo abriu as portas para outras análises das mais variadas espécies (Maiden et al. 1998).

A técnica envolve primeiramente uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do DNA. Sua caracterização é baseada na análise de pequenos fragmentos de DNA denominados "housekeeping genes" que possuem aproximadamente 450 a 500 pares de base (bp). As diferenças encontradas nesses fragmentos são responsáveis pela diferenciação das espécies e através desses perfis pode-se identificar os ancestrais daquela cepa (Lyon et al. 2010).

Durante alguns anos dois grupos de pesquisadores trabalharam para identificar quais seriam os melhores "housekeeping genes" para a correta diferenciação de *C. albicans*. Em trabalho publicado por Bougnoux et al. (2002) foram analisados 6 "housekeeping genes" na tentativa de padronização de uma técnica eficaz para a análise de *C. albicans*. Posteriormente Tavanti et al. (2003) propuseram a inclusão de quatro novos fragmentos para análise, AAT1a, AAT1b, MPI e ZWF1. Após inúmeros estudos esses dois grupos de pesquisadores estabeleceram em 2003, os sete "housekeeping genes" ideais para a tipagem molecular de *C. albicans* como sendo: AAT1a, ACC1, ADP1, MPIb, SYA1, VPS13, ZWF1b. Essa metodologia possui alta resolutividade e não permite a análise subjetiva, e os resultados podem ser divididos pelos mais variados grupos de pesquisadores espalhados pelo mundo (Odds et al. 2007, Odds, Jacobsen, 2008).

Em 2002, Bougnoux et al. publicaram um trabalho onde foram analisadas 6 "housekeeping genes" de 40 cepas provenientes de isolados clínicos de *C. albicans*, na França. Os resultados demonstraram que 73% dos isolados apresentavam similaridades genéticas

entre eles e puderam ser observados 39 combinações genotípicas diferentes entre os alelos encontrados resultando em 39 DSTs. No geral, esse estudo demonstrou que o MLST é um método altamente discriminatório e estável para caracterização inequívoca de *C. albicans* (Bougnoux et al. 2002).

Tavanti et al. (2003) estudaram 75 isolados de *C. albicans* provenientes de diversas regiões geográficas e de sítios clínicos. Nesse estudo foram testados oito fragmentos de genes distintos, quatro já testados anteriormente e quatro novos fragmentos: AAT1a, AAT1b, MPI e ZWF1. Nesse estudo foram encontrados 46 DSTs únicos e foi proposto que o MLST fosse realizado a partir de oito fragmentos de genes.

Essa metodologia é realizada com sucesso para a diferenciação de *C. albicans* e *C. dubliniensis* que são duas espécies filogeneticamente muito próximas e que não podem ser diferenciadas por características fenotípicas. Em estudo realizados por McManaus et al. (2008) foi estabelecido o consenso para a análise de MLST nos isolados de *C. dubliniensis*. As análises mostraram que os isolados de *C. dubliniensis* possuem menor variação genética do que os isolados de *C. albicans* e ficou estabelecido que os genes CdAAT1b, CdACC1, CdMPIb, Cd, RPN2, CdSYA1 e exCdVPS13, eram os que deveriam ser analisados na metodologia de MLST para *C. dubliniensis* (McManaus, 2008).

Em 2005, Tavanti e colaboradores analisaram através da técnica de MLST 416 isolados de *Candida albicans* identificando 4 grandes ócladosõ estreitamente relacionados e 8 ócladosõ menores. No estudo ficou demonstrado que a resistência de alguns isolados à flucitosina apresentava uma mutação única no gene FUR1 que, provavelmente é a responsável pela sua resistência. Isso demonstra que variações específicas em determinados genes podem estar diretamente relacionados com os fatores de virulência de determinadas cepas.

Lott et al. (2010) realizaram um estudo envolvendo MLST em populações de *C. glabrata*, nos Estados Unidos. Essa espécie tem obtido bastante importância nos últimos anos por ser patógeno emergente nas infecções de corrente sanguínea (ICS) e ainda ser pouco conhecido do ponto de vista da estrutura populacional e genética de suas cepas. Foram analisados 230 isolados divididos em 5 grupos entre os anos de 1992 e 1998, das cidades americanas de São Francisco, Atlanta e Baltimore de 14 hospitais diferentes. Foi identificado nesse estudo uma prevalência maior dos subtipos ST3 e ST16 na cidade de Atlanta quando comparado com as demais cidades.

Na China, Wu et al. (2012) comandaram um estudo utilizando a técnica de MLST para a caracterização de 58 isolados de *C. tropicalis*. Foram identificados 52 DSTs, dos quais todos os novos DSTs foram incluídos no banco de dados do MLST. Nesse estudo foram encontradas cepas com características genéticas semelhantes às encontradas em Taiwan, Bélgica, Brasil e EUA. Ainda na China, Xiao et al. (2012) realizaram estudo com cepas isoladas a partir de pacientes internados em uma unidade de terapia intensiva entre os anos de 2009 e 2011. De um total de 51 isolados foram analisados 17 que eram provenientes de 15 pacientes e de duas amostras de cateter venoso central (CVC). Foram encontrados 15 DSTs diferentes e um mesmo isolado com características genotípicas idênticas foi identificado tanto no CVC, quanto no isolado do sangue do paciente, confirmando que um dos casos de candidemia estava diretamente relacionado com o cateter do paciente.

Em Israel, Alastruey et al. (2013) realizaram o primeiro estudo utilizando a técnica de MLST com 42 isolados de *C. albicans*. Desses, 20 eram provenientes de infecção de corrente sanguínea e 22 de infecções superficiais. Foram identificados 37 DSTs, sendo que 17 ainda não haviam sido identificados anteriormente.

Odds et al. (2007) analisaram 1391 isolados provenientes de diversas partes do mundo e identificaram o DST69 como o mais comum e o responsável por ser o fundador do maior

grupo clonal para *C. albicans*. Dados semelhantes foram encontrados por Da Matta et al. (2010) que analisaram 63 isolados provenientes de 61 pacientes diferentes e identificaram o DST69 como o mais comum no Brasil. Esse DST foi identificado em 10 isolados provenientes de seis centros médicos distintos localizados em 6 cidades diferentes. O sequenciamento através do MLST permite os agrupamentos em clados, permitindo a verificação do ancestral de cada cepa. No mundo, os clados mais presentes são o 1, 2, 3, e 4, mas nos estudos realizados na América do Sul as cepas provenientes do clado 2 não foram encontradas. Foi nesse estudo que foi encontrada a primeira cepa proveniente do clado 02 na América do Sul, diferentemente do que acontece em outros continentes onde ela ocorre com maior frequência.

### 3. OBJETIVO GERAL

Determinar a incidência de candidemia em pacientes internados em Unidades Hospitalares de Manaus ó AM e caracterizar os isolados de *Candida* quanto à diversidade genética.

#### 3.1 Objetivos específicos

1. Verificar a incidência de fungemias causadas por *Candida* nas 11 unidades hospitalares de Manaus incluídas no estudo;
2. Identificar o perfil das pessoas acometidas pelas candidemias;
3. Determinar a diversidade genética de *Candida albicans* isoladas das hemoculturas pela técnica de tipagem molecular por sequenciamento de multilocus (MLST) para traçar um perfil epidemiológico;
4. Identificar espécies crípticas entre isolados de *Candida parapsilosis* provenientes das hemoculturas.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Modelo

Estudo transversal, descritivo e observacional.

### 4.2. Universo

Foram utilizados isolados de *Candida* provenientes de pacientes internados em 10 Unidades Públicas de Saúde e uma Privada da cidade de Manaus, no período de Janeiro a Dezembro de 2013. A maioria das Unidades de Saúde eram Hospitais Infantis e Maternidades.

As hemoculturas demandadas por todas essas Unidades Hospitalares foram feitas rotineiramente por um laboratório terceirizado de onde os isolados de *Candida* foram obtidos. As coletas nas enfermarias foram realizadas pela própria equipe do laboratório e as das UTIs pelas equipes de enfermagens de cada uma das unidades, em frascos de hemocultura da Becton, Dickinson and Company (BD, Paris, França). Após a chegada dos frascos no laboratório, os mesmos eram colocados nos equipamentos Bactec 9120 ou Bactec 9050 Becton, Dickinson and Company (BD, Paris, França). No caso de culturas positivas, os equipamentos emitiam um sinal entre 24 à 72 horas após a incubação. Em seguida, as mesmas eram retiradas dos equipamentos e semeadas em meios de cultura seletivos (Ágar Sangue, Ágar Mac Conkey, Ágar Sabouraud e Ágar Chocolate). Após o crescimento era realizada uma coloração de Gram para definir se a amostra era bacteriana (Gram negativa ou Gram positiva) ou levedura. Posteriormente era preparada uma suspensão com 3mL de salina a 0,45% (bioMérieux, Paris, França) e com o densiChek® (bioMérieux, Paris, França) feita a leitura da escala McFarland que deveria ficar entre 1,8 a 2,4. Depois era utilizado um cartão de leitura no equipamento Vitek® (bioMérieux, Paris, França) que determinava qual o micro-organismo isolado e o seu respectivo fungigrama em 24 horas. Os positivos para o gênero *Candida* eram

repicados em tubo de ensaio com meio de cultura Ágar Sabouraud e enviados ao laboratório de micologia do Instituto Leônidas e Maria Deane/ Fiocruz-Amazônia.

Foram incluídos todos os pacientes que possuíam pelo menos uma hemocultura positiva para *Candida* e sinais e sintomas de infecção sistêmica. Um mesmo paciente foi considerado como novo caso quando houve uma nova hemocultura positiva após 30 dias do primeiro caso detectado. Também foram considerados como novos casos as infecções por *C. albicans* de um mesmo paciente com perfil genotípico divergente após a análise de MLST, mesmo que não fosse obedecido o intervalo de 30 dias.

Foram excluídos do presente estudo todos os pacientes que tiveram hemoculturas positivas para *Candida* e que não apresentaram sinais e sintomas de infecção sistêmica, ou aqueles isolados que perderam a viabilidade por algum motivo, ou não puderam ser recuperadas após semeadura em Ágar Sabouraud para envio ao laboratório de Micologia da Fiocruz-AM.

Foram consideradas como crianças os pacientes com idade  $\leq$  4 anos segundo os critérios adotados pelo Ministério da Saúde. Dados como gênero, idade, local de internação no momento da identificação do caso, espécies isoladas e a evolução (alta ou óbito) foram analisados no presente estudo para identificar o perfil das pessoas acometidas pelas candidemias. Esses dados foram levantados junto ao Serviço de Arquivo Médico e Estatísticas (SAME) de cada uma das unidades, conforme autorização para utilização dos mesmos (Anexo 01 e Anexo 02). Essas autorizações foram dadas tanto pela Secretaria Estadual de Saúde, quanto pelos Diretores de cada uma das Unidades. O presente trabalho foi aprovado pelo CEP com o CAAE 12200612.3.0000.5020 (ANEXO 03)

### 4.3. Procedimentos

No estudo foram utilizadas as cepas previamente isoladas das hemoculturas realizadas pelo Laboratório terceirizado provenientes das Unidades Hospitalares estudadas.

Os pacientes, ou os responsáveis, de todos os casos positivos para *Candida* foram procurados pelas Comissões de Controle de Infecção Hospitalar, afim de que fosse autorizado o uso do microrganismo isolado através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 04 e Anexo 05).

Todos os isolados de *Candida* que foram recebidos no Laboratório de Biodiversidade em Saúde/Micologia do ILMD-Fiocruz, foram submetidos à análise de pureza e confirmação das espécies previamente identificadas, através do cultivo em CHROMagar *Candida*<sup>®</sup> (BD, Paris, França). Os isolados sem identificação da espécie foram cultivados em Ágar Sabouraud e identificados pelo Kit de Identificação API 20C (bioMérieux).

Os isolados originais foram repicados em duplicata em tubos de ensaio com meio de cultura Ágar Sabouraud glicose 2% e armazenados no Laboratório de Biodiversidade em Saúde/Micologia do ILMD-Fiocruz para posterior preservação e depósito na Coleção Biológica do ILMD.

A extração do DNA foi feita utilizando membrana de sílica (Kit QIAamp Tissue and Blood, Qiagen, Hilden, Germany). Cerca de 90 mg de biomassa de levedura foram transferidas com auxílio de alça bacteriológica descartável para microtubo contendo 1mL do meio líquido YPD (1% extrato de levedura; 2% glicose; 2% peptona) e incubado a 30°C durante 16 a 24 horas. Após centrifugar a 8000 rpm (5200 RCF) por 1 minuto e desprezar o sobrenadante era acrescentado ao microtubo 180 µL de tampão de lise (ATL) e pérolas de vidro lavadas em ácido. As células eram rompidas com choque mecânico através de maceração durante 2 minutos e depois procedia-se a extração genômica com adição de Proteinase K

*overnight* a 56°C. Após este período, era adicionado 200 µL de tampão de guanidina (AL) e feita agitação à frio em vórtex por 15s para posterior incubação por 10 min a 72 °C, em termobloco. Em seguida, era adicionado o mesmo volume, 200 µL, desta vez de etanol e feita a homogeneização em agitador. A mistura era transferida para as colunas de sílica e centrifugada a 8000 rpm (5200 RCF) por 1 min. O material era transferido para um novo tubo da coluna e 500 µL do primeiro tampão de lavagem eram adicionados à coluna (AW1), para em seguida, ser centrifugado por 1 min a 8000 rpm (5200 RCF). Novamente procedia-se a troca do tubo da coluna e 500 µL do segundo tampão de lavagem (AW2) eram adicionados à coluna de sílica, e centrifugado a 14000 rpm (15900 RCF) por 3 min. O DNA era recuperado com 100 µL de tampão de eluição (AE) próprio do kit, após centrifugação a 8000 rpm (5200 RCF) por 1 min. A coluna era desprezada e o filtrado armazenado a -20 °C.

A diferenciação das espécies crípticas *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* foi feita através da Amplificação do gene *SADH*. Primeiramente, foi realizada uma PCR com os *primers* S1F (5'-GTTGATGCTGTTGGATTGT-3') e S1R (5'-CAATGCCAAATCTCCCAA-3'). As condições de amplificação foram as seguintes: um ciclo de desnaturação inicial por 5 min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 1 min a 94°C, com 1 min a 50°C de anelamento de *primers* e 1 min a 72°C para extensão, com uma extensão final de 10 min a 72°C. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose (2%) em tampão Tris-Borato- EDTA (TBE), tampão (89 mM Tris base, ácido bórico 89 mM ácido, 2 mM de EDTA) 0,5 M 20 mL; 1.000 ml de TBE, a 100 volts durante 1 h à temperatura ambiente. *Amplicons* no gel foram corados com SYBR® Safe. *C. parapsilosis* (ATCC 40038), *C. orthopsilosis* (ATCC 40304) e *C. metapsilosis* (ATCC 40305) cedidos da Coleção de Cultura do INCQS/Fiocruz foram utilizados como controle. Os produtos de PCR (fragmento de 716 pb) obtido a partir de *C. parapsilosis* foram digeridos com a enzima de restrição *BanI* num volume de reação 30 µL contendo 16,5 µL de água ultra pura, 10 µL do

produto da PCR, 2 µL de tampão 10X e 1,5 µL de *BanI* (20 U/mL) (Tavanti et al. 2005, Tavanti et al. 2007, Bonfietti et al. 2012). A corrida foi feita em gel de agarose a 2% corado com SYBR® Safe. Foi utilizado Tampão TBE na corrida de eletroforese com um marcador de 100 pb. Bandas de DNA foram visualizados por transiluminação de UV. Após digestão enzimática com a enzima de restrição *BanI*, *Candida orthopsilosis* se caracterizou em gel de agarose pela presença de única banda de 716 pb, *C. parapsilosis*, por duas bandas (521 pb e 196 pb) e *C. metapsilosis* por quatro bandas (370 pb, 188 pb, 93pb e 60 pb).

Na análise do MLST a amplificação dos genes foi baseada na metodologia proposta por Bougnoux et al. (2002), Bougnoux et al. (2003) e Da Mata et al. (2010). Foram sequenciados 7 *housekeeping genes* de *C. albicans*. Na Tabela 01 estão listados os fragmentos de genes que foram amplificados com as sequências dos respectivos *primers*.

A amplificação dos fragmentos pela PCR foi feita com volume final de reação de 25µl contendo ~40ng de DNA genômico e as seguintes concentrações finais de reagentes: 17,5µl água ultrapura, 2,5µl solução tampão a 10X sem MgCl<sub>2</sub>, 1,0µl de MgCl<sub>2</sub> a 50mM, 0,5µl de dNTPs a 10mM, 1 µl de cada *primer forward* e *reverse* a 5mM e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase. As condições da reação de PCR foram desnaturação por 10 minutos a 94<sup>0</sup>C seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94<sup>0</sup>C por 1 minuto, hibridização por 1 minuto a 52<sup>0</sup>C, extensão por 1 minuto a 72<sup>0</sup>C e extensão final por 10 minutos a 72<sup>0</sup>C.

Após essa etapa foi feita a purificação dos produtos de PCR por PEG 8000 (Polietilenoglicol) (Anexo 06).

**Tabela 01:** Lista de fragmentos de genes que foram amplificados no ensaio do MLST para *C. albicans* com as sequências dos respectivos *primers*.

Gene	Produto do Gene	Primers	Tamanho do Amplicon (pb)	Fragmentos seqüenciados (pb)
<i>AAT1a</i>	<i>Asparato Aminotransferase</i>	Fwd 5' ACTCAAGCTAGATTTTGGC-3' Rev 5' CAGCAACATGATTAGCCC-3'	478	373
<i>ACCI</i>	<i>Acetil coenzima A carboxilase</i>	Fwd 5' GCAAGAGAAATTTTAATTCAA TG-3' Rev 5' TTCATCAACATCATCCAAGTG-3'	519	407
<i>ADPI</i>	<i>Permease ATPdependente</i>	Fwd 5' GAGCCAAGTATGAATGATTTG-3' Rev 5' TTGATCAACAAACCCGATAAT-3'	537	443
<i>MPIb</i>	<i>Manose fosfato Isomerase</i>	Fwd 5' ACCAGAAATGGCCATTGC-3' Rev 5' GCAGCCATGCATTCAATTAT-3'	486	375
<i>SYA1</i>	<i>Alanil-RNA Sintetase</i>	Fwd 5' AGAAGAATTGTTGCTGTTACT G-3' Rev 5' GTTACCTTTACCACCAGCTTT-3'	543	391
<i>VPS13</i>	<i>Proteína Vacuolar</i>	Fwd 5' TCGTTGAGAGATAATCGACTT-3' Rev 5' ACGGATGGATCTCCAGTCC-3'	741	403
<i>ZWF1</i>	<i>Glicose-6-fosfato Desidrogenase</i>	Fwd 5' GTTTCATTTGATCCTGAAGC-3' Rev 5' GCCATTGATAAGTACCTGGAT-3'	702	491

A reação de sequenciamento foi feita de acordo com as instruções do fabricante do Kit BigDye ® Terminator V3.1. Seu volume final foi de 10 µl contendo ~5 a 20ng de produto amplificado e as seguintes concentrações finais de reagentes: 5,7µl água ultrapura, 1,0µl do *primer* específico a 3,3mM, 0,3µl de BigDye a 2,5x, 2,0µl de tampão a 5x e 1 µl de produto amplificado. As condições da reação de sequenciamento foram desnaturação por 1 minuto a

95<sup>0</sup>C seguido de 20 ciclos de desnaturação a 95<sup>0</sup>C por 10 segundos, hibridização a 55<sup>0</sup>C por 15 segundos e extensão a 60<sup>0</sup>C por 2 minutos seguidos de 10 ciclos de desnaturação a 95<sup>0</sup>C por 10 segundos, hibridização a 55<sup>0</sup>C por 15 segundos e extensão a 60<sup>0</sup>C por 3 minutos, com extensão final a 72<sup>0</sup>C por 7 minutos. Após esse procedimento foi realizada a purificação da reação de sequenciamento conforme o Anexo 07.

A eletroforese capilar foi realizada pelo sequenciador ABI 3130 Genetic Analyzer. E cada cepa foi caracterizada quanto aos DSTs que resultaram da combinação dos alelos obtidos dos 7 genes estudados.

Após a obtenção dos cromatogramas, os mesmos eram corrigidos e as sequências copiadas e levadas para o site oficial do MLST (<http://calbicans.mlst.net>) para a verificação do alelo correspondente àquela sequência como pode ser verificado na Figura 01 que mostra o alelo 102 para o gene AAT1a. Através desse procedimento foram identificados os respectivos alelos para cada um dos genes de cada um dos isolados. Essa combinação foi novamente depositada no Banco de Dados do MLST para que fosse identificada o DST correspondente para aquele isolado, conforme é observado na Figura 02, onde há a identificação do DST 435 para *C. albicans*.

**DATA ANALYSIS**

**DATABASES**

- B. burgdorferi*
- B. cereus*
- B. henselae*
- B. pseudomallei*
- C. albicans***
- C. glabrata*
- C. krusei*
- C. tropicalis*
- C. jejuni*
- C. neoformans var grubii*
- E. coli*
- E. faecalis*
- E. faecium*
- H. influenzae*
- H. pylori*
- Leptospira spp.*
- M. catarrhalis*
- N. meningitidis*

**Candida albicans - consensus - Single Locus Sequence Query**

Please choose the allele you wish to query -

AAT1a

```
ATTGAAATGCAATGATATTCATTGGCYCCACCAGACAAGATTTGGGTATTTCTGA
AGCTTATAACAATGATTTCAACCTCAAAAATCAATTTGGGGTGGTGGCTTATAG
AGATAATTCYGGTAAACCAATATTTTCCATCAGTTAAAAAGCTGAAGAAATTT
ATTGGGTAAGAAATGAAAAGGAATATACTGCCATTTGGTTCAAAATTTCCA
ATCAATTCGAAAAATTCATTTCAACAATTTAATAAAGATGCCAATGGTAACA
ATTAATTGATGATGGTAGAATTTACTGCTCAAACCATCTCTGACTGGATCACT
TAGAGTTATCGCTGATTTCTTGAATCGTTTC
```

Sequência para o gene AAT1a

Simple Results

Policy Document

Wednesday 8th January 201

**DATA ANALYSIS**

**DATABASES**

- B. burgdorferi*
- B. cereus*
- B. henselae*
- B. pseudomallei*
- C. albicans***
- C. glabrata*

**Candida albicans - consensus - Single Locus Sequence Query**

SEARCH RESULTS :YOUR ALLELE NUMBER IS 102

Please choose the allele you wish to query -

AAT1a

Alelo identificado pelo MLST

**Figura 01:** Site do MLST demonstrando a sequência inserida na base de dados e posterior identificação do alelo 102 para o gene AAT1a da amostra CMS 01.

**DATA ANALYSIS**

**DATABASES**

- B. burgdorferi*
- B. cereus*
- B. henselae*
- B. pseudomallei*
- C. albicans***
- C. glabrata*
- C. krusei*
- C. tropicalis*
- C. jejuni*
- C. neoformans var grubii*
- E. coli*
- E. faecalis*
- E. faecium*
- H. influenzae*
- H. pylori*
- Leptospira spp.*
- M. catarrhalis*
- N. meningitidis*
- S. agalactiae*
- S. aureus*
- S. dysgalactiae*
- S. enterica*
- S. epidermidis*
- S. pneumoniae*

**Candida albicans - consensus - Allelic Profile Query**

Please enter your query below (the figure below each box represents the number of unique alleles in the current database for that locus)-

AAT1a	ACC1	ADP1	MP1b	SYA1	VPS13	ZWF1b
2	3	5	9	2	6	5
142	90	124	132	182	248	240

MLST Multi Locus Sequence Typing

Policy Document

Wednesday 8th January 201

**DATA ANALYSIS**

**DATABASES**

- B. burgdorferi*
- B. cereus*
- B. henselae*
- B. pseudomallei*
- C. albicans***
- C. glabrata*
- C. krusei*
- C. tropicalis*
- C. jejuni*
- C. neoformans var grubii*
- E. coli*
- E. faecalis*
- E. faecium*
- H. influenzae*
- H. pylori*
- Leptospira spp.*
- M. catarrhalis*
- N. meningitidis*
- S. agalactiae*
- S. aureus*
- S. dysgalactiae*
- S. enterica*
- S. epidermidis*
- S. pneumoniae*

**Candida albicans - consensus - Allelic Profiles query results**

Your sequence type is 435

Strain	ST	Serotype	AAT1a	ACC1	ADP1	MP1b	SYA1	VPS13	ZWF1b
HK04M176834	435		2	3	5	9	2	6	5
JIMS600007	435		2	3	5	9	2	6	5
B11	435		2	3	5	9	2	6	5
B11	435		2	3	5	9	2	6	5
B74	435		2	3	5	9	2	6	5
B134	435		2	3	5	9	2	6	5
B116	435		2	3	5	9	2	6	5

Submit profile for a further query -

AAT1a	ACC1	ADP1	MP1b	SYA1	VPS13	ZWF1b	Exact or nearest match
2	3	5	9	2	6	5	Submit

**Figura 02:** Site do MLST, mostrando a sequência de passos para a identificação do DST para *C. albicans*. Após a introdução de cada um dos alelos o programa informa o DST 435 como sendo o específico para esta sequência de dados.



As sequências obtidas na forma de cromatogramas foram alinhadas utilizando o Programa *Geneious* v6.0.6. Os sítios heterozigóticos foram substituídos pelas letras K, M, S, R, Y e W padronizadas pelo sistema internacional de códigos IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Cada uma dessas letras correspondem a uma heterozigose. Quando a sequência apresenta uma heterozigose envolvendo as bases  $G+T=K$  /  $A+C=M$  /  $C+G=S$  /  $A+G=R$  /  $C+T=Y$  e  $A+T=W$ . As sequências *Forward* e *Reverse* foram alinhadas gerando uma sequência consenso que foi analisada no site (<http://www.calbicans.mlst.net>) para que fossem identificados os alelos para cada um dos genes e seus respectivos DTSS. Essas combinações foram depositadas nesse banco de dados.

O programa eBURST v3 foi utilizado para identificar o provável ancestral comum entre os complexos clonais para estabelecer possíveis relações evolutivas entre as cepas.

As análises estatísticas foram realizadas através de análise exploratória de dados e a incidência foi calculada por 1000 pacientes/dia e 1000 internações.

Foram excluídos, dos cálculos de incidência, os Hospitais 06 e 07, pois os seus respectivos SAMEs não informaram os dados necessários para o presente estudo.

## 5. RESULTADOS

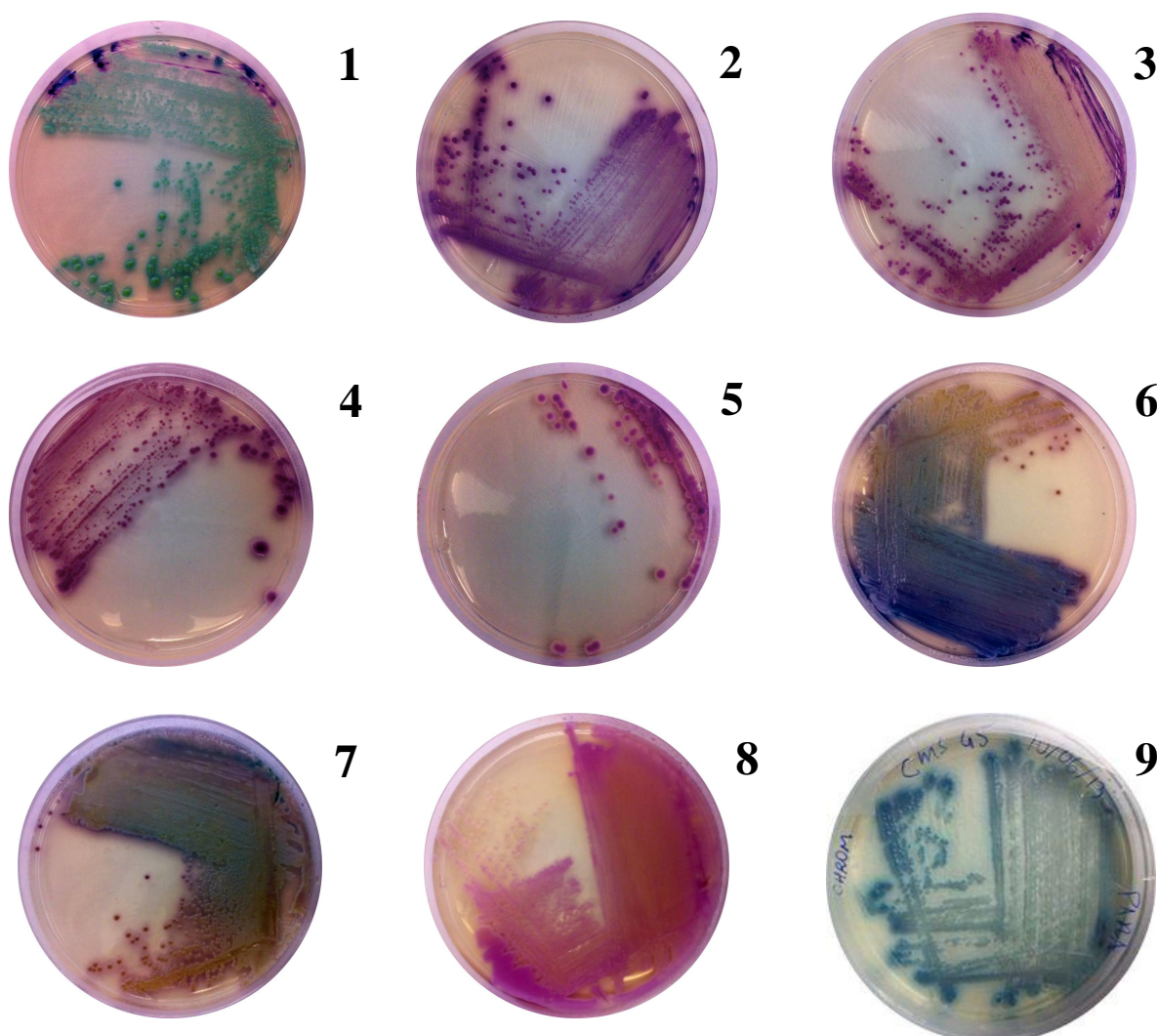
### 5.1. Incidência das espécies, distribuição dos casos por unidade e perfil das candidemias

Das 1349 hemoculturas positivas coletadas, entre 01 de janeiro de 2013 e 31 de dezembro de 2013, nos 11 hospitais estudados, o gênero *Staphylococcus* foi o mais prevalente nas infecções de corrente sanguínea com 691 isolados (51,22%) seguido pelo gênero *Candida* com 116 isolados (8,60%) (Dados do Laboratório Reunidos). Desses, apenas 101 fizeram parte do presente estudo (Anexo 08), onde foram encontradas 10 espécies diferentes como agentes causadores de candidemia (tabela 02). Um total de 15 isolados não foram recuperados pelo laboratório terceirizado responsável pelos exames e não foram enviados ao laboratório de micologia, sendo excluídos do presente estudo. *Candida albicans* foi a espécie mais prevalente representando 35,64% dos casos, seguida por *Candida tropicalis* com 30,69%, *Candida parapsilosis* com 17,82%, *Candida haemulonii*, *Candida orthopsilosis* e *Candida glabrata* com 2,97%, *Candida guilliermondii* e *Candida sp.* com 1,89% e *Candida famata*, *Candida metapsilosis* e *Candida pelliculosa* com 0,99% dos casos (Tabela 02).

**Tabela 02:** Distribuição das espécies do gênero *Candida* isoladas das hemoculturas dos pacientes internados em 11 unidades hospitalares do município de Manaus ó AM no ano de 2013.

Espécie	Nº de casos/espécies	Frequência
<i>Candida albicans</i>	36	35,64%
<i>Candida tropicalis</i>	31	30,69%
<i>Candida parapsilosis</i>	18	17,82%
<i>Candida haemulonii</i>	3	2,97%
<i>Candida glabrata</i>	3	2,97%
<i>Candida orthopsilosis</i>	3	2,97%
<i>Candida guilliermondii</i>	2	1,98%
<i>Candida sp.</i>	2	1,98%
<i>Candida famata</i>	1	0,99%
<i>Candida metapsilosis</i>	1	0,99%
<i>Candida pelliculosa</i>	1	0,99%
<b>Total</b>	<b>101</b>	<b>100,0%</b>

Todos os isolados foram primeiramente confirmados pelo repique em meio de cultura CHROMagar *Candida*<sup>®</sup> (BD, Paris, França) com a identificação por meio de coloração das colônias (Figura 01). Os isolados 45 e 47, que foram coletados de um mesmo paciente e, que haviam sido identificados como *C. parapsilosis*, não apresentaram o padrão de coloração esperado, quando semeados em meio de cultura CHROMagar *Candida*. Os mesmos foram analisados por meio de testes bioquímicos API 20C (bioMérieux, Paris, França), no entanto, os resultados não foram conclusivos e apenas indicaram uma probabilidade de cerca de 65% de se tratar de um isolado de *Candida lusitaniae* (Figura 03).



**Figura 03:** Apresentação de culturas de *Candida albicans* (1), *Candida guilliermondii* (2), *Candida parapsilosis* (3), *Candida glabrata* (4), *Candida pelliculosa* (5), *Candida tropicalis* (6), *Candida famata* (7), *Candida haemulonii* (8), *Candida* sp. (9)\*

\*Isolado identificado primariamente como *C. parapsilosis*

Fonte: o autor

No presente estudo foi identificada também a levedura *Kodamaea ohmeri*, um estágio teleomorfo de *Candida guilliermondii* var. *membranifaciens*. Em meio de cultura Ágar Sabouraud a levedura apresentou colônias de coloração branca a creme, rugosa, com bordas irregulares e colônias com coloração variando do azul para rosa em meio CHROMagar *Candida*®. Testes bioquímicos (API 20C) e genotípicos (PCR e sequenciamento) confirmaram a espécie *Kodamaea ohmeri* (Figura 04).



**Figura 04:** *Kodamaea ohmeri* em Ágar Sabouraud

Fonte: o autor

Dos 87 casos de candidemia, estudados no trabalho, ocorridos em 83 pacientes, foram encontrados 101 isolados de *Candida*. Houve, dois casos de candidemia recorrente, ou seja, a mesma espécie infectando um paciente após 30 dias do primeiro diagnóstico e em dois casos um mesmo paciente apresentou candidemia por espécies diferentes das isoladas inicialmente. Estes dois casos foram considerados como novas infecções (tabela 03).

O Hospital 11 foi o que apresentou o maior percentual de casos de Candidemia ao longo do período estudado com 29,72% das hemoculturas positivas para *Candida*. Vale

ressaltar, que este hospital foi incluído no estudo a partir de setembro, pois só nesse mês começou-se a receber os seus isolados. No total esse hospital apresentou 37 hemoculturas positivas, nas quais foram encontrados 11 isolados do gênero *Candida*, desses, apenas quatro foram recuperados para a realização do estudo. O hospital 10 foi o segundo em percentual de casos com 23,08%, seguido do hospital 01 com 22,37% de suas culturas positivas para o gênero *Candida*.

**Tabela 03:** Número de hemoculturas positivas, número de isolados e % de culturas positivas para *Candida*, número de pacientes acometidos com candidemia, número de casos e número de isolados analisados em cada uma das 11 unidade hospitalares estudadas na cidade de Manaus-AM, no ano de 2013.

No. do Hospital	Hemoculturas positivas	Hemoculturas positivas para <i>Candida</i>	No. de Pacientes	No. de Casos	No. de isolados estudados/hospital
1	219	49 (22,37%)	35	40	47
2	62	4 (6,45%)	4	4	3
3	13	2 (15,38%)	2	2	2
4	64	3 (4,69%)	3	3	3
5	129	11 (8,53%)	10	10	7
6	368	10 (2,72%)	10	10	10
7	171	11 (6,43%)	10	10	9
8	78	2 (2,56%)	2	2	3
9	195	10 (5,13%)	8	7	10
10	13	3 (23,08%)	2	2	3
11	37	11 (29,73%)	8	8	4
TOTAL	1349	116 (8,60%)	94	98	101

Entre os hospitais que participaram do estudo o hospital 01 foi o que apresentou o maior número de casos de candidemia estudados com 40 no total (40,8%), seguido pelos hospitais 05, 06, 07 com 10 casos (10,2%), hospital 11 com 8 casos (8,2%), hospital 09 com 7 casos (7,1%), hospital 02 com 4 casos (4,1%), hospital 04 com 3 casos (3,1%) e hospitais 03, 08, 10 com 2 casos (2,0%) (Tabela 03).

A tabela 03 mostra o quantitativo de casos nas 11 unidades estudadas e esse foi o quantitativo utilizado para o cálculo da incidência, tendo em vista que se fosse usado apenas o

número de casos estudados a incidência por 1000 pacientes dia e por 1000 internações dia ficaria com valores mascarados.

**Tabela 04:** Distribuição da faixa etária dos pacientes.

Faixa etária	Numero de pacientes
0 a 1 anos	58
2 a 3 anos	4
4 a 5 anos	1
6 a 9 anos	2
11 a 13 anos	3
15 a 17 anos	3
>18 anos	12
Total	83

Os casos foram mais prevalentes em pacientes do sexo masculino (68,24%) do que no sexo feminino (31,76%), as crianças foram mais acometidas com 68 casos (81,92%) do que os adultos com 15 casos (18,07%) (Tabela 04).

A incidência geral encontrada foi de 2,31 casos por 1000 internações e 0,61 casos por 1000 pacientes/dia. Hospital 10 foi o que apresentou a maior incidência com 41,42 casos por 1000 internações e 0,77 casos por 1000 pacientes/dia, seguido pelo Hospital 11 que apresentou 18,22 casos por 1000 internações e 1,75 casos por 1000 pacientes/dia, e pelo Hospital 01 que apresentou 9,99 casos por 1000 internações e 1,23 casos por 1000 pacientes/dia (Tabela 05).

**Tabela 05:** Incidência geral e por hospital calculada para 1000 pacientes dia e 1000 internações

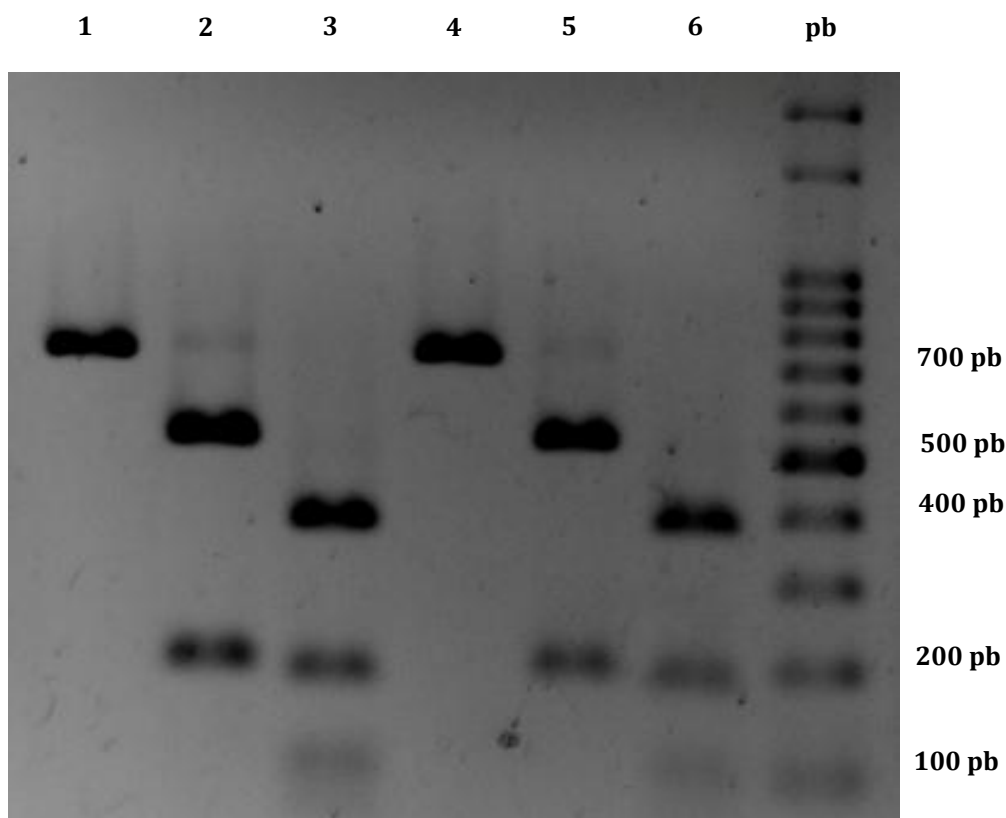
Hospital	Casos	Pacientes/dia	Incidência 1000 pacientes dia	Internações	Incidência por 1000 internações
1	40	32652	1,23	4003	9,99
2	4	12801	0,31	2679	2,61
3*	2	1851	1,08	96	20,83
4*	3	3746	0,80	439	6,83
5	10	31314	0,32	12654	0,79
6	10	NF	NF	10526	0,95
7	10	NF	NF	NF	NF
8	2	15647	0,13	4515	0,44
9	7	21743	0,32	2552	2,74
10	2	2611	0,77	169	41,42
11*	8	4564	1,75	439	18,22
Total	98	126929	0,61	38072	2,31

\* Os dados dos hospitais 3, 4 e 11 são referentes apenas as suas respectivas UTIs  
 NF= Não fornecido

A taxa de mortalidade geral foi de 37,21% dos pacientes acometidos, sendo o Hospital 05 o que apresentou a maior taxa de mortalidade (50%), seguido pelo hospital 01 (46,15%). *Candida tropicalis* foi a espécie que acarretou as maiores taxas de mortalidade (53,85%), seguido de *Candida albicans* (42,86%). Outras espécies apresentaram taxas de mortalidade de 33,33% e *Candida parapsilosis* foi a que apresentou as menores taxas com 5,88%.

## 5.2. Espécies crípticas *õpsilosisõ*

Foram identificadas 22 hemoculturas positivas para *Candida parapsilosis* no período estudado, representando 21 casos, já que um mesmo paciente apresentou duas hemoculturas positivas em um intervalo inferior a 30 dias o que não configurou um novo caso. Com a técnica de PCR/RFLP, pela amplificação do gene SADH, 18 isolados (81,81%) foram confirmados como *C. parapsilosis*, três isolados (13,63%) anteriormente descritos como *C. parapsilosis*, foram reidentificados como *C. orthopsilosis*, correspondendo aos isolados 39, 67 e 91 e um isolado (4,54%) foi reidentificado como *C. metapsilosis* correspondendo ao isolado 77 (Figura 05 e (Tabela 06).



**Figura 05** ó Gel de eletroforese da digestão enzimática pós amplificação do gene SADH com a enzima de restrição *BanI*. Isolado 39 de *C. orthopsilosis* (1), Isolado 11 de *C. parapsilosis* (2), Isolado 77 de *C. metapsilosis* (3), cepa ATCC 40304 de *C. orthopsilosis* (4), cepa ATCC 40038 de *C. parapsilosis*, (5), cepa ATCC 40305 de *C. metapsilosis*, (6), pb (Marcador).

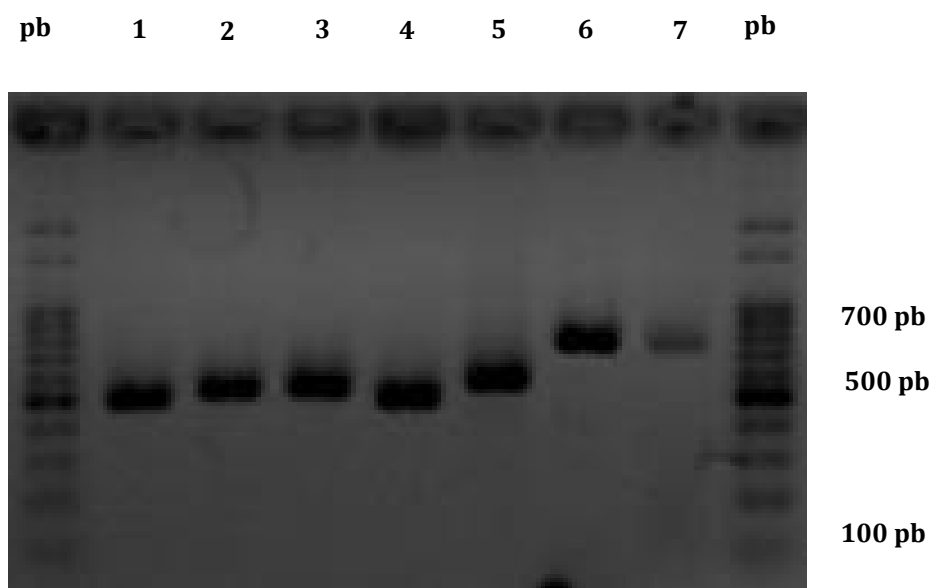


**Tabela 06:** Distribuição das candidemias causadas pelas espécies crípticas de *Candida* do complexo *õpsilosisõ*

Espécies	Casos	%
<i>Candida parapsilosis</i>	18	81,8%
<i>Candida orthopsilosis</i>	3	13,6%
<i>Candida metapsilosis</i>	1	4,5%
Total	22	100,0%

### 5.3. Análise da tipagem molecular por MLST

Foram analisados 35 isolados de *C. albicans* pela técnica de MLST provenientes de 29 pacientes, distribuídos em seis hospitais de um total de 101 isolados, que representaram 35,64% de todos os isolados do presente trabalho. Para cada isolado foi realizada uma reação de PCR para cada um dos genes estudados. Após a confirmação por eletroforese das ampliações, foi efetuado a purificação com PEG para posterior reação de sequenciamento (Figura 06).



**Figura 06:** Gel de eletroforese de um isolado de *C. albicans* CMS 01 amplificados para os setes genes estudados pela técnica MLST. Marcador (pb); gene AAT1a (1), gene ACC1 (2), gene ADP1 (3), gene MP1B (4), gene SYA1 (5), gene VPS13 (6) e gene ZWF1b (7).

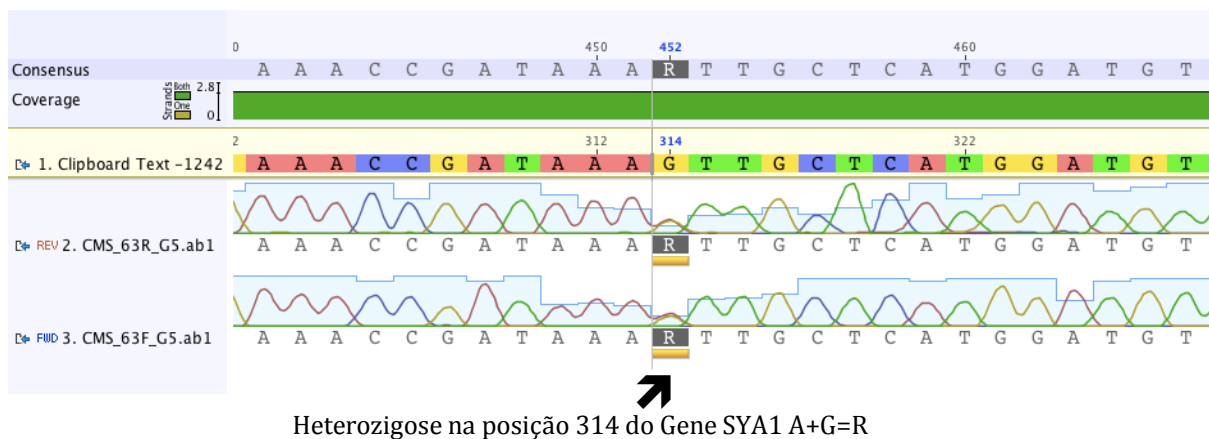
Os fragmentos utilizados foram os padronizados por Bougnoux et al. (2003), conforme Tabela 01. Foram encontrados 58 alelos diferentes, sendo que um deles foi configurado como novo alelo. Para cada um dos genes foram identificados entre 05 a 10 alelos diferentes. O gene AAT1a apresentou a maior variação sendo identificados 10 alelos distintos, os genes MP1B, SYA1 e VPS13, apresentaram 9 alelos, os genes ZWF1b e ADP1 apresentaram 8 alelos e o gene que apresentou a menor variação genética foi o ACC1 com apenas 5 alelos encontrados. Entre os genes, o alelo mais comumente encontrado para o gene AAT1a foi o 25, para o ACC1 o 7, para o ADP1 o 6, para o MP1B o 3, para o SYA1 o 6, para o VPS13 o 27 e para o ZWF1b o 37 (tabela 07).

**Tabela 07-** Genes sequenciados, alelos encontrados, alelos mais comuns para cada um dos genes, quantidade de alelos diferentes encontradas e os respectivos tamanhos dos fragmentos e amplicons dos isolados de *C. albicans* analisados.

Gene	Alelo	Alelo mais comum	Variação dos alelos	Fragmentos sequenciados (pb)	Tamanho do Amplicon (pb)
AAT1a	2, 24, 25, 31, 33, 47, 55, 62, 74, 102	25	10	349	478
ACC1	2, 3, 5, 7, 14	7	5	407	519
ADP1	2, 3, 4, 5, 6, 16, 35, 38	6	8	443	537
MP1B	2, 3, 4, 7, 9, 12, 14, 28, 54	3	9	375	486
SYA1	2, 3, 6, 13, 31, 34, 75, 86, Novo alelo	6	9	391	543
VPS13	4, 5, 6, 19, 21, 27, 39, 45, 122,	27	9	403	741
ZWF1b	5, 6, 15, 22, 37, 52, 135, 136	37	8	491	702

A combinação desses alelos representam 25 DST diferentes, dos quais 10 já foram previamente relatados e 15 consistiram em novos genótipos. O DST mais frequente foi o DST 90, tendo sido identificado em 9 isolados provenientes de 5 pacientes em 3 hospitais diferentes (Hospital 01, 07 e 09). Um novo alelo foi encontrado para o gene SYA1, que apresenta 99% de similaridade com o alelo 6, no entanto, quando comparado com o mesmo

ficou evidente a diferença na posição 314 que apresentou uma heterozigose A+G=R (Figura 07).



**Figura 07:** Cromatograma analisado no Programa *Geneious* v6.0.6 mostrando a heterozigose na posição 314 do Gene SYA1 para *C. albicans* (isolado CMS 63), configurando um novo alelo encontrado neste trabalho.

É importante salientar que nenhum dos alelos depositados no Banco de Dados do MLST apresentaram heterozigose nesta posição, que era relatada como uma região totalmente preservada para esse gene até o presente momento. O segundo genótipo mais encontrado foi o DST 298 que foi localizado em dois pacientes diferentes.

A diversidade genética encontrada pode ser observada na Tabela 08 onde são mostrados os números de DSTs obtidos para cada uma das Unidades Hospitalares estudadas que tiveram casos positivos de infecção por *C. albicans*.

**Tabela 086** Tabela geral dos 35 isolados de *C. albicans* estudados pela técnica de MLST, por Unidade Hospitalar, com a identificação de cada um dos genes para cada um dos isolados e respectivos DSTs.

Registro	Hospital	AAT1a	ACC1	ADP1	MPIb	SYA1	VPS13	ZWF1b	DST	Gênero	Desfecho
CMS01	1	102	7	6	14	75	27	37	10001**	M	A
CMS02	1	25	3	4	54	34	45	15	10002**	F	O
CMS03	1	55	3	4	54	34	45	15	10003**	M	A
CMS06	5	2	3	2	9	2	27	5	10004**	M	O
CMS08	1	2	3	5	9	2	6	5	435	F	O
CMS10	7	2	2	5	2	2	5	5	10005**	F	O
CMS15	1	25	7	6	3	6	27	37	90	F	O
CMS23	7	2	5	5	2	2	5	5	1133	F	A
CMS24	7	25	7	6	3	6	27	37	90	M	A
CMS25	9	24	7	6	3	6	27	37	298	F	A
CMS27	5	25	7	6	3	6	27	22	10006**	M	O
CMS28	7	31	3	5	4	2	6	5	10007**	M	A
CMS29	1	2	5	5	4	6	6	5	10008**	M	A
CMS31	1	25	7	6	3	6	27	37	90	M	A
CMS33	1	2	5	5	4	2	21	5	314	M	A
CMS35	5	25	5	2	2	2	6	5	10009**	M	A
CMS40	7	2	3	5	9	2	21	5	1359	M	A
CMS49	9	24	7	6	3	6	27	37	298	M	A
CMS51	7	55	3	4	54	6	45	15	10010**	M	O
CMS63	4	25	7	6	3	1001*	27	37	10011**	M	A
CMS64	1	33	14	38	12	31	122	15	10012**	M	O
CMS66	6	47	14	35	28	86	4	6	10015**	M	A
CMS69	6	47	14	35	28	86	4	6	10015**	M	A
CMS73	9	25	7	6	3	6	27	136	10013**	M	A
CMS76	9	62	3	3	3	3	39	95	918	F	A
CMS80	1	2	5	5	4	2	6	5	444	M	O
CMS85	9	25	7	6	3	6	27	37	90	M	A
CMS87	1	55	14	4	54	34	45	15	1951	F	O
CMS88	1	25	7	6	3	6	27	37	90	M	A
CMS89	9	25	7	6	3	6	27	37	90	M	A
CMS90	9	25	7	6	3	6	27	37	90	M	A
CMS95	1	25	7	6	3	6	27	37	90	M	O
CMS96	1	2	5	5	2	2	27	5	471	M	A
CMS97	1	74	7	16	7	13	19	52	10014**	F	A
CMS102	1	25	7	6	3	6	27	37	90	M	O

\*= número de alelo não oficial. O número foi dado provisoriamente para permitir análise no Programa eBurst.

\*\*= número do DST não oficial. O número foi dado provisoriamente para permitir análise no Programa eBurst.

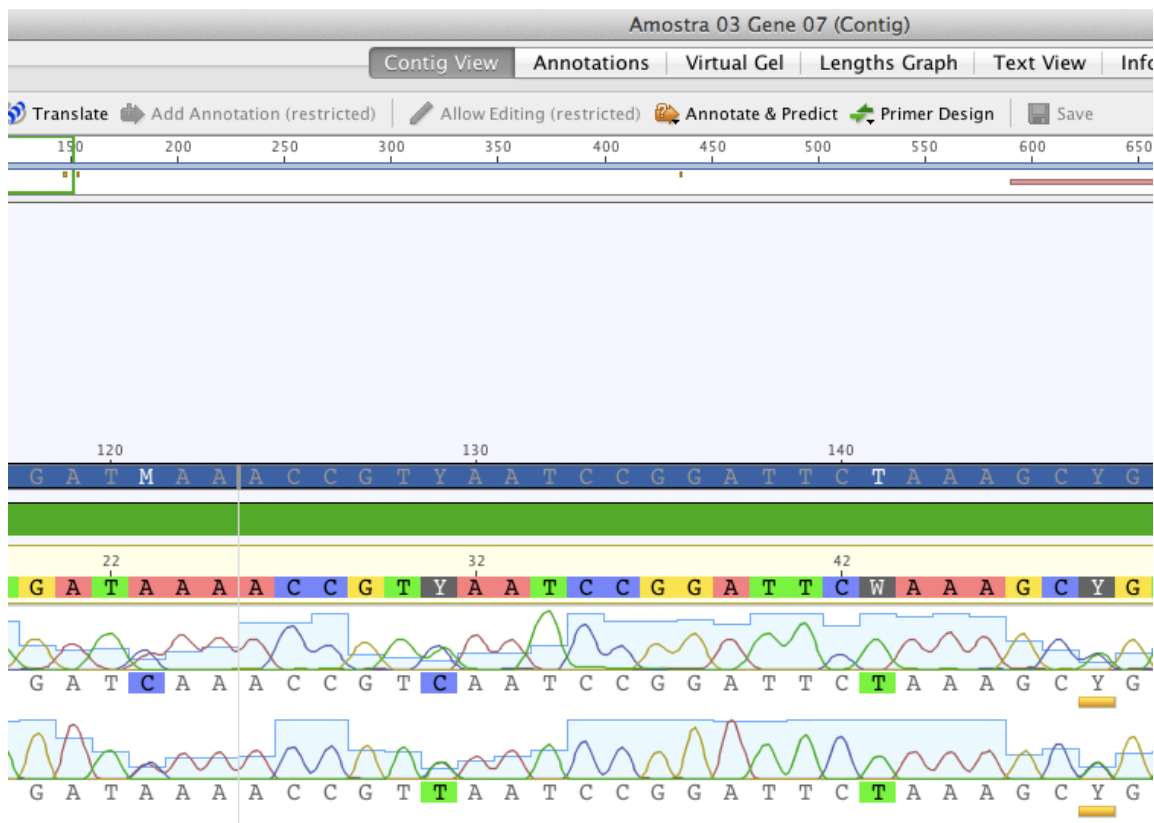
A= Alta, O= Óbito

O Hospital 01 foi o que apresentou o maior número de casos, 16 no total, e a maior diversidade genética com 12 DSTs, seguido do Hospital 07 que apresentou 6 casos e todos representaram DSTs distintos. O Hospital 09 apresentou 7 casos e 4 DSTs diferentes, sendo que um desses DSTs (298) foi isolado de pacientes distintos e com um intervalo de tempo maior que dois meses, o que demonstra que esses isolados possuem a mesma origem clonal ainda que coletadas com dois meses de diferença. O Hospital 05 apresentou 3 isolados e todos apresentaram DST diferentes e os Hospitais 6 e 4 apresentaram, respectivamente, 2 e 1 isolados, e um único DST identificado (Tabela 09).

**Tabela 09:** Número de isolados e DSTs únicos para cada uma das Unidades Hospitalares entre os isolados de *C. albicans* estudadas através da técnica de MLST

No. do Hospital	No. de isolados	Número de DSTs únicos por hospital
1	16	11
4	1	1
5	3	3
6	2	1
7	6	6
9	7	4

Os cromatogramas foram analisados um a um no programa *Geneious*. Os pontos de heterozigose são representados por dois picos, geralmente do mesmo tamanho de bases distintas dentro da mesma posição do gene, o que geralmente está acompanhado de um sinal mais baixo no cromatograma, como pode ser observado na Figura 08. Nela são demonstradas heterozigoses previamente identificadas pelo programa como A+C=M, C+T=Y, porém pode ser observado uma heterozigose C+T=Y que não foi identificada pelo programa e que teve que ser corrigida manualmente. Nesse estudo não foi encontrada nenhuma poliploidia, que seria evidenciada pela presença de 3 picos em uma mesma posição do cromatograma.



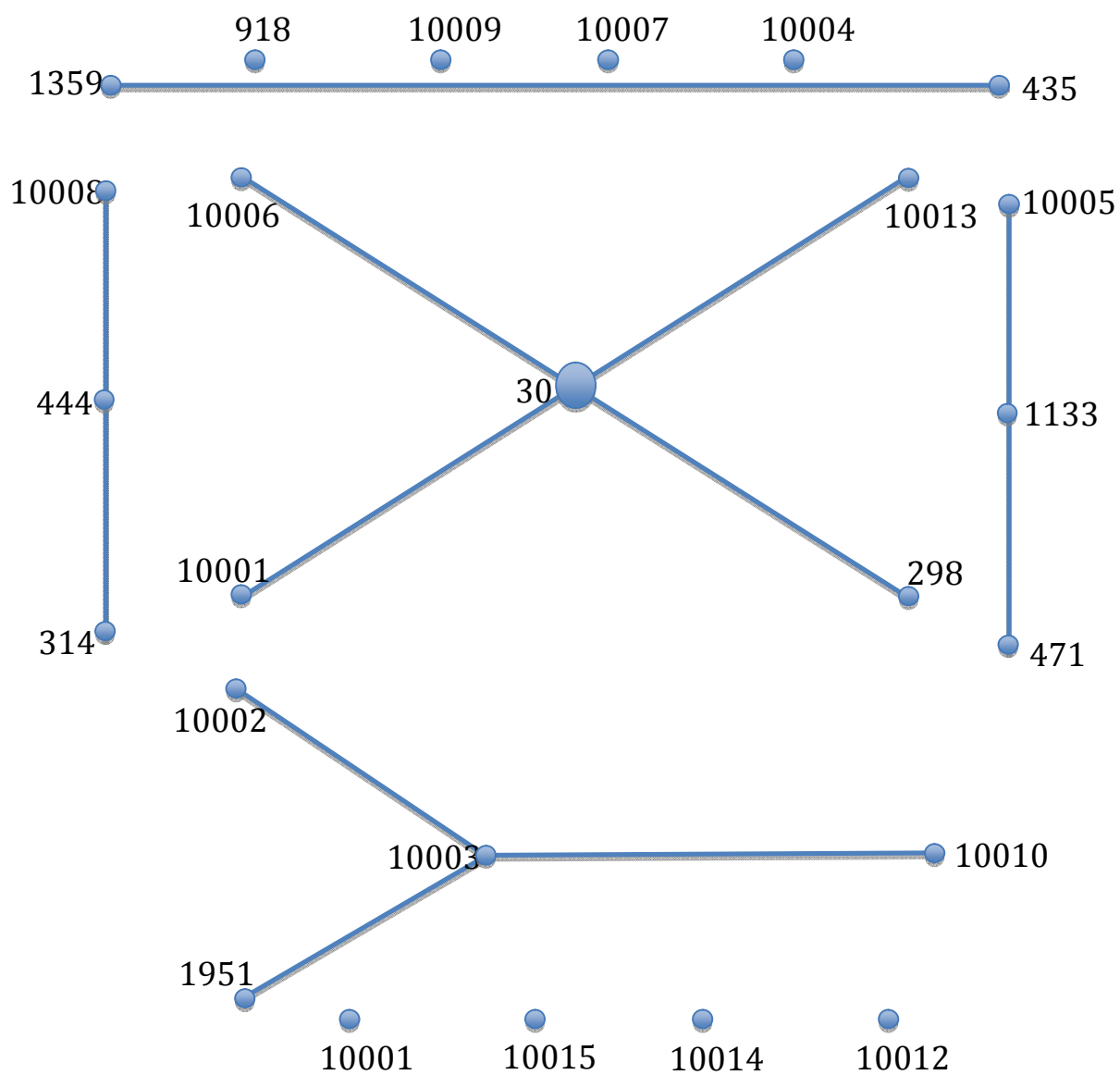
**Figura 08-** Cromatograma analisado pelo Programa *Geneious* v6.0.6 para o gene *ZWF1b*, demonstrando as heterozigose  $A+C=M$  e  $C+T=Y$  para a amostra 03.

Por meio da análise com o Programa *eBurst* os 35 isolados de *C. albicans* foram organizados em 5 grupos distintos tendo como ancestrais os DSTs 90 (no grupo 1), 10003 (no grupo 2), 444 (no grupo 3) e 1133 (no grupo 4). Esses grupos estão representados na Figura 09, onde os que possuem seis alelos idênticos estão conectados entre si por um ancestral comum. Um dos grupos, com apenas dois DSTs identificados, não possui ancestral definido e oito DSTs foram identificados como *singletons*, ou seja, não possuem nenhuma ligação com outro DST identificado no presente estudo (Tabela 10).

**Tabela 10:** Grupamento dos DSTs identificados e frequência dos isolados após análise do programa eBurst.

Grupo	DSTs
1	<b>90</b> , 10006, 10013, 298 e 10011
2	<b>10003</b> , 10002, 10010 e 1951
3	<b>444</b> , 10008 e 314
4	<b>1122</b> , 10005 e 471
5	1359 e 435
<i>Singleton</i>	10009
<i>Singleton</i>	10007
<i>Singleton</i>	10004
<i>Singleton</i>	918
<i>Singleton</i>	10001
<i>Singleton</i>	10015
<i>Singleton</i>	10014
<i>Singleton</i>	10012

Os DSTs em negrito são os ancestrais de cada grupo.



**Figura 09:** Diagrama gerado pelo eBurst com as ligações dos DSTs e seus respectivos grupamentos. Os DSTs com pelo menos seis alelos idênticos estão conectados entre si.



## 6.0. DISCUSSÃO

### 6.1. Incidência de fungemias causadas por *Candida*

No ano de 2013, o gênero *Candida* foi o segundo gênero mais prevalente nas infecções de corrente sanguínea (ICS), representando 8,60% dos casos observados nos 11 hospitais de Manaus estudados. Esse resultado é semelhante ao encontrado no ano de 2012, quando *Candida* foi responsável por 9,56% dos casos, sendo também o segundo gênero mais prevalente dessas infecções (Dados do Laboratório Reunidos). Dados divergentes foram encontrados em diversos estudos no Brasil e no mundo. No Brasil, Colombo et al. (2006) identificaram após o maior estudo multicêntrico sobre Candidemias em nosso país o gênero *Candida* como o quarto principal agente causador das infecções de corrente sanguínea. Dados semelhantes foram encontrados em estudo realizado na Alemanha e EUA (ANVISA, 2004; Meyer et al. 2013). Na Suíça, Marchetti et al. (2004) descreveu *Candida* como o sétimo principal agente das ICS.

Dos 101 isolados de *Candida* analisados no estudo apenas dois, os isolados 45 e 47, coletados de um mesmo paciente, não foram identificados pela metodologia utilizada. Serão necessários estudos envolvendo sequenciamento genético para identificação desses isolados.

Um achado importante do presente estudo foi a identificação de um isolado de *Kodamaea ohmeri*, um estágio teleomorfo de *Candida guilliermondii*, como causador de infecção de corrente sanguínea. Este, é o terceiro relato de infecção por essa espécie no Brasil, tendo em vista que Ostronoff et al. (2006) e Barros et al. (2009) já haviam relatado casos de fungemia em paciente pediátricos por *Kodamaea ohmeri*. Na Itália, Santino et al. (2012) relataram dois casos de fungemia envolvendo essa espécie, e na Índia Chakrabarti et al. (2013) relataram 38 casos de fungemia envolvendo essa espécie após reidentificação de *Candida tropicalis*.

Entre os 101 isolados estudados, foram identificadas 10 espécies diferentes de *Candida* causadoras de candidemias, demonstrando uma diversidade muito maior do que a relatada em outros estudos. Deve-se ressaltar que o presente estudo fez a diferenciação das espécies crípticas de *C. parapsilosis*. *Candida albicans* foi a espécie mais prevalente representando 35,64% dos casos o que vai de encontro aos números encontrados na literatura (Viudes et al. 2002; Richet et al. 2002; Tortorano et al. 2004; Rodero et al. 2005; Aquino et al. 2005; Colombo et al. 2006; Chang et al. 2008; Xavier et al. 2008; França et al. 2008; Motta et al. 2010; Ajenjo et al. 2011; Nucci et al. 2011; Pemán et al. 2012; Bassetti et al. 2013; Blanco-Blanco et al. 2013; Asmundsdottir et al. 2013; Kreusch et al. 2013; Moretti et al. 2013).

Nesse estudo, foi identificada uma infecção causada por *Candida pelliculosa*, com o paciente evoluindo para alta hospitalar e que raramente é descrita na literatura. Recentemente, Silva et al. (2013), relataram cinco casos envolvendo essa levedura em uma UTI neonatal no estado de Pernambuco, Brasil. Todos os pacientes foram tratados com antifúngicos convencionais e tiveram boa evolução até a alta hospitalar.

Outros casos raros identificados foram os causados pelas espécies crípticas de *Candida parapsilosis*. Nesse estudo foram identificados três casos de candidemia por *C. orthopsilosis* e um caso por *C. metapsilosis*. Um dos pacientes infectados com *C. orthopsilosis* evoluiu para óbito. Em 2013, Oliveira et al. relataram três casos de candidemia em São Paulo envolvendo espécies crípticas do complexo *C. parapsilosis*, sendo dois casos identificados como *C. orthopsilosis* e um caso como *C. metapsilosis*. Este trabalho foi a primeira descrição de mortes em crianças e neonatos envolvendo essas espécies no Brasil. As taxas de infecção para o complexo *õpsilosisö*, em nosso estudo, foram de 81,81% para *C. parapsilosis*, 13,63% para *C. parapsilosis*, e 4,54% para *C. metapsilosis*.

A Unidade Hospitalar que apresentou o maior número de isolados de *Candida* coletados (47 isolados representando 46% dos isolados) é uma unidade de alta complexidade que abriga os pacientes mais críticos do estado do Amazonas. Além disso, 22,37% das infecções de corrente sanguínea desse hospital foram causadas pelo gênero *Candida* o que mostra a necessidade de uma intervenção diferenciada para essa Unidade Hospitalar, no que se refere as candidemias.

As crianças são as mais acometidas por essas infecções e suas taxas variam de 32% a 86% dos casos, isso está diretamente relacionado com os fatores de risco associado a esses pacientes e ao fato do gênero *Candida* ser um patógeno oportunista. Entre as crianças, as menores de um ano são as mais acometidas por essas infecções e suas taxas variam de 21 a 50% dos casos. Isso ocorre principalmente devido aos fatores de risco associados como baixo peso ao nascer, prematuridade e utilização de nutrição parenteral. Os pacientes internados em UTI possuem diversos fatores de risco relacionados, o que faz deles pacientes com alto risco para essas infecções e suas taxas variam entre 34,6 a 46%. A presença de cateter venoso central é um dos fatores mais importantes estando associados em 70 a 93,9% dos casos (Viudes et al. 2002; Aquino et al. 2005; Colombo et al. 2006; Peman et al. 2012; Mondelli et al. 2012).

No presente estudo a incidência geral encontrada foi de 2,83 casos por 1000 internações e 0,61 casos por 1000 pacientes/dia. Esses dados são divergentes dos relatados no mundo que possuem taxas de infecção que variam entre 0,28 a 1,95 casos/1000 internações e 0,035 a 0,24 casos/1000 pacientes dia (Richet et al. 2002; Péman et al. 2012; Meyer et al. 2013; Kreusch et al. 2013; Nucci et al. 2013) e no Brasil, onde Colombo e colaboradores (2006) relataram taxas de infecção de 2,49 casos/1000 internações e 0,37 casos 1000 pacientes/dia.

Dados ainda mais preocupantes e ainda não descritos na literatura foram os encontrados em duas, das 11 unidades hospitalares estudadas. Embora, sejam unidades hospitalares terciárias e de alta complexidade suas taxas foram excessivamente altas. O hospital 11 apresentou 18,22 casos por 1000/internações e 1,75 casos por 1000 pacientes/dia e o hospital 05, apresentou 9,99 casos por 1000/internações e 1,23 casos por 1000 pacientes/dia, e mostrando a necessidade de uma intervenção imediata por parte da Comissão Estadual de Controle de Infecções Hospitalares.

As análises de MLST nos isolados de *C. albicans*, demonstraram que essas infecções, embora hospitalares, não possuíam relação entre elas, pois os perfis genotípicos encontrados são diferentes na maioria das vezes, e quando são idênticos possuem uma distância temporal que não permite determinar que os isolados tenham sido provenientes da mesma fonte de infecção. O mais provável é que sejam infecções hospitalares endógenas, onde os pacientes estariam sendo infectados por cepas já existentes em sua flora normal, e que por serem oportunistas, acabaram infectando esses pacientes devido a queda da imunidade.

A taxa de mortalidade geral no presente trabalho foi de 37,21% e estão dentro das taxas relatadas na literatura em diversos estudos pelo mundo. Em pesquisas realizadas na Europa, China, África do Sul, Argentina e Brasil essas taxas variaram entre 26% e 76% (Viudes et al. 2002; Tortorano et al. 2004; Aquino et al. 2005; Rodero et al. 2005; Chang et al. 2008; Hinrichsen et al. 2008; Mondelli et al. 2008; Xavier et al. 2008; França et al. 2008; Basseti et al. 2013; Ma et al. 2013; Kreusch et al. 2013). *C. tropicalis* apresentou as maiores taxas de mortalidade com 38,46% dos casos, esses dados vão ao encontro dos dados relatados por Ma et al. 2013, que encontrou *C. tropicalis* com as maiores taxas de mortalidade na China (44,7%). *C. albicans* foi a espécie que apresentou a segunda maior taxa de mortalidade com 37,04% e as menores taxas de mortalidade foram nas infecções por *C. parapsilosis* com 5,88% de óbito.

## 6.2. Espécies Críticas do complexo *õpsilosisö*

As técnicas tradicionais de identificação utilizadas não são capazes de diferenciar as espécies críticas do complexo *õpsilosisö*. Elas são idênticas quanto a micromorfologia, macromorfologia, e testes bioquímicos de assimilação e metabolização de fontes de carbono, por isso é necessário a utilização de testes genotípicos para a diferenciação destas espécies.

Tavanti et al. (2005) identificaram diferenças significativas entre os genes COX3, L1A1, SADH e SYA1 pela técnica de MLST e propuseram que os subtipos antes conhecidos como II e III de *C. parapsilosis* fossem agrupadas em outras duas espécies. Foram assim identificadas como *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, respectivamente.

Pelo que se sabe, esse é o primeiro trabalho realizado com as espécies críticas de *C. parapsilosis* até o presente momento em toda região norte do Brasil. Foram analisados isolados, oriundos de nove hospitais diferentes da cidade de Manaus, tendo em vista que dois hospitais estudados não apresentaram casos positivos para *C. parapsilosis*. Dos 21 pacientes diferentes infectados apenas um era adulto e o hospital 05 foi o único que apresentou as 3 espécies do complexo.

Embora muitos trabalhos utilizem a amplificação e o sequenciamento das regiões ITS1 e ITS4 do gene 28S rRNA, como os realizados por Cantón et al. (2011) e Blanco-Blanco et al. (2013) foi optado pela técnica de PCR/RFLP para diferenciação das espécies críticas deste complexo, por se tratar de uma técnica mais barata e rápida. Lockhart et al. (2006) realizaram um estudo envolvendo essas espécies com isolados de 89 centros médicos distribuídos por 29 países. Foram confirmados como *C. parapsilosis* 91,3% dos isolados, seguido por *C. orthopsilosis* (6,1%) e *C. metapsilosis* (1,6%). Dados semelhantes foram encontrados no Brasil em trabalho realizado por Bonfietti et al. (2012), com isolados de cultura sanguínea coletados entre os anos de 1997 e 2011. Nesse estudo, *C. parapsilosis* foi confirmada em 90,8% dos casos, seguida por *C. orthopsilosis* com 8,6% e *C. metapsilosis*

com 0,6% dos casos. Em nosso trabalho foram encontrados dados que divergem dos encontrados por Lockhart et al. (2006) e Bonfietti et al. (2012). Em 22 isolados analisados provenientes de 21 pacientes diferentes, internados em 09 unidades hospitalares da cidade de Manaus, já que em duas não identificamos infecções por *C. parapsilosis*, foram confirmados como *C. parapsilosis* 81,18% dos casos seguidos por *C. orthopsilosis* com 13,64% dos casos e *C. metapsilosis* com 4,55% dos casos. Esses dados são semelhantes aos encontrados por Ruiz et al. (2013) que por meio da mesma técnica, confirmaram 83,7% dos isolados como *C. parapsilosis*, seguido por 10,2% de *C. orthopsilosis* e 6,1% de *C. metapsilosis*. Essa distribuição é importante de ser avaliada já que a resistência dessas espécies aos antifúngicos utilizados é maior em relação a *C. parapsilosis* (Lockhart et al. 2008; Silva et al. 2009; Cantón et al. 2011). As taxas de mortalidade envolvendo essas espécies são relativamente baixas, mas houve dois relatos de óbitos, um por *C. parapsilosis* e o outro por *C. orthopsilosis*. Esse é o segundo relato de óbito, no Brasil, após infecção por *C. orthopsilosis*, cujo primeiro foi relatado por Oliveira et al. (2013).

### **6.3. Diversidade genética de *Candida albicans* pela técnica de MLST**

As análises de MLST eram utilizadas somente para organismos haploides e seus genótipos eram determinadas como STs (Sequence Typing), posteriormente essas análises puderam ser feitas também para organismos diploides e esses genótipos passaram a ser determinados como DTSs (Diploid Sequence Typing). Atualmente, diversas espécies de *Candida* podem ser analisadas utilizando a técnica do MLST além de *C. albicans*, como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *Candida krusei*.

No entanto, a grande quantidade de cromatogramas a serem analisados pode abrir espaços a divergências (Da Matta, 2009). A observação da qualidade dos cromatogramas é fundamental para resolverem as dúvidas postas e sempre que as mesmas persistirem, novos

sequenciamentos devem ser realizados. Geralmente essas novas sequências resolvem as dúvidas e demonstram com clareza a base existente em determinada posição. É importante salientar que o achado de um mesmo DST entre dois isolados estudados não pode ser considerado como um indicativo de que as cepas são totalmente idênticas entre si, tendo em vista que são analisados, por meio desta técnica, aproximadamente 2800 nucleotídeos de *C. albicans* de um genótipo infinitamente maior e que pode manter diferenças em outros genes do organismo (Da Matta, 2009). Apenas o sequenciamento do genoma completo poderia nos dar essas respostas, no entanto, tal processo seria caro e inviável com os recursos que temos atualmente (Odds, Jacobsen, 2008).

No presente trabalho, foram analisados 35 isolados de *C. albicans* pela técnica de MLST provenientes de 29 pacientes, distribuídos em seis hospitais, tendo em vista que em cinco hospitais não foram encontrados isolados de *C. albicans*, de um total de 101 isolados, que representaram 35,64% de todos os isolados do presente trabalho.

Até janeiro de 2014 foram identificadas no site do MLST 2163 DSTs diferentes para *C. albicans*. Para o gene AAT1a foram identificadas 139 alelos, para o gene ACC1 89 alelos, para o gene ADP1 124 alelos, para o gene MP1b 127 alelos, para o gene SYA1 181 alelos, para o gene VPS13 248 alelos, e para o gene ZWF1b 233 alelos. No mapa de distribuição dos DSTs encontrados pelo mundo constam apenas os 39 isolados analisados por Odds et al. (2007) e os 25 DSTs encontrados naquele estudo, faltando acrescentar os dados encontrados por Da Matta et al. (2010) que elevaram esse quantitativo para mais de 100 isolados analisados e mais 32 DSTs identificados.

Esses dados quando comparados com os obtidos nesse estudo, demonstram que o gene ACC1 efetivamente é o mais preservado dos sete genes estudados, pois foi evidenciado apenas 5 alelos distintos para esse gene. O alelo mais presente, para esse gene, foi o 070 que foi encontrado em 16 dos 35 isolados analisados.

Os fragmentos utilizados foram os padronizados por Bougnoux et al. (2003), conforme Tabela 01. Foram encontrados 58 alelos diferentes, sendo um deles configurado como novo alelo. O novo alelo foi encontrado para o gene SYA1, que possuía 99% de similaridade com o alelo 6, no entanto, quando comparado com o mesmo ficou evidente a diferença na posição 314 que apresentou uma heterozigose A+G=R (Figura 07). É importante salientar que nenhum dos alelos depositados no banco de dados do MLST até o presente momento apresentaram heterozigose nesta posição, que era relatada como uma região totalmente preservada para esse gene. A identificação de apenas um novo alelo nesse trabalho pode ser justificado pela tese levantada por Odds e Jacobsen (2008), que sugerem que o número de alelos identificados vem diminuindo e que o natural é que novos DSTs sejam identificados apenas pela mudança das combinações existentes entre os alelos e não pela identificação de novos alelos.

Para cada um dos genes estudados foram encontrados de 05 a 10 alelos diferentes. O gene AAT1a foi o que apresentou o maior número de alelos distintos (10), seguido por ADP1, MP1B, SYA1 e VPS13, (9 alelos), e ZWF1b (8 alelos) e o ACC1 que apresentou a menor variação genética (5 alelos) encontrados (Tabela 07).

Nesse estudo foram identificados 25 DSTs, dos quais 10 já haviam sido previamente relatados e 15 consistiram em novos genótipos encontrados. O DST mais frequente foi o DST 90, tendo sido identificado em 9 isolados provenientes de 5 pacientes em 3 hospitais diferentes (Hospital 01, 07, 09). Dados divergentes foram encontrados por Da Matta et al. (2010) em estudo realizado no Brasil e Odds et al. (2007) que realizou o maior levantamento até a presente data com MLST para *C. albicans*. Em ambos os estudos foi identificado o DST 69 como o mais encontrado, sendo inclusive, considerado o fundador do maior grupo clonal de *C. albicans*. Esperava-se encontrar também o DST 69 nos isolados estudados nesse trabalho, tendo em vista que este se apresentou como o mais comum nos isolados estudados



no Brasil. Por outro lado, o DST 90 foi relatado por Da Matta (2010) em apenas um dos 74 isolados analisados em seu estudo, proveniente da cidade de São José do Rio Preto/SP. Esse genótipo também foi encontrado em estudos realizados com isolados da Malásia, África do Sul e Guiana Francesa.

O segundo genótipo mais encontrado foi o DST 298 que foi localizado em dois pacientes diferentes, mas internados no mesmo hospital e em um intervalo de tempo de dois meses, o que demonstra que esses isolados possuem a mesma origem clonal. É importante salientar que esse genótipo é diretamente relacionado com o DST 90 que foi o mais encontrado em nosso estudo. Eles são idênticos em seis genes e diferentes apenas no gene AAC1a, onde o DST 90 possui o alelo 25 e o DST 298 apresenta o alelo 24 para esse gene.

Por meio da análise do eBurst foi possível verificar que o hospital 09 foi o que apresentou os isolados de *C. albicans* com a maior proximidade ancestral entre os DSTs identificados. Dos sete isolados estudados, três foram identificados como DST 90, dois como DST 298 e um como DST 10013, todos pertencentes ao mesmo grupo. O DST 90 é o ancestral comum desse grupo e os outros dois DSTs encontrados variaram em apenas um alelo do ancestral comum. Nesse hospital o único DST distinto foi o DST 918, que se apresentou como um *singleton* no diagrama gerado pelo eBurst.

Já no hospital 01 foram observados os isolados de *C. albicans* com a maior variedade genética. Foram identificados DSTs dos 5 grupos identificados pelo eBurst, além de 3 *singletons*. Todos os isolados do grupo 3 e três isolados dos 4 DSTs identificados no grupo 2 foram desse mesmo hospital.

## 7.0. CONCLUSÕES

1. A incidência foi de 2,31 casos por 1000/internações e 0,61 casos por 1000/pacientes dia.
2. O gênero *Candida* foi o segundo maior causador de ICS nas 11 unidades estudadas, sendo superado apenas pelo gênero *Staphylococcus*.
3. A principal espécie causadora das candidemias no Amazonas é a *C. albicans* com, seguida por *C. tropicalis*.
4. As pessoas com candidemia por *Candida tropicalis* apresentaram as maiores taxas de mortalidade.
5. Os Hospitais 11 e 01 apresentaram taxas de incidência de 1,75 e 1,23 casos/1000 pacientes dia e 18,22 e 9,99 casos por 1000/internações, respectivamente, o que demonstra a necessidade de intervenção por parte da Comissão Estadual de Controle de Infecção Hospitalar.
6. Os casos foram mais prevalentes no sexo masculino do que no sexo feminino e as crianças foram mais acometidas do que os adultos.
7. *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* foram pela primeira vez relatados como causadores de candidemia em nossa região, tendo inclusive um óbito relacionada a primeira espécie.
8. A análise por MLST, identificou um grande número de DSTs nunca antes relatados para *C. albicans*, tendo sido o DST 90 o mais isolado na cidade de Manaus.
9. O DST 69 que é considerado o fundador do maior grupo clonal de *C. albicans* e é o mais relatado no Brasil e no mundo não foi encontrado em nosso trabalho.

## 8.0. REFERÊNCIAS

- ALASTRUEY IA, et al. Multilocus Sequence Typing of *Candida albicans* isolates from candidemia and superficial candidiasis in Israel. *Med Mycol* 2013. p. 755-758.
- ASMUNDSOTTIR LR, et al. Nationwide study of candidemia, antifungal use, and antifungal drug resistance in Iceland, 2000 to 2011. *J Clin Microbiol*, 2013. p. 841-848.
- ALENJO MC, et al. Perfil epidemiológico de la candidiasis invasora en unidades de pacientes críticos en un hospital universitario. *Rev Chil Infect*, 2011. 28:118-122.
- ANVISA. Detecção e identificação dos fungos de importância médica. Módulo VII, 2004.
- AQUINO VR, et al. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in Southern Brazil. *Braz J Infect Dis*, 2005. 9: 411-418.
- ARJUNA NB, et al. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *The Journal of microbiology*, 2005. Vol 43, p. 65-84.
- BARNETT JA; PAYNE RW, YARROW D. *Yeast: Characteristics and identification*. 3rd ed. Cambridge University Press, 2000.
- DE BARROS JD et al. *Kodamaea (Pichia) ohmeri* fungemia in a pediatric patient admitted in a public hospital. *Med Mycol*, 2009. Nov;47(7):775-9. doi: 10.3109/13693780902980467.
- BASSETTI, M, et al. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain. *J Clin Microbiology*, 2013. p. 4167-72.
- BLANCO-BLANCO MT, et al. *Candida orthopsilosis* fungemias in a Spanish tertiary care hospital: incidence, epidemiology and antifungal susceptibility. *Rev Iberoam Micol*, 2013.
- BONFIETTI LX et al. Prevalence, distribution and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* bloodstream isolates. *J Med Microbiol*, 2012. doi: 10.1099/jmm.0.037812-0.
- BOUGNOUX ME; MORAND S; DÆNFERT C. Usefulness of Multilocus Sequence Typing for Characterization of Clinical Isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*, 2002. p. 1290-1297.
- BOUGNOUX ME; TAVANTI A et al. Collaborative Consensus for optimized Multilocus Sequence Typing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*, 2003. v. 41, p. 5265-5266.
- CAJOTO IV; OTERO LR; CASAL MA. Fungemia por *Candida rugosa*: un nuevo caso de infección emergente. *Rev Chil Infect*, 2010. 27: 87-88.

CALDERONE RA; FONZI WA. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends in Microbiol, 2001. v.9 p. 327-35.

CANTÓN E, et al. Prospective Multicenter Study of the Epidemiology, Molecular Identification, and Antifungal Susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* Isolated from Patients with Candidemia. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011. Vol 55, p. 5590-5596.

CHAKRABARTI A, et al. Epidemiological study of a large cluster of fungaemia cases due to *Kodamaea ohmeri* in an indian tertiary care centre. Clin Microbiol Infect, 2014. Feb;20(2):O83-9. doi: 10.1111/1469-0691.12337

CHANG MR, et al. *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo, 2008. 50: 265-268.

CHEGUIRIÁN ML, et al. Prevalencia de microorganismos causantes de bacteremias y fungemias en pacientes oncológicos pediátricos: Patrones de sensibilidad a los antimicrobianos. Rev Argent Microbiol, 2008. 40: 111-115.

COLOMBO AL, et al. Brazilian Network Candidemia Study. Epidemiology of candidemia in Brazil: a Nationwide sentinela surveillance of candidemia in eleven medical centers. J Clin Microbiol, 2006. 44: 2816-2823.

DA MATTA DA, et al. Candidemia Surveillance in Brazil: Evidence for Geographical Boundary Defining an Area Exhibiting an Abatement of Infections By *Candida albicans*, Group 2 Strains. J Clin Microbiol, 2010. 48: 3062-3067.

DA SILVA, et al. Fungemia by *Candida pelliculosa* (*Pichia anomala*) in a neonatal intensive care unit: a possible clonal origin. Mycopathologia, 2013. p. 175-9.

ERICSSON J, et al. Candidaemia in Sweden: a Nationwide prospective observational survey. Clin Microbiol Infect, 2013. Vol 19 p. 218-221.

FRANÇA JC; RIBEIRO CE; QUEIROZ-TELLES F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. Rev Soc Bras Med Trop, 2008. 41: 23-28.

FURLANETO MC, et al. Species distribution and in vitro fluconazole susceptibility of clinical *Candida* isolates in a Brazilian tertiary-care hospital over 3-year period. Rev Soc Bras Med Trop, 2011. 44: 595- 599.

GIOLO MP; SVIDZINSKI TIE. Fisopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. J Bras Patol Med Lab, 2010. v.46 (3): 225-234.

HINRICHSEN SL, et al. *Candida* isolates in tertiary hospitals in northeastern Brazil. Bras J of Microbiology, 2009. 40: 325-328.

HINRICHSEN SL, et al. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. Rev Soc Bras Med Trop, 2008. 41: 394-398

IBRAHIN AS, et al. Evidence Implicating Phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. Infect Immun, 2007. p. 120-8.

KREUSCH A, KARSTAEDT AS, Candidemia among adults in Soweto, South Africa, 1990-2007. International Journal of Infectious Diseases, 2013. p. 621-623.

LACAZ CS, et al. Tratado de Micologia Médica Lacaz. São Paulo. 9 ed. Editora Sarvier, 2002. p. 123-173

LEAN SN, et al. Identification of Medically Important Yeast Species by Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Regions. J Clin Microbiol. 2006 March; 44(3): 693-699. doi: [10.1128/JCM.44.3.693-699.2006](https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.693-699.2006)

LOCKHART SR, et al. Geographic Distribution and Antifungal Susceptibility of the Newly Described Species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the Closely Related Species *Candida Parapsilosis*. Journal of Clinical Microbiology, 2008. 2659-2664.

LOTT TJ; FRADE JP; LOCKHART SR. Multilocus Sequence Type Analysis Reveals both Clonality and Recombination in Populations of *Candida glabrata* Bloodstream Isolates from U.S Surveillance Studies. Eukaryotic Cell, 2010. p 619 ó 625.

LYON JP, et al. *Candida albicans*: genotyping methods and clade related phenotypic characteristics. Braz J Microbiol, 2010. v. 41: 841-849.

MA CF, et al. Surveillance study of species distribution, antifungal susceptibility and mortality of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in China. BMC Infect Dis, 2013, Jul 22;13:337

McMANAUS BA, et al. Multilocus sequence typing reveals that the population structure of *Candida dubliniensis* is significantly less divergent than that of *Candida albicans*. J Clin Microbiol, 2008. Feb; 46(2):652-654

MAIDEN MC, et al. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci USA, 1998. 95: 3140-3145

MAKIMURA K; MURAYAMA SY; YAMAGUCHI H. Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. J Med Microbiol, 1994. v.40 p 358-354.

MARCHETTI O, et al. Epidemiology of Candidemia in Swiss Tertiary Care Hospitals: Secular Trends, 1991-2000. Clin Infect Dis, 2004. p. 311-320

MARTIN SG, et al. The Epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med 2003, 348: 1546-1554.

MEYER E, et al. No increase in primary nosocomial candidemia in 682 German intensive care units during 2006 to 2011. Euro Surveill 2013. p. 01-08.

MONDELLI AL, et al. Candidemia in a Brazilian tertiary hospital: microbiological and clinical features over a six year period. *The J of Venomous animals and Toxins Including Trop diseases*, 2012. 18: 244-252.

MOTTA AL, et al. Candidemia Epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. *Braz J Infect Dis*, 2010. 14: 441-448.

MORETTI ML, et al. Is the incidence of candidemia caused by *Candida glabrata* increasing in Brazil? Five-year surveillance of *Candida* bloodstream infection in a university reference hospital in southeast Brazil. *Med Mycol*, 2013. p. 225-30.

NUCCI M, et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One*, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0059373.

ODDS FC, et al. Molecular phylogenetics of *Candida* species. *Eukaryot Cell*, 2007. Jun; 6(6):1041-1052.

ODDS FC; JACOBSEN MD. Multilocus sequence typing of pathogenic *Candida* species. *Eukaryot Cell*, 2008. 7:1075-1084.

OSTRONOFF F, et al. *Pichia ohmeri* fungemia in a hematologic patient: an emerging human pathogen. *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 1949-1951.

OLIVEIRA VKP, et al. Candidemia and death by *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in neonates and children. *Pediatrics and Neonatology*, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pedneo.2013.07.006>.

PAGE, RD TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal. *Comput appl Biosci*, 1996; 12: 357-358.

PARAHYN AM, et al. Candidiasis in pediatric patients with cancer interned in a university hospital. *Braz J Microbiol*, 2009. 40: 321-324.

PEMÁN J, et al. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother*, 2012. 67: 1181-1187.

RICHET H, et al. Candidemia in French Hospitals: Incidence Rates and Characteristics. *Clin Microbiol Infect*, 2002. p. 405-12

RODERO L, et al. Estudio Multicentrico de fungemias por levaduras em la República Argentina. *Rev Arg Microbiologia*, 2005. 37: 189-195.

RODRIGUES APF, et al. Infecciones fúngicas emergentes: fungemia por *Sporobolomyces salmonicolor*. Reporte de un caso. *Infectio*, 2010. 14: 193-196.

RUIZ LS, et al. Candidemia by species of the *Candida parapsilosis* complex in children's hospital: prevalence, biofilm production and antifungal susceptibility. *Mycopathologia*, 2013. p. 231-239.

SANDVEN P, et al. Candidemia in Norway (1991 to 2003): Results from a Nationwide Study. J Clin Microbiol, 2006. p. 1977-1981.

SANTINO I, et al. *Kodamaea ohmeri* isolate from two immunocompromised patients: first report in Italy. Mycoses, 2013 Mar;56(2):179-81. doi: 10.1111/j.1439-0507.2012.02232

SIDRIM, JJC; ROCHA MFG. Micologia médica a luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2004. p. 21, 266.

SILVA AP, et al. Prevalence, Distribution, and Antifungal Susceptibility Profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary Care Hospital. J Clin Microbiol, 2009. v. 47(8) p. 2392-2397.

SULIVAN DJ, et al. *Candida dubliniensis* sp. nov., phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidiasis in HIV ó Infected individuals. Microbiology, 1995. 141: 1507-21

TAVANTI A, et al. Optimization and validation of multilocus sequence typing for *Candida albicans*. J Clin Microbiol, 2003. Vol 41(8):3765-76

TAVANTI A, et al. Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. J Clin Microbiol, 2007; 45: 145561462.

TAVANTI A, et al. Population Structure and Properties of *Candida albicans*, as Determined by Multilocus Sequence Typing. J Clin Microbiol, 2005. v.43, p. 5601-5613.

TAVANTI et al. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. J Clin Microbiol, 2005. p. 284-292.

TORO et al. Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. Clinical Microbiology and Infection, 2011. Vol17, p. 4186424.

TORTORANO et al. Epidemiology of Candidaemia in Europe: Results of 28-Month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Hospital-Based Surveillance Study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2004. 23: 317-322.

VIUDES A, et al. Candidemia at a tertiary care hospital: Epidemiology, Treatment, Clinical Outcome and Risk Factors for Death. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2002. 21: 767-774.

WU Y, et al. Analysis of the clonality of *Candida tropicalis* strains from a general hospital in Beijing using Multilocus Sequence Typing. Plos, 2012. v.7 p. 1-8

XAVIER PC, et al. Neonatal candidemia in a public hospital in Mato Grosso do Sul. Rev Soc Bras Med Trop, 2008. 41: 459-463.

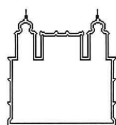
XIAO, YL et al. Multilocus sequence typing of *Candida albicans* bloodstream isolates in an intensive care unit. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2012. Sep; 43(5):697-701.

ZAOUTIS TE, et al. The Epidemiology and Attributable Outcomes of Candidemia in Adults and Children Hospitalized in the United States: A Propensity Analysis. *Clin Infect Dis*, 2005. 1232-



## 9.0 ANEXOS

### ANEXO 01



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Leônidas e Maria Deane

#### CARTA DE AUTORIZAÇÃO

Ao Dr. Marcus Luiz Barroso Barros  
Presidente da CCIH - UNIMED Manaus

Vimos solicitar autorização para utilizar as leveduras *Candida* isoladas de hemoculturas e uroculturas de pessoas internadas no Hospital Geral e Maternidade da UNIMED no período de janeiro a dezembro de 2013 e ter acesso as informações dos pacientes com candidemia que consentirem fazer parte do estudo após a apresentação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A utilização das amostras e o acesso as informações solicitadas são fundamentais para a realização do Projeto de Pesquisa “**Estudo epidemiológico e molecular de *Candida* causadoras de candidemias em pessoas internadas em Unidades Hospitalares de Manaus - AM**”. Informo ainda que esse trabalho será desenvolvido por mestrandos do Programa Multiinstitucional de Pós-graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia da UFAM, ILMDFIOCRUZ e UFPA em parceria com a CECIHA- Comissão Estadual de Controle de Infecção do Estado do Amazonas.

  
Ani Beatriz Jackisch Matsuura  
Coordenadora/Orientadora

Inst. Leônidas e Maria Deane/FIOCRUZ  
Pesquisadora  
Siape 1218680

Manaus, 19 de dezembro de 2012.

#### AUTORIZAÇÃO

O Presidente da CCIH - UNIMED Manaus, no uso de suas atribuições, autoriza a utilização das amostras de *Candida* isoladas de hemoculturas e uroculturas de pessoas internadas no período de janeiro a dezembro de 2013 e permite o acesso as informações dos pacientes com candidemia que consentirem fazer parte da pesquisa intitulada “**Estudo epidemiológico e molecular de *Candida* causadoras de candidemias em pessoas internadas em Unidades Hospitalares de Manaus-AM**”, sob coordenação da Pesquisadora Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura.

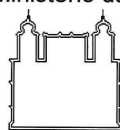
  
Dr. Marcus Luiz Barroso Barros  
Presidente da CCIH UNIMED Manaus

  
UNIMED MANAUS  
Dr. Marcus Luiz Barroso Barros  
Coordenador da CCIH

Manaus, 20/12/2012

## ANEXO 02

Ministério da Saúde



Isiswaldo Cruz

Leônidas e Maria Deane

## CARTA DE AUTORIZAÇÃO

À V. Ex<sup>a</sup>. Sr. Wilson Duarte Alecrim  
Secretário de Estado da Saúde do Amazonas

Vimos solicitar autorização para utilizar as leveduras *Candida* isoladas de hemoculturas e uroculturas de pessoas internadas em Unidades de Saúde do Estado do Amazonas no período de janeiro a dezembro de 2013 e ter acesso as informações dos pacientes com candidemia que consentirem a fazer parte do estudo após a apresentação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A utilização das amostras e o acesso as informações solicitadas são fundamentais para a realização do Projeto de Pesquisa "**Estudo epidemiológico e molecular de *Candida* causadoras de candidemias em pessoas internadas em Unidades Hospitalares de Manaus - AM**". Um Plano de Trabalho sucinto está em anexo para vossa ciência. Informo ainda que esse trabalho será desenvolvido por mestrandos do Programa Multiinstitucional de Pós-graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia da UFAM, ILMD/FIOCRUZ e UFPA em parceria com a CECIHA- Comissão Estadual de Controle de Infecção do Estado do Amazonas.

*Ani Beatriz Jackisch Matsuura*  
Ani Beatriz Jackisch Matsuura  
Coordenadora/Orientadora

Ani Beatriz Jackisch Matsuura  
Inst. Leônidas e Maria Deane/FIOCRUZ  
Pesquisadora  
Siape 1218580

Manaus, 21 de novembro de 2012.

## AUTORIZAÇÃO

O Secretário de Estado da Saúde do Amazonas, no uso de suas atribuições, autoriza a utilização das amostras de *Candida* isoladas de hemoculturas e uroculturas de pessoas internadas em Unidades de Saúde do Estado do Amazonas no período de janeiro a dezembro de 2013 e permite o acesso as informações dos pacientes com candidemia que consentirem a fazer parte da pesquisa intitulada "**Estudo epidemiológico e molecular de *Candida* causadoras de candidemias em pessoas internadas em Unidades Hospitalares de Manaus-AM**", sob coordenação da Pesquisadora Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura.

Secretário de Estado da Saúde do Amazonas  
**Wilson Duarte Alecrim**

Manaus, 12/12/2012

Rua Teresina, 476 - Adrianópolis, CEP 69.057-070 – Manaus/AM  
Tel: (092) 3621-2337 / Fax (092) 3621-2377  
<http://www.amazonia.fiocruz.br>

## ANEXO 03



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E MOLECULAR DE CANDIDA CAUSADORAS DE CANDIDEMIAS EM PESSOAS INTERNADAS EM UNIDADES HOSPITALARES DE MANAUS - AM

**Pesquisador:** ANI BEATRIZ JACKISCH MATSUURA

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 12200612.3.0000.5020

**Instituição Proponente:** CENTRO DE PESQUISAS LEONIDAS E MARIA DEANE - FUNDACAO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 201.289

**Data da Relatoria:** 20/02/2013

**Apresentação do Projeto:**

Este trabalho tem como objetivo verificar a incidência de fungemias causadas por *Candida* em oito Unidades Hospitalares de Manaus (públicas e privada), bem como determinar a diversidade genética entre as espécies de *Candida* isoladas das hemoculturas pela técnica de tipagem molecular por sequenciamento de multilocus (MLST) para traçar um perfil epidemiológico; determinar os fatores de risco associados e o perfil das pessoas acometidas pelas candidemias e verificar os fatores de virulência e a suscetibilidade das cepas de *Candida* a antifúngicos. Para a realização desse trabalho serão utilizadas amostras coletadas no ICAM, Maternidade Azilda Marreiro, Hospital Pronto Socorro João Lúcio, Hospital Pronto Socorro Infantil João Lúcio, Pronto Socorro Infantil da Zona Oeste, Pronto Socorro Infantil da Zona Sul, Hospital Platão Araújo e o Hospital Geral e Maternidade da UNIMED. As amostras de *Candida* utilizadas serão aquelas previamente isoladas de hemoculturas pelo Laboratório terceirizado no período de 12 meses. Informações sobre os pacientes serão levantados junto ao SAME de cada uma das unidades para que possa ser traçado o perfil epidemiológico. Cada cepa de *Candida* será avaliada quanto à suscetibilidade ou

resistência a antifúngicos, avaliação dos fatores de virulência e caracterizada por meio da técnica molecular MLST (Multi Locus Sequence Typing). Para isso as cepas serão seqüenciadas e analisados 6 ou 7 genes conservados, sendo assim possível realizar inferências sobre a proximidade evolutiva

**Endereço:** Rua Teresina, 4950  
**Bairro:** Adrianópolis **CEP:** 69.057-070  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (02)3305-5130 **Fax:** (02)3305-5130 **E-mail:** cep@ufam.edu.br



das diferentes cepas. Esse trabalho trará maiores informações para a compreensão da dinâmica dessas leveduras na população e para monitoramento da emergência de cepas resistentes a antifúngicos tendo impacto sobre a gestão de infecções por *Candida* e contribuindo com informações para a Comissão Estadual de Controle de Infecção Hospitalar.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Realizar um estudo epidemiológico e molecular de *Candida* causadoras de candidemias em pessoas internadas em Unidades Hospitalares de Manaus - AM.

Objetivo Secundário:

- 1) Verificar a incidência de fungemias causadas por *Candida* nas oito Unidades Hospitalares de Manaus incluídas no estudo;
- 2) Determinar a diversidade genética entre as espécies de *Candida* isoladas das hemoculturas pela técnica de tipagem molecular por sequenciamento de multilocus (MLST) para traçar um perfil epidemiológico;
- 3) Determinar os fatores de risco associados e o perfil das pessoas acometidas pelas candidemias;
- 4) Identificar espécies crípticas entre cepas de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* provenientes das hemoculturas;
- 5) Verificar os fatores de virulência e a suscetibilidade das cepas de *Candida* a antifúngicos.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Riscos: Nesta pesquisa serão utilizadas as leveduras provenientes de pacientes com candidemia previamente isoladas das hemoculturas demandadas pelas Unidades Hospitalares e feitas rotineiramente por um laboratório terceirizado. Ou seja, não será necessária uma nova coleta, trabalharemos com o material previamente coletado de acordo com a necessidade do paciente. O paciente será abordado para assinatura do TCLE após conhecimento do resultado da cultura pelo médico assistente e ter sido consultado por este sobre a aceitação em participar da pesquisa. E, qualquer risco inerente a este projeto será minimizado pelo pesquisador.

Endereço:	Rua Teresina, 4950	CEP:	69.057-070
Bairro:	Adrianópolis		
UF:	AM	Município:	MANAUS
Telefone:	(92)3305-5130	Fax:	(92)3305-5130
		E-mail:	cep@ufam.edu.br



**Benefícios:**

**Benefícios:** Esse trabalho trará maiores informações para a compreensão da dinâmica de *Candida* na população e para monitoramento da emergência de cepas resistentes a antifúngicos tendo impacto sobre a gestão de infecções por essa levedura e contribuindo com informações para a Comissão Estadual de Controle de Infecção Hospitalar esperando levar a ações para a diminuição da prevalência da Candidemia.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de um estudo transversal, descritivo e observacional.

Para a realização desse trabalho serão utilizadas amostras coletadas nas seguintes unidades públicas de saúde de Manaus: ICAM, Maternidade Azilda Marreiro, Hospital Pronto Socorro João Lúcio, Hospital Pronto Socorro Infantil João Lúcio, Pronto Socorro Infantil da Zona Oeste, Pronto Socorro Infantil da Zona Sul, Hospital Platão Araújo e o hospital particular Hospital Geral e Maternidade da UNIMED.

As amostras de *Candida* utilizadas serão aquelas previamente isoladas de hemoculturas pelo Laboratório terceirizado no período de 1 ano. Todas as vezes que for reportado um caso positivo para *Candida* o paciente ou responsável será procurado, a fim de que seja autorizado o uso da cepa isolada. Informações sobre os pacientes serão levantadas junto ao SAME de cada uma das unidades para que possa ser traçado o perfil epidemiológico. Cada cepa de *Candida* será avaliada quanto a susceptibilidade ou resistência a antifúngicos, avaliação dos fatores de virulência e caracterizada por meio da técnica molecular MLST (Multi Locus Sequence Typing). Para isso as cepas serão seqüenciadas e analisados 6 ou 7 genes conservados, sendo assim possível realizar inferências sobre a proximidade evolutiva das diferentes cepas.

As hemoculturas demandadas por todas as Unidades Hospitalares em questão são feitas rotineiramente por um laboratório terceirizado de onde as amostras de *Candida* serão obtidas.

**Critérios de inclusão e exclusão** Serão incluídos todos os pacientes que possuírem pelo menos uma hemocultura positiva e que possuam sinais e sintomas da infecção. Um mesmo paciente será considerado como novo caso se houver uma nova hemocultura positiva após 30 dias do primeiro caso detectado.

Serão excluídos do presente estudo todos os pacientes que tiverem hemoculturas positivas para *Candida* e que não apresentem sinais e sintomas de Candidemia, além daqueles que não autorizarem o uso de suas amostras.

Endereço: Rua Teresina, 4950  
 Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070  
 UF: AM Município: MANAUS  
 Telefone: (92)3305-5130 Fax: (92)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br



**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Protocolo de Pesquisa apresentado por ANI BEATRIZ JACKISCH MATSUURA (equipe: Felipe Gomes Naveca, MARCELO AUGUSTO DA EIRA CORREA, VIVIAN DO NASCIMENTO PEREIRA, Stefane Reis Peira. Pesquisa pertence ao grupo III, área do conhecimento (Ciências Biológicas - Ciências da Saúde), fora das áreas temáticas especiais. A folha de rosto está assinada pela pesquisadora Responsável e pelo representante da instituição proponente Júlio César Schweickardt (Diretor Substituto - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ/Instituto Leônidas e Maria Deane). Consta também projeto de pesquisa completo, cronograma com início da coleta de dados iniciado em 15 de janeiro de 2013 com término previsto para 30 de dezembro de 2013. O orçamento é de R\$ 15.700,00 (Financiamento Próprio). Apresentado TCLE para os participantes adultos e os responsáveis pelos menores. A Os termos de anuência da Secretaria Estadual de Saúde e do Hospital Unimed Manaus. A abordagem aos participantes será feita após os mesmos saberem dos resultados por seus médicos assistentes e o convite para participar da pesquisa será feita por esse profissional, quanto então será apresentado o TCLE.

**Recomendações:**

O Protocolo de Pesquisa apresentado por ANI BEATRIZ JACKISCH MATSUURA, pesquisadora da FIOCRUZ, encontra-se completo, no entanto encontra-se com restrições METODOLÓGICAS QUANTO AOS RISCOS. Nos riscos: Os pesquisadores devem abordar os participantes da pesquisa de maneira que não cause constrangimento. Recomenda-se que primeiro ele (O PARTICIPANTE) saiba do resultado da cultura pelo médico assistente e que o mesmo pergunte se ele aceitaria em participar da pesquisa, quanto só então seria feita a abordagem para assinatura do TCLE.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O Protocolo de Pesquisa apresentado por ANI BEATRIZ JACKISCH MATSUURA, pesquisadora da FIOCRUZ, encontra-se completo, encontrava-se com restrições METODOLÓGICAS QUANTO AOS RISCOS. Essas pendências foram adequadamente atendidas e recomendamos que o protocolo seja aprovado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço:	Rua Teresina, 4950	CEP:	69.057-070
Bairro:	Adrianópolis		
UF:	AM	Município:	MANAUS
Telefone:	(92)3305-5130	Fax:	(92)3305-5130
		E-mail:	cep@ufam.edu.br



Considerações Finais a critério do CEP:

MANAUS, 20 de Fevereiro de 2013

---

Assinador por:  
Pedro Rodolfo Fernandes da Silva  
(Coordenador)

Endereço: Rua Teresina, 4950  
Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)3305-5130 Fax: (92)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br

## ANEXO 04

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa **Estudo epidemiológico e molecular de *Candida* causadoras de candidemias em pessoas internadas em Unidades Hospitalares de Manaus - AM**, sob a responsabilidade da pesquisadora ANI BEATRIZ JACKISCH MATSUURA, a qual pretende conhecer quais as leveduras *Candida* que são as maiores causadoras da infecção do sangue (candidemia) em pessoas internadas em Unidades Hospitalares de Manaus, bem como conhecer as diferenças destas geneticamente, a resistência ou não aos antifúngicos, o que as torna mais virulentas do que outras e quais os fatores de risco para a pessoa apresentar uma candidemia.

Sua participação é voluntária e se dará por meio da utilização das leveduras isoladas a partir do sangue coletado pelo hospital, não sendo necessária uma nova coleta, ou seja, trabalharemos com o material previamente coletado de acordo com a necessidade do paciente. Essas leveduras serão preservadas e colocadas na Coleção Biológica do ILMD/Fiocruz para que todos os estudos possam ser feitos com as amostras já isoladas. Se você aceitar participar, estará contribuindo para obter dados para auxiliar no tratamento e na prevenção das candidemias. Informamos ainda, que os riscos inerentes que houverem neste projeto serão minimizados pelos pesquisadores.

Se depois de consentir em sua participação o Sr(a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com a pesquisadora no endereço Rua Teresina, 476, Adrianópolis, Manaus/AM, pelo telefone (92) 3621-2337, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa . CEP/UFAM, na Rua Teresina, 495, Adrianópolis, Manaus-AM, telefone (92) 3305-5130.

#### Consentimento Pós-Infomação

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Assinatura do participante ou responsável



Impressão do dedo polegar

Caso não saiba assinar

\_\_\_\_\_ Assinatura do Pesquisador Responsável



## ANEXO 05

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o(a) seu(sua) filho(a) para participar da Pesquisa **Estudo epidemiológico e molecular de *Candida* causadoras de candidemias em pessoas internadas em Unidades Hospitalares de Manaus - AMI**, sob a responsabilidade da pesquisadora ANI BEATRIZ JACKISCH MATSUURA, a qual pretende conhecer quais as leveduras *Candida* que são as maiores causadoras da infecção do sangue (candidemia) em pessoas internadas em Unidades Hospitalares de Manaus, bem como conhecer as diferenças destas geneticamente, a resistência ou não aos antifúngicos, o que as torna mais virulentas do que outras e quais os fatores de risco para a pessoa apresentar uma candidemia.

A participação do(a) seu(sua) filho(a) é voluntária e se dará por meio da utilização das leveduras isoladas a partir do sangue coletado pelo hospital, não sendo necessária uma nova coleta, ou seja, trabalharemos com o material previamente coletado de acordo com a necessidade do paciente. Essas leveduras serão preservadas e colocadas na Coleção Biológica do ILMD/Fiocruz para que todos os estudos possam ser feitos com as amostras já isoladas. Se for aceitar participar, estará contribuindo para obter dados para auxiliar no tratamento e na prevenção das candidemias. Informamos ainda, que os riscos inerentes que houverem neste projeto serão minimizados pelos pesquisadores.

Se depois de consentir na participação do(a) seu(sua) filho(a) e desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo para seu(sua) filho. Seu(sua) filho(a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas a identidade do(a) seu(sua) filho(a) não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com a pesquisadora no endereço Rua Teresina, 476, Adrianópolis, Manaus/AM, pelo telefone (92) 3621-2337, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa . CEP/UFAM, na Rua Teresina, 495, Adrianópolis, Manaus-AM, telefone (92) 3305-5130.

#### Consentimento Pós-~~Informação~~Informação

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado sobre o que a pesquisadora quer fazer e porque precisa da colaboração do(a) meu(minha) filho(a), e entendi a explicação. Por isso, eu concordo na participação do(a) meu(minha) filho(a) no projeto, sabendo que ele(a) não vai ganhar nada e que poderá sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Assinatura do responsável



Impressão do dedo polegar

Caso não saiba assinar

\_\_\_\_\_ Assinatura do Pesquisador Responsável

## ANEXO 06

### Purificação com PEG

1. Transfira o volume da PCR para tubo de 1,5mL e adicione o mesmo volume de PEG a 20%;
2. Agite suavemente em vórtex por 10 segundos e incube a 37°C por 15 minutos;
3. Após incubação centrifugue a 2500 RCF (6000 rpm) por 15 minutos a temperatura ambiente;
4. Descarte o sobrenadante e adicione 125 µL de etanol 80% gelado e em seguida centrifugue a 1450 RCF (4500 rpm) por 2 minutos;
5. Descarte o sobrenadante (Com cuidado, pois o pallet estará na parede do *ependorf*) e deixe secando a 37°C por 15 minutos (ou 60°C por 10 minutos) para a remoção de resíduos de etanol (Não desvira o tubo, mantendo virado para baixo);
6. Certifique a ausência de resíduos de etanol e adicione água livre de nuclease, sendo adicionado o mesmo volume de PCR;
7. Agite em vórtex por 10 segundos e armazene a amostra a -20°C.

## ANEXO 07

### Purificação da reação de sequenciamento

1. Remova a placa do termociclador e centrifugue por 1 minuto a 2000 RCF;
2. Adicione quantidades iguais de EDTA 125 mM e acetato de sódio 3M (pH 5,2) necessárias para a quantidade de poços utilizados na placa e pipete 2  $\mu$ L dessa solução em cada poço;

*Obs: tenha certeza que esta solução foi adicionada em todos os poços;*

3. Adicionar 25  $\mu$ L de EtOH 100% gelado em cada um dos poços;

*Obs: homogeneizar a placa em movimentos de cima para baixo;*

4. Sele a placa com Strips e misture por inversão (4X);

5. Incube por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz;

*Obs: Cobrir com papel alumínio*

6. Centrifugue a 2000 RCF por 45 minutos;

*Obs: IMPORTANTE - o próximo passo deve ser feito imediatamente. Se não for possível, então faça um spin da placa por mais 2 minutos antes de recomeçar.*

7. Inverta a placa e faça um Spin até 180 RCF por 1 minuto, removendo em seguida a placa da centrifuga;

*Obs: antes de inverter a placa, despreze o conteúdo na pia junto com uma leve batida na mesa. Após essa centrifugação, programá-la para a temperatura de 4<sup>0</sup>C;*

8. Adicione 35  $\mu$ L de EtOH a 70<sup>0</sup>C em cada um dos poços;

9. Centrifugue a 15 minutos à 4<sup>0</sup>C e 1650 RCF;

*Obs: caso tenha esquecido a programação a 4<sup>0</sup>C, adicione o FAST temperatura;*

10. Inverta a placa e faça um spin até 180 RCF por 1 minuto, removendo em seguida a placa da centrifuga

*Obs: Comece a contar o tempo assim que o rotor começar a se mover;*

11. Incube a placa a 52<sup>0</sup>C por 15 minuto, cobrir com papel alumínio (Termociclador)
12. Se não for colocar no sequenciador imediatamente, congele a placa seca ao abrigo da luz;
13. No momento de sequenciar ressuspender com 10 µL de formamida Hi-Di levando a placa ao agitador (Vortex) de placa seguido de um Spin;
14. Aqueça a placa 95<sup>0</sup>C por 1 minuto (no termociclador), monte e coloque no sequenciador

**ANEXO 08**

Isolados, idade, gênero, hospital, espécie isolada e desfecho de todos os pacientes das 11 unidades hospitalares estudadas no ano de 2013.

Isolado	Idade	Gênero	Hospital	Espécie	Desfecho
CMS01	12a	M	1	<i>Candida albicans</i>	A
CMS02	2m	F	1	<i>Candida albicans</i>	O
CMS03	1m	M	1	<i>Candida albicans</i>	A
CMS04	1a	F	1	<i>Candida tropicalis</i>	A
CMS05	88a	F	6	<i>Candida tropicalis</i>	A
CMS06	2a	M	5	<i>Candida albicans</i>	O
CMS08	2m	F	1	<i>Candida albicans</i>	O
CMS09	13a	M	8	<i>Candida tropicalis</i>	O
CMS10	1a	F	7	<i>Candida albicans</i>	O
CMS11	1a	F	9	<i>Candida parapsilosis</i>	A
CMS12	13a	M	8	<i>Candida tropicalis</i>	O
CMS13	1m	F	5	<i>Candida parapsilosis</i>	A
CMS14	1m	F	5	<i>Candida parapsilosis</i>	A
CMS15	11m	F	1	<i>Candida albicans</i>	O
CMS16	1m	M	2	<i>Candida parapsilosis</i>	A
CMS17	3a	F	9	<i>Candida guilliermondii</i>	A
CMS18	7m	M	4	<i>Candida tropicalis</i>	A
CMS19	1m	M	1	<i>Candida parapsilosis</i>	A
CMS20	1m	M	1	<i>Candida parapsilosis</i>	A
CMS21	1m	M	1	<i>Candida tropicalis</i>	A
CMS22	2m	M	3	<i>Candida haemulonii</i>	A
CMS23	1a	F	7	<i>Candida albicans</i>	A
CMS24	6m	M	7	<i>Candida albicans</i>	A
CMS25	1a	F	9	<i>Candida albicans</i>	A
CMS26	5m	M	1	<i>Candida tropicalis</i>	O
CMS27	1a	M	5	<i>Candida albicans</i>	O
CMS28	2a	M	7	<i>Candida albicans</i>	A
CMS29	1m	M	1	<i>Candida albicans</i>	A
CMS30	64a	F	4	<i>Candida tropicalis</i>	A
CMS31	6m	M	1	<i>Candida albicans</i>	A
CMS32	9a	F	9	<i>Candida parapsilosis</i>	A
CMS33	1m	M	1	<i>Candida albicans</i>	A
CMS34	89a	M	6	<i>Candida glabrata</i>	A
CMS35	1a	M	5	<i>Candida albicans</i>	A
CMS36	1m	M	1	<i>Candida tropicalis</i>	O
CMS37	11a	M	7	<i>Candida tropicalis</i>	O
CMS38	1m	M	1	<i>Candida tropicalis</i>	A
CMS39	10m	M	2	<i>Candida orthopsilosis</i>	O
CMS40	1a	M	7	<i>Candida albicans</i>	A
CMS41	1m	M	1	<i>Candida haemulonii</i>	O
CMS42	1m	M	1	<i>Candida tropicalis</i>	O
CMS43	0	M	1	<i>Candida parapsilosis</i>	A

## Continuação

Isolado	Idade	Gênero	Hospital	Espécie	Desfecho
CMS44	2m	M	8	<i>Candida parapsilosis</i>	A
CMS45	0	M	10	<i>Candida sp</i>	A
CMS46	0	M	1	<i>Candida tropicalis</i>	O
CMS47	0	M	10	<i>Candida sp</i>	A
CMS48	38a	F	6	<i>Candida parapsilosis</i>	A
CMS49	1m	M	9	<i>Candida albicans</i>	A
CMS50	38a	F	6	<i>Candida glabrata</i>	O
CMS51	5m	M	7	<i>Candida albicans</i>	O
CMS52	68a	F	6	<i>Candida haemulonii</i>	O
CMS53	82a	M	6	<i>Candida tropicalis</i>	O
CMS54	0	M	1	<i>Candida tropicalis</i>	O
CMS55	0	M	1	<i>Candida tropicalis</i>	O
CMS56	1m	M	3	<i>Candida parapsilosis</i>	A
CMS57	9m	M	5	<i>Candida parapsilosis</i>	O
CMS58	2a	M	1	<i>Candida parapsilosis</i>	A
CMS59	7m	M	1	<i>Candida parapsilosis</i>	A
CMS60	8m	F	1	<i>Candida tropicalis</i>	A
CMS61	0	M	10	<i>Candida parapsilosis</i>	A
CMS62	0	M	1	<i>Candida tropicalis</i>	A
CMS63	1a	M	4	<i>Candida albicans</i>	A
CMS64	1m	M	1	<i>Candida albicans</i>	O
CMS65	0	M	1	<i>Candida tropicalis</i>	A
CMS66	65a	M	6	<i>Candida albicans</i>	A
CMS67	1m	F	1	<i>Candida orthopsilosis</i>	A
CMS68	1m	F	1	<i>Candida tropicalis</i>	O
CMS69	62a	M	6	<i>Candida albicans</i>	A
CMS70	1m	F	1	<i>Candida tropicalis</i>	O
CMS71	0	M	1	<i>Candida tropicalis</i>	O
CMS72	5a	M	7	<i>Candida parapsilosis</i>	A
CMS73	10m	M	9	<i>Candida albicans</i>	A
CMS74	1m	F	1	<i>Candida tropicalis</i>	O
CMS75	1m	M	1	<i>Candida tropicalis</i>	O
CMS76	7m	F	9	<i>Candida albicans</i>	A
CMS77	10m	M	1	<i>Candida metapsilosis</i>	A
CMS78	1m	M	1	<i>Candida famata</i>	O
CMS79	0	M	5	<i>Candida parapsilosis</i>	A
CMS80	7m	M	1	<i>Candida albicans</i>	O
CMS81	67a	M	11	<i>Candida pelliculosa</i>	A
CMS82	1m	M	1	<i>Candida tropicalis</i>	O
CMS83	45a	F	11	<i>Candida tropicalis</i>	O
CMS84	17a	F	6	<i>Candida glabrata</i>	A

## Continuação

Isolado	Idade	Gênero	Hospital	Espécie	Desfecho
CMS85	10m	M	9	<i>Candida albicans</i>	A
CMS86	0	F	1	<i>Candida tropicalis</i>	A
CMS87	7a	F	1	<i>Candida albicans</i>	O
CMS88	1a	M	1	<i>Candida albicans</i>	A
CMS89	10m	M	9	<i>Candida albicans</i>	A
CMS90	10m	M	9	<i>Candida albicans</i>	A
CMS91	7m	M	1	<i>Candida orthopsilosis</i>	A
CMS92	57a	M	11	<i>Candida tropicalis</i>	O
CMS93	57a	M	11	<i>Candida tropicalis</i>	O
CMS94	1a	M	1	<i>Candida parapsilosis</i>	A
CMS95	0	M	1	<i>Candida albicans</i>	O
CMS96	0	M	1	<i>Candida albicans</i>	O
CMS97	1a	F	1	<i>Candida albicans</i>	A
CMS98	15a	F	2	<i>Candida tropicalis</i>	A
CMS99	15a	M	6	<i>Candida tropicalis</i>	A
CMS100	0	M	1	<i>Candida albicans</i>	O
CMS101	11m	F	7	<i>Candida guilliermondii</i>	A
CMS102	0	M	1	<i>Candida albicans</i>	O

M= Masculino, F=Feminino, A= Alta, O= Óbito, a= Anos, m= Meses