UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA

STELA SEIXAS CARVALHO

ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE CEPAS DE *CANDIDA* SP. ISOLADAS NOS LABORATÓRIOS DA REDE PÚBLICA E PRIVADA DO DISTRITO FEDERAL

BRASÍLIA, DF
2015

STELA SEIXAS CARVALHO

ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE CEPAS DE *CANDIDA* SP. ISOLADAS NOS LABORATÓRIOS DA REDE PÚBLICA E PRIVADA DO DISTRITO FEDERAL

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientadora: Dra Thaís Alves da Costa Lamounier

BRASÍLIA, DF

2015

STELA SEIXAS CARVALHO

ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE CEPAS DE *CANDIDA* SP. ISOLADAS NOS LABORATÓRIOS DA REDE PÚBLICA E PRIVADA DO DISTRITO FEDERAL

BANCA EXAMINADORA

_____

Orientadora: Profa. Dra. Thaís Alves da Costa Lamounier

(FCE/ Universidade de Brasília)

_____

Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferreira

(FCE/ Universidade de Brasília)

_____

Prof. Dr. Rodrigo Haddad

(FCE/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora pelo dom da vida e pelas graças a mim concedidas para alcançar a realização dos meus sonhos, incluindo o de me tornar uma futura profissional farmacêutica.

Aos meus preciosos pais, Claudio e Glauciene, pela confiança e pelo amor depositados, por serem meus exemplos de equilíbrio e sabedoria, e por sonharem junto a mim, me dando o apoio necessário nos momentos em que a preocupação se fez presente.

Ao meu irmão Tales pelos singelos gestos e palavras de incentivo, e aos meus familiares pelo apoio incondicional, por acreditarem em mim e no meu potencial.

À Profª. Drª. Thaís Alves da Costa Lamounier pela orientação, paciência, dedicação e por estar à disposição para me auxiliar nas dificuldades que surgiam ao longo da construção desse trabalho.

Aos farmacêuticos José Felipe e Flaviane Beatriz Marcelino Lara pela ajuda e pelo incentivo.

Agradeço a Isabella Sconetto, Clarissa Dias, Henrique Rodrigues e Letícia Fernandes pelo companheirismo, amizade e por dividirem comigo as alegrias e angustias ao longo da construção deste trabalho.

A todos os meus amigos pelo carinho e palavras de apoio que foram o meu sustento em vários momentos.

E a todos os meus professores que contribuiram para a minha formação acadêmica, pela paciência e dedicação que foram importantes para que eu chegasse até essa etapa da minha vida.

RESUMO

A candidemia é o principal desafio enfrentado por hospitais de vários países, devido às elevadas taxas de mortalidade e ao aumento do tempo de internação o que resulta em elevados gastos. As infecções nosocomiais por *Candida* sp. representam 80% de todas as infecções fúngicas incluindo infecções em sítios cirúrgicos, do sangue e do trato urinário. A incidência de candidemia em hospitais brasileiros varia entre 1,27 a 2,49 por 1000 admissões. O objetivo deste trabalho foi avaliar a frequência e o perfil de resistência das cepas do gênero de *Candida* sp. isoladas em amostras clínicas de pacientes nos laboratórios de análises clínicas da rede pública e privada do Distrito Federal, nos anos de 2013 a 2015. Foram analisados um total de 673 isolados de cepas de *Candida* sp., presentes em diversos tipos de amostras biológicas de pacientes hospitalizados e ambulatoriais, de um hospital da rede privada (n = 22) e um da rede pública (n = 651). As amostras biológicas foram colhidas de pacientes de ambos os sexos e idades variadas. Dentre as espécies de *Candida* sp. isoladas de cada hospital, a *C. albicans* foi a mais frequente nos isolados, depois *C. tropicalis*, seguida de *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Os principais sítios anatômicos de isolados da levedura foram urina, sangue e aspirado traqueal. As populações mais acometidas pela infecção foram os idosos e recém nascidos, devido a suas condições debilitantes que os tornam mais susceptíveis. Assim, concluiu-se que a candidíase ainda se apresenta como um grande desafio para a clínica.

Palavras-chaves: Candidíase, *Candida* sp., resistência, antifúngicos e candidemia.

ABSTRACT

The candidemia is the main challenge faced by hospitals in several countries because of high mortality rates and increased length of stay resulting in high expenses. The nosocomial infections *Candida* sp. represents 80% of all fungal infections including infections in surgical sites, blood and urinary tract. The incidence of candidemia in brazilian hospitals varies between 1.27 to 2.49 per 1000 admissions. The objective of this study was to evaluate the frequency and the resistance profile of the strains of *Candida* sp genre. isolated in clinical samples of patients in clinical laboratories of public and private network of the Distrito Federal, in the years 2013 to 2015. It was analyzed a total of 673 isolated strains of *Candida* sp, present in various types of biological samples from patients hospitalized and ambulatory in a private hospital (n = 22) and a public (n = 651). These biological samples were collected from patients of both sexes and various ages. Among the species of *Candida* sp. isolated from each hospital, *C. albicans* is the most frequent in isolated after *C. tropicalis*, *C. glabrata* and then *C. parapsilosis*. The main anatomical sites of yeast were isolated from urine, blood and tracheal aspirate. The populations most affected by the infection were the elderly and infants, due to its debilitating conditions that make them more susceptible. So, it was concluded that the thrush still presents itself as a challenge to the clinic.

Keywords: Candidiasis, *Candida* sp, resistance, antifungal and candidemia.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição das espécies de *Candida* sp. isoladas no Hospital da Rede Privada, de acordo com os sítios anatômicos.

Tabela 2 – Distribuição das espécies de *Candida* sp. isoladas no Hospital da Rede Pública, de acordo com os sítios anatômicos.

Tabela 3 – Relação da frequência das espécies de *Candida* sp. isoladas no Hospital da Rede Privada (HRPv) com sexo e faixa etária dos pacientes.

Tabela 4 – Relação de microrganismos envolvidos em co-infecção de pacientes do Hospital da Rede Privada.

Tabela 5 – Concentração inibitória mínima dos isolados de *Candida* sp. aos antifúngicos (métodos automatizados Vitek 2, Biomériuex®) do Hospital da Rede Privada.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 8

1.1 Diagnóstico 10

1.2 Resistência Molecular 11

2. JUSTIFICATIVA 14

3. OBJETIVOS 15

3.1 Objetivos gerais 15

3.2 Objetivos específicos 15

4. METODOLOGIA 16

4.1 Caracterização do estudo 16

4.2 Variáveis do estudo e definições 16

4.3 Identificação e confirmação das espécies de *Candida* sp. 17

4.4 Teste de Susceptibilidade a Antifungicos (TSA) realizado no Laboratório da Rede Privada 18

4.5 Análises dos dados 18

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 19

6. CONCLUSÃO 27

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 29

8. ANEXOS 34

8.1 Anexo 1 34

8.2 Anexo 2 38

Análise da frequência de cepas de *Candida* sp. isoladas nos laboratórios da rede pública e privada do Distrito Federal

1. Introdução

As leveduras da espécie *Candida* sp. são microrganismos comensais que habitam o trato gastrointestinal e fazem parte da microbiota vaginal, dos pulmões e da uretra, sendo a espécie *Candida albicans* a mais estudada. Esses microrganismos são considerados oportunistas, pois na ocorrência de um desequilíbrio na relação de comensalismo com o hospedeiro podem se proliferar e invadir o tecido, tornando-se patogênicos. O desequilíbrio no comensalismo ocorre devido aos mecanismos de defesa do hospedeiro estarem em alteração, pois recém nascidos prematuros e idosos sofrem alterações no sistema imunológico. Além disso, imunodeficiências (congênitas ou adquiridas), doenças degenerativas e imunossupressão, seja induzida por procedimentos médicos invasivos ou drogas, ventilação mecânica, cateter venoso, sonda vesical, aumento do tempo de internação e uso de antimicrobiano de amplo espectro de ação são considerados fatores relacionados ao hospedeiro como facilitadores para o desenvolvimento da candidíase (GIOLLO & SVIDZINSKI, 2010; ROSSI et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2013; COLOMBO et al., 2013; ANDRIOLI et al., 2009).

As infecções nosocomiais por *Candida* sp. representam 80% de todas as infecções fúngicas incluindo infecções em sítios cirúrgicos, do sangue e do trato urinário. Candidemia é o principal desafio enfrentado por hospitais de vários países, devido às elevadas taxas de mortalidade e ao aumento do tempo de internação o que resulta em elevados gastos. A incidência de candidemia em hospitais brasileiros varia entre 1,27 a 2,49 por 1000 admissões. Wille e colaboradores (2013) conduziram um estudo retrospectivo no Hospital São Paulo, localizado na cidade de São Paulo, e verificaram que a incidência de infecções sanguíneas por *Candida* sp. nessa instituição foi de 1,20 por 1000 admissões. Além da candidemia, infecções urinárias também são frequentes em pacientes internados. Porém, muitos dos casos de candidúria são diagnosticados como colonização e não como infecção urinária (COLOMBO et al., 2013; WILLE et al., 2013).

Atualmente, são conhecidas aproximadamente 200 espécies de *Candida* sp. No entanto, com os novos avanços tecnológicos é provável que outras espécies sejam descobertas. Menos de 20 espécies tem sido identificadas em amostras clínicas. *Candida albicans, Candida parapsilosis, Candida glabrata, Candida tropicalis e Candida krusei* são mais frequentes que as outras (ANDRIOLI et al., 2009; CORRÊA et al., 2009; BEDOUT & GOMÉZ, 2010).

Das espécies de *Candida* sp., a *C. albicans* é a predominante em candidiase oral, genital e cutânea (>90%). A *C. glabrata* é a segunda espécie mais frequente e é considerada um grande patógeno oportunista capaz de desenvolver resistência a antimicóticos, principalmente ao fluconazol e, por isso, o uso dessa droga é um fator predisponente ao desenvolvimento de resistência. Geralmente esta espécie está associada a pacientes com câncer, transplantados de órgãos ou pacientes maiores de 60 anos (BEDOUT & GOMÉZ, 2010).

A *C. parapsilosis* é um patógeno exógeno, encontrado na pele, unhas e mucosas. A partir de técnicas moleculares foi possível discriminar as três espécies que formam o complexo *C. parapsilosis*: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Esse complexo está associado a infecções adquiridas em ambientes hospitalares, através de procedimentos cirúrgicos com uso de cateteres intravenosos e por meio de nutrição parenteral. Em pacientes com câncer, principalmente leucemia, neutropenia e com transplante de medula óssea, a espécie prevalente é a *C. tropicalis.* Na Ásia e na América Latina, sua incidência é maior que 15%. A *C. krusei*, assim como a *C. tropicalis*, acomete pacientes neutropênicos e é uma espécie emergente devido ao uso do fluconazol na profilaxia. Esse microrganismo é multiresistente e apresenta resistência ao fluconazol e baixa sensibilidade à anfotericina e flucitocina (BEDOUT & GOMÉZ, 2010).

As células de *Candida* sp. possuem propriedades que lhes dão a capacidade de produzir doença, como a formação de biofilme. Os biofilmes são constituídos por um conjunto de microrganismos distintos que vivem em associação. As microcolônias de leveduras que formam esses biofilmes são envolvidas por uma matriz extracelular aonde ocorre a passagem de água e nutrientes. Essa tendência de viver em comunidade ocorre devido às vantagens de se viver em associação, como proteção a defesas imunes do hospedeiro e contra antifungicos. Muitos dos fatores que regulam a formação do biofilme da *Candida albicans* foram identificados, como por exemplo, os seis fatores de transcrição (BCR1, EFG1, TEC1, ROB1,

NDT80 e BRG1) que regulam o crescimento do biofilme deste fungo. A *Candida parapsilosis* também necessita do BRC1 e TEC1 para a formação do seu biofilme. Dessa forma, a deleção dos genes, principalmente do BCR1 para a *C. albicans*, inibe a formação do biofilme, minimizando a resistência a antifúngicos (GIOLLO & SVIDZINSKI, 2010; HOLLAND et al., 2014).

1.1. Diagnóstico

O diagnóstico de candidíase é baseado em métodos microbiológicos, como cultura, histopatologia e exame direto. Além destes, outros métodos para diagnóstico são o cultivo da *Candida* sp. em sítio estéril e detecção de biomarcadores, como DNA, antígenos e anticorpos de *Candida* sp. No entanto, para se chegar a um diagnóstico preciso é necessário associar estes métodos aos aspectos clínicos do paciente (BEDOUT & GOMÉZ, 2010).

O método mais indicado para o diagnóstico e identificação da *Candida* sp. é a cultura celular. Como as leveduras do gênero *Candida* sp. são pouco exigentes, o cultivo pode ser realizado em meios pouco nutritivos, como o ágar Sabouraud, ou em alguns meios usados para bactérias, como o meio de cérebro e infusão de macaco (BHI) ou em ágar sangue. Existem também os meios cromogênicos, os quais permitem identificar de forma mais rápida e precisa, as espécies de *Candida* sp. Normalmente, as leveduras crescem entre 48 e 72 horas e as colônias são cremosas, de coloração creme ou branca, podendo ser lisas ou rugosas, e são brilhantes ou ligeiramente opacas. Além disso, é necessário observar a invasão das hifas no ágar. No entanto, a emissão de resultados pelo método de cultura de células é demorada (BEDOUT & GOMÉZ, 2010).

Por isso, as provas moleculares são mais adequadas por gerarem resultados mais rápidos e reduzirem os riscos de contaminação durante a realização das técnicas. A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real é a que mais se destaca. Em seu estudo, Guiver e colaboradores (2001) verificaram que a PCR em tempo real com o uso do sistema TaqMan permite identificar algumas espécies de *Candida* sp., como *C. glabrata, C. albicans, C. parapsilosis, C. krusei* e *C. kefyr*, obtendo uma especificidade de 100% para essas espécies. Além dessas

vantagens, a PCR em tempo real se sobrepõe à PCR clássica pela redução dos resultados falso-positivos, devido aos métodos de extração do DNA, de sondas e primers mais eficientes. Innings e colaboradores (2007) confirmaram através de um estudo que a PCR pode ser específica para as espécies de *Candida* sp., pois não houve emissão de sinal das outras espécies testadas, como *S. Cereviseae*, e do DNA humano. Dessa forma, os riscos de contaminação por outros reagentes e contaminantes do ambiente são reduzidos. (BEDOUT & GOMÉZ, 2010; GUIVER et al., 2001; INNINGS et al., 2007).

1.2. Resistência Molecular

O aumento da resistência de microrganismos a antimicrobianos, bem como a antifúngicos tem sido uma crescente preocupação na área microbiológica. A resistência microbiana mostra-se como um grave problema de saúde pública, pois o índice de mortalidade devido às infecções é grande. Durante a última década os medicamentos tradicionais para o tratamento de *Candida* sp. foram aperfeiçoados e novos fármacos foram desenvolvidos e inseridos no mercado com o intuito de ajudar a sanar este problema. As classes de agentes antifúngicos mais utilizadas no tratamento da candidíase são os azóis, os poliênicos e equinocandinas (BEDOUT & GOMÉZ, 2010; COLOMBO et al., 2013).

Os azóis são fármacos que possuem em sua estrutura molecular um anel pentagonal, sendo que em sua composição existem dois átomos de carbono e três de nitrogênio (triazólicos) ou três de carbono e dois de nitrogênio (imidazólicos). O principal mecanismo de ação deste fármaco envolve a inibição das enzimas do citocromo P450, mais especificamente da enzima C-14-α-demetilase, bloqueando seletivamente a síntese do ergosterol, importante componente da membrana celular dos fungos. Os medicamentos que atualmente compõem essa classe são o Cetoconazol, Itraconazol, Fluconazol, Voriconazol e o Posaconazol. Estudos realizados por Costa e colaboradores (2011) revelaram que Fluconazol e Itraconazol, além do mecanismo de ação principal, também interferem no crescimento das hifas, um dos fatores de virulência das espécies de *Candida* sp., em isolados sensíveis a essas drogas, devido à sua ação na alteração do gene

ERG11, responsável pela produção de ergosterol. Assim, como as hifas são formadas através da membrana plasmática, sofrem interferência na sua formação (COLOMBO et al., 2013; COMO & DISMUKES, 1994; MARTINEZ, 2006; COSTA et al., 2011).

Foi relatado que espécies de *Candida* não-*albicans* desenvolveram resistência a esses medicamentos devido a alterações na enzima C-14- α-demetilase e aumento do efluxo dos fármacos. Esse efluxo é caracterizado pela capacidade do fungo de manter baixos níveis de substâncias tóxicas em seu interior expressando transportadores de membrana que funcionam como bombas de efluxo de fármacos. Existem duas classes de transportadores responsáveis pela resistência a antifúngicos: ABC (ATP-*binding cassette*) e MFS (*Major facilitator superfamily*). As subfamílias dessas proteínas possuem dois componentes muito importantes, o Cdr1p e o CaMdr1p, pois são os principais responsáveis pelo efluxo dos antifúngicos e possuem ação principalmente nos azólicos (MARTINEZ, 2006; PRASAD & RAWAL, 2014).

Muitas das espécies de *Candida* não-albicans apresentam sensibilidade ao Fluconazol, de acordo com estudo realizado por Golas e colaboradores (2014) em um Hospital Polonês, espécies como *C. albicans, C. tropicallis, C. parapsilosis, C. keffir* e *C. sak*e mostraram-se sensíveis a esse antifúngico, além do Posaconazol e do Voriconazol. De acordo com Dynowska e colaboradores (2014), a *C. glabrata* e *C. krusei* são espécies que apresentam maior resistência ao Fluconazol. Tal resistência é vista devido a previa exposição das duas espécies aos azóis. A principal espécie de não-*albicans* emergente é a *C. glabrata*, devido a sua capacidade de desenvolver resistência aos azóis, principalmente Fluconazol e Itraconazol, usados na profilaxia e no tratamento empírico de forma totalmente indiscriminada. O mecanismo associado à resistência desse microrganismo ao Fluconazol é a super expressão do gene que codifica os transportadores ABC, principalmente o CgCDR1 e o CgPDH1. Além disso, há evidências que indicam que o aumento da expressão do gene CgERG11, devido a duplicação gênica, também contribui para a resistência fungica, assim como mutações pontuais no ERG11 podem interferir na ligação do azol ao seu alvo (GOLAS et al., 2014; DINOWSKA et al., 2014; GUINEA et al., 2014; ABBES et al., 2013; BRUN et al., 2004).

A Nistatina e a Anfotericina B são antifúngicos que compõem a classe dos poliênicos. O primeiro possui ação apenas tópica, já o segundo é usado para tratar

formas mais graves de candidíase invasora. Esses fármacos agem nos esteróides presentes na membrana celular do fungo levando à desestabilização e ruptura celular. A anfotericina B tem ação contra as espécies de *Candida* sp. A *C. glabrata* e a *C. krusei* apresentam uma certa resistência, sendo necessário o uso de uma dose maior do que a convencional. Porém, isso apresenta riscos ao paciente, pois além de agir em esteróis da membrana celular dos fungos este fármaco também atua nas células humanas gerando muitos efeitos adversos (COLOMBO et al., 2013; MARTINEZ, 2006).

As equinocandinas são fármacos mais novos de uso somente parenteral e seu alvo de ação são enzimas do complexo de síntese da parede celular, mais especificamente na enzima ligada à sintese de beta (1,3) D glucana, importante componente da parede celular. Essa classe é composta pelos medicamentos Micafungina, Caspofungina e Anidulafungina, que possuem elevada ação farmacológica contra as espécies de *Candida* sp., podendo ser um tratamento alternativo nos casos em que há resistência ao Fluconazol, que é o azólico mais utilizado em infecções por esse fungos (COLOMBO et al., 2013; MARTINEZ, 2006; DIOMEDI, 2004).

O tratamento de candidemia causada por *C. glabrata* tem como antifúngico de primeira escolha as equinocandinas, de acordo com a *Infect Disease Society*. No entanto, o aumento do uso das equinocandinas no tratamento da *Candida glabrata* está levando ao desenvolvimento de resistência. Vários isolados dessa levedura apresentaram resistência intermediária à Caspofungina quando testado usando o *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Isso ocorre por meio de mutações nos aminoácidos na região HS1 (host spot 1) das proteínas Fks1 e Fks2, as quais codificam as subunidades da beta-1,3-glucano sintase. Substituições dos aminoácidos S629P, R631G e D632V/G/E/Y na Fks1-HS1 e F659Y/S, S663P/F, R665G, D666V/G/E e P667H/T na Fks2-HS1 promoveram o aumento do MIC das equinocandinas tornando-as menos eficaz contra a *C. glabrata.* Portanto, havendo a presença de pelo menos uma dessas mutações pode levar a resistência ao antifúngico. A identificação das mutações em Fks1 e Fks2 é feita por meio do sequenciamento do DNA (GUINEA et al., 2014; PAPPAS et al., 2009; PHAM et al., 2014).

2. Justificativa

O número de infecções fúngicas teve um aumento significante nos últimos anos. A principal causa é o aumento do número de indíviduos imunocomprometidos e com disposição para desenvolver infecções invasoras.

A espécie *Candida albicans* apresenta-se como a mais frequente, correspondendo a 90% dos casos. Porém, ultimamente tem sido observados relatos de casos envolvendo as espécies *não-albicans*, principalmente com o isolamento das espécies *Candida tropicalis*, *Candida glabrata, Candida parapsilosis* e *Candida guillermondi*. Acredita-se que este aumento da frequência das candidíases *não-albicans* se deve à seleção exercida pelo uso profilático do fluconazol em pacientes com maiores riscos de desenvolver infecções fúngicas invasivas.

Assim, o surgimento de cepas de *Candida* sp. resistentes aos antifúngicos tradicionais, como o Fluconazol, ocasiona um aumento das taxas de mortalidade principalmente em pacientes imunossuprimidos e nosocomiais gerando impactos diretos na saúde pública.

3. Objetivos Gerais e Específicos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a frequência e o perfil de resistência das cepas do gênero de *Candida* sp. isoladas em amostras clínicas de pacientes nos laboratórios de análises clínicas da rede pública e privada do Distrito Federal, entre os anos de 2013 e 2015.

3.2. Objetivos Específicos

- Comparar a frequência das infecções causadas por *Candida* sp. nos laboratórios da rede pública e privada;
- Relacionar a idade dos pacientes com as possíveis causas da infecção fúngica;
- Verificar a emergência de *Candida* não-albicans nos últimos anos;
- Avaliar o perfil de resistência a antifúngicos das espécies de *Candida* sp. isoladas no laboratório da rede privada.

4. Metodologia

4.1. Caracterização do estudo

O presente estudo é caracterizado por ser descritivo, observacional e transversal, realizado em dois hospitais do Distrito Federal, entre o período de abril de 2013 a abril de 2015. Foram analisados um total de 673 isolados de cepas de *Candida* sp., presentes em diversos tipos de amostras biológicas de pacientes hospitalizados e ambulatoriais, de um hospital da rede privada (n = 22) localizado na Ceilândia e um da rede pública (n = 651) localizado no Plano Piloto. As amostras biológicas foram colhidas de pacientes de ambos os sexos e idades variadas, os quais foram acometidos por infecção fúngica causada por cepas de *Candida* sp.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Faculdade de Saúde (FS) da Universidade de Brasília CAAE: 38856114.0.0000.0030 (ANEXO 1) e a identidade dos pacientes e dos hospitais foram mantidas em sigilo.

4.2. Variáveis do estudo e definições

As variáveis epidemiológicas incluídas nesse estudo foram a idade e o sexo dos pacientes. As variáveis clínicas foram a presença de comorbidades, infecções envolvendo outros microrganismos, resultados de exames e uso de antibióticos ou antifúngicos no período do estudo.

A faixa etária dos pacientes foi definida como neonatos: ≤ 90 dias ou enquanto estiverem na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (prematuros); crianças: a partir de 90 dias até 18 anos de idade; adultos: entre 19 e 60 anos; idosos: ≥ 60 anos. (CORTES et al., 2014)

4.3. Identificação e Confirmação da Espécie de *Candida* sp.

As amostras colhidas em ambos os laboratórios foram processadas de acordo com os Procedimentos Operacionais Padrões (POPs) e as Normas de Biossegurança (NBs) de cada qual. Essas amostras foram semeadas em meios de cultura adequados (ágar sangue ou ágar Sabouraud) e incubadas por 24 a 48 horas, a 37° C, para posterior identificação do microrganismo.

A identificação no laboratório da Rede Privada foi realizada através de métodos automatizados, após observação das características de levedura no ágar sangue e confirmação no ágar Sabouraud. Realizada a confirmação, as colônias foram diluídas em 3 mL de solução salina estéril 0,45% NaCl em um tubo de ensaio, a turbidez da suspensão foi medida por meio do DensiChek (Biomeurieux®) e a O.D. (densidade óptica) ideal é entre 0,5 e 0,62 de acordo com a escala de McFarland. Os cartões ID-YST para identificação de leveduras foram encaixados nos tubos de ensaios, posicionados nos cassetes do Vitek 2® (Biomeurieux®) e este foi introduzido no compartimento a vácuo do equipamento, onde a suspensão de leveduras sofre sucção para o interior do cartão e selagem do mesmo. Finalizada essa etapa, o cassete foi removido e introduzido no segundo compartimento para incubação (30° C por 24-48 horas) e identificação. O sistema de identificação do Vitek 2® (Biomeurieux®) baseia-se na emissão do sinal colorimétrico gerado pelas reações bioquímicas provocadas pelas leveduras em contato com os reagentes presentes nos poços dos cartões.

A identificação no laboratório da Rede Pública foi realizado através de métodos automatizados, bem como por semeio em ágar cromogênico específico para *Candida* sp (Chromagar®). Após observação das características de leveduras no ágar sangue e ágar Sabouraud, foi realizado o teste de tubo germinativo para identificação de *Candida albicans* e não-albicans e reisolamento em meio ágar cromogênico específico para identificação de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Caso a levedura fosse outra espécie de *Candida* não-albicans, a identificação era realizada no aparelho Micro Scan Walkaway 96 SI (Siemens®) por meio de testes bioquímicos colorimétricos. Uma suspensão de leveduras com turbidez ajustada para a escala de McFarland era depositada no painel RY ID, específico para leveduras. Em seguida,

o painel era introduzido na torre de identificação do aparelho e incubada a 35°C aproximadamente, por 24-48 horas.

4.4. Teste de Susceptibilidade a Antifúngicos (TSA) realizado no laboratório da Rede Privada

O teste de susceptibilidade a antifúngicos foi realizado por meio de método automatizado, utilizando o equipamento Vitek 2 (Biomeurieux®). A suspensão de leveduras usada para o TSA foi a mesma usada na identificação, ou seja, padronizada pela escala de McFarland. Desta foram retirados 260 µL e diluídos em 3 mL de solução salina estéril contida no tubo de ensaio. O cartão AST-YS07 para realização do antifungigrama foi encaixado no tubo de ensaio, colocado no cassete e introduzido no compartimento a vácuo do aparelho, para sucção e selagem do cartão. Em seguida o cassete foi removido e inserido em um segundo compartimento, onde foi incubado a 30° C, por 24-48 horas e posterior realização do TSA. Os antifúngicos contidos no AST-YS07 são Flucitosina, Fluconazol, Voriconazol, Anfotericina B, Micafungina e Caspofungina, em diferentes diluições. O equipamento avalia a turbidez dos poços e libera o MIC de cada antifúngico para a levedura.

Somente o laboratório da Rede Privada realiza antifungigrama, o da Rede Pública apenas identifica as espécies de *Candida* sp.

4.5. Análise dos dados

Os dados coletados foram plotados em tabelas e foi realizada análise dos dados utilizando o programa Microsoft Office Excel 2013.

5. Resultados e Discussão

Um total de 673 isolados de cepas de *Candida* sp. foram encontradas em diversos sítios biológicos dos pacientes, sendo que 651 (96,7%) pertenciam a pacientes atendidos em um hospital da Rede Pública (HRPb) e os outros 22 (3,2%) pertenciam a pacientes atendidos em um hospital da Rede Privada (HRPv).

As infecções causadas por leveduras tem aumentado, em todo o mundo, nas últimas décadas. O surgimento de espécies de *Candida* sp. resistentes a antifúngicos tornou-se comum na prática clínica (DEMITTO et al., 2012). A quantidade de isolados de *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans* no HRPb foi maior do que os isolados no HRPv, sendo 41,7% de *C. albicans* e 25,8% de *Candida* não-albicans e 1,63% de *C. albicans* e 1,63% de *Candida* não-*albicans*, respectivamente (Figura 1). As espécies *Candida* sp. isoladas no hospital da rede pública são as leveduras que não foram diferenciadas como *C. albicans* e *Candida* não-*albicans.*

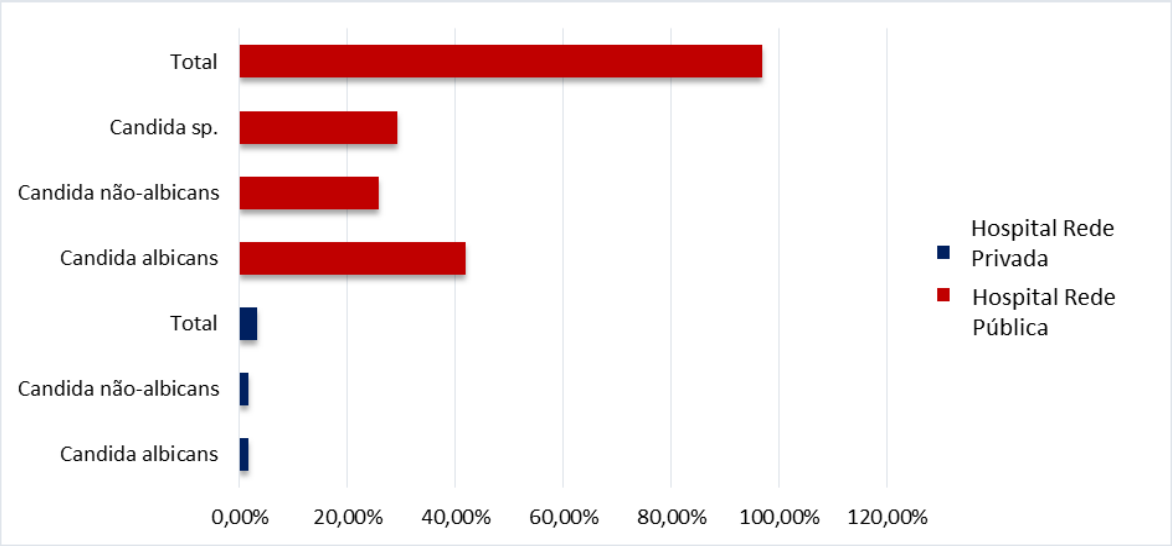

Figura 1: Frequência de isolados de *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans* no Hospital da Rede Privada e Pública (n=673) entre o período de abril de 2013 a abril de 2015.
**Candida* sp. = Leveduras que não foram diferenciadas como *C. albicans* e *C.* não-*albicans*.

Dentre as espécies de *Candida* sp. isoladas de cada hospital, a *C. albicans* ainda é a mais frequente nos isolados, como foi verificado pelo atual estudo, tanto no Hospital Público como no Hospital Privado (43,1% e 50,0%, respectivamente). Esses dados foram condizentes ao estudo realizado em um Hospital Universitário de Maringá, aonde a porcentagem de isolados de *C. albicans* foi de 41,8% (DEMITTO et al., 2012).

A espécie mais comum encontrada no HRPv foi a *C. albicans*, em 11 (50,0%) pacientes, seguida por *C. tropicalis* em 5 (22,7%), *C. glabrata* em 4 (18,2%) e por último *C. parapsilosis* em 2 (9,10%) (Tabela 1). No HRPb a espécie mais comum foi também a *C. albicans*, 281 (43,1%), seguido por *C. tropicalis* 58 (8,9%), *C. glabrata* 48 (7,4%), *C. parapsilosis* 43 (6,6%), *C. krusei* 7 (1,1%), *C. guilliermondi* 3 (0,5%). Outras espécies de *Candida* não-*albicans*, 15 (2,2%), foram identificadas no hospital público, sem identificação específica. Um total de 196 (30,1%) leveduras foram identificadas como sendo do gênero *Candida* sp., porém estas não foram diferenciadas em *C. albicans* e não-*albicans*. (Tabela 2)

Tabela 1: Distribuição das espécies de *Candida* sp. isoladas no Hospital da Rede Privada, de acordo com os sítios anatômicos.

	Sítio Anatômico					
Espécie de *Candida*	**Urina**	**Sangue**	**Ponta de Cateter**	**Swab Vaginal**	**Secreção Respiratória**	**TOTAL (%)**
C. albicans	5	4	1	-	1	11 (50,0%)
C. glabrata	-	3	-	1	-	4 (18,2%)
C. parapsilosis	1	1	-	-	-	2 (9,1%)
C. tropicalis	-	2	1	-	2	5 (22,7%)
TOTAL (%)	6 (27,0%)	10 (45,0%)	2 (9,0%)	1 (5,0%)	3 (14,0%)	22 (100,0%)

A ordem de frequência de isolados de cepas: *C. albicans*, depois *C. tropicalis*, seguida de *C. glabrata* e *C. parapsilosis* corrobora com o estudo de Demitto e colaboradores (2012). Isso confirma a emergência das infecções causadas por *Candida* não-*albicans*, que atualmente tem representado de 40 a 50% das

infecções. Além disso, essas espécies possuem resistência a antifúngicos, tanto inata quanto adquirida, dificultando o tratamento (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010; NUNES et al., 2012; DEMITTO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014).

Tabela 2: Distribuição das espécies de *Candida* sp. isoladas no Hospital da Rede Pública, de acordo com o sítio anatômico.

	Sítio Anatômico							
Espécie de *Candida*	**Urina**	**Sangue**	**Aspirado endotraqueal**	**Ponta de Cateter**	**Escarro**	**Lavado Brônquico**	**Outros****	**TOTAL (%)**
C. albicans	116	15	88	13	18	15	16	281 (43,1%)
C. glabrata	27	4	6	2	3	1	5	48 (7,4%)
C. parapsilosis	3	23	5	8	1	0	3	43 (6,6%)
C. tropicalis	19	14	16	3	0	2	4	58 (8,9%)
C. krusei	3	0	1	0	0	2	1	7 (1,1%)
C. guilliermondi	0	1	0	1	0	0	1	3 (0,5%)
*Outras****	5	2	3	0	1	0	4	15 (2,2%)
*Candida sp.**	116	4	57	3	6	2	8	196 (30,1%)
TOTAL (%)	289 (45,0%)	63 (10,0%)	176 (27,0%)	30 (5,0%)	29 (4,0%)	22 (3,0%)	42 (6,0%)	651 (100,0%)

**Candida* sp = Leveduras que não foram diferenciadas como *C. albicans* e *C.* não *albicans*.

**Outros – Inclui amostras de fezes, fragmento de tecido, fragmento ósseo, líquido abdominal, líquido ascítico, líquido biliar, líquido de dreno, líquido peritoneal, líquido pleural, prótese valvar cardíaca, raspado de pele, raspado de unha, secreção de abscesso, secreção de dreno, secreção de ferida, secreção de ferida operatória, secreção orofaringea e secreção purulenta.

*** Outras espécies de *Candida* não-albicans.

Com relação aos sítios anatômicos é possível observar no HRPv que as cepas foram isoladas do sangue (45%), urina (27%), ponta de cateter (9%), swab de secreção vaginal (5%) e secreção respiratória (14%) (Tabela 1). Já no HRPb as cepas foram isoladas do urina (45%), aspirado endotraqueal (27%), sangue (10%), ponta de cateter (5%), escarro (4%), lavado brônquico (3%) e outros (6%). Raspados de unha, raspados de pele, fragmentos de tecido e outros tipos de

amostra foram agrupados no grupo “outros”, devido a baixa frequência de isolados. (Tabela 2)

No Brasil, candidemia e candidúria são as principais infecções fúngicas em pacientes hospitalizados. No hospital privado, os principais sítios anatômicos de isolados de *Candida* sp. foram sangue (45,0%) e urina (27,0%). Já no hospital público, os isolados na urina são a maioria (45,0%), seguidos de aspirado traqueal (27,0%) e sangue (10,0%). Estudos demonstram que candidemia e candidúria podem estar relacionadas, provocando uma complicação mais grave e até mesmo sepse. É importante lembrar que em muitos casos, candidúria não representa uma infecção, e sim colonização. No entanto, muitos dos pacientes hospitalizados estavam em uso de sonda vesical de demora, o que viabiliza o desenvolvimento de fungos no local, bem como tempo de hospitalização, idade avançada, uso de corticosteróide e imunossupressores e uso de antibióticos de amplo espectro os quais favorecem a ocorrência de uma infecção oportunista (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010; COLOMBO et al., 2013; DEMITTO et al., 2012).

A distribuição das espécies de *Candida* sp. de acordo com o sexo e idade dos pacientes do HRPv (Tabela 3) mostraram que a maioria das infecções foram em pacientes idosos (59,1%) e neonatos (27,3%). A frequência de *C. albicans* nesses dois grupos etários foi maior. Em relação ao sexo, não houveram diferenças nos resultados. Além disso, 36,4% dos pacientes do HRPv apresentaram co-infecções envolvendo tanto bactérias como leveduras. Desses, dois casos envolveram co-infecção com diferentes espécies fúngicas e os outros apresentaram co-infecções bactéria-levedura. (Tabela 4)

Tabela 3: Relação da frequência das espécies de *Candida* sp. isoladas no Hospital da Rede Privada (HRPv) com sexo e faixa etária dos pacientes.

	Neonatos		Adultos		Idosos		
Espécies de *Candida*	**Fem***	**Masc****	**Fem**	**Masc**	**Fem**	**Masc**	**TOTAL (%)**
C. albicans	-	4	-	1	4	2	11 (50,0%)
C. glabrata	-	-	2	-	-	2	4 (18,2%)
C. tropicalis	-	-	-	-	2	3	5 (22,7%)
C. parapsilosis	2	-	-	-	-	-	2 (9,1%)
TOTAL (%)	2 (9,1%)	4 (18,2%)	2 (9,1%)	1 (4,5%)	6 (27,3%)	7 (31,8%)	22 (100,0%)

*Fem = Feminino
**Masc = Masculino

Tabela 4: Relação de microrganismos envolvidos em co-infecção de pacientes do Hospit5al da Rede Privada.

Sitio Anatômico	Espécie de *Candida* sp	Agente Infeccioso 2
Sangue/Ponta de Cateter	*C. tropicalis*	*C. albicans*
Secreção Respiratória	*C. tropicalis*	*Staphylococcus aureus*
Sangue/Urina	*C. tropicalis*	*Klebsiella pneumoniae*
Swab Vaginal	*C. glabrata*	*Streptococcus agalactie*
Urina/Secreção Respiratória	*C. albicans*	*Acinetobacter baumanii*
Urina/Sangue	*C. albicans*	*Staphylococcus capitis*
Sangue	*C. parapsilosis*	*Staphylococcus haemolyticus*
Sangue	*C. albicans*	*Staphylococcus epidermidis*

Como já determinado, a candidiase é um problema de saúde que está relacionado a condições debilitantes dos pacientes, quando os mecanismos de defesa do hospedeiro sofrem mudanças. Idosos e recém-nascidos (principalmente prematuros) são individuos susceptíveis a adquirir esse tipo de infecção. É possível analisar a maior frequência de isolados de *Candida* sp. nos pacientes idosos (59,1%) e recém-nascidos (27,3%) do hospital privado (Tabela 3). Em estudo

multicêntrico realizado por Barton e colaboradores (2014), observou-se que as duas principais espécies de *Candida* sp. isoladas de recém-nascidos foram a *C. albicans* e a *C. parapsilosis*, assim como no presente estudo em que 66,6% dos isolados de neonatos foi por *C. albicans* e 44,4% por *C. parapsilosis*. Esses achados são importantes, pois candidiase é um grande problema para os neonatos, interferindo no seu desenvolvimento e provocando altas taxas de mortalidade (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010; COLOMBO et al., 2013; BARTON et al., 2014). Não foi realizada a análise de frequência entre sexo, idade e espécie fúngica dos pacientes do Hospital da Rede Pública devido a indisponibilidade de acesso ao sistema de informação, visto que os dados dos isolados foram obtidos diretamente no Setor de Microbiologia sem a possibilidade de acesso aos prontuários.

Na presença de uma coinfecção, como observado na Tabela 4, é necessário estar atento quanto à escolha do antimicrobiano a ser utilizado para o tratamento da infecção. O uso de mais de um antifúngico pode resultar no desenvolvimento de resistência, nos casos de infecção por duas ou mais leveduras. Em relação ao tratamento de uma coinfecção envolvendo levedura e bactéria é importante lembrar que ao utilizar um antibiótico para tratar a bactéria este mesmo poderá induzir o desenvolvimento fúngico. O mais adequeado, nesses casos, seria associar o uso de um antibiótico e um antifúngico. (CORTES et al., 2014; DEMITTO et al., 2012)

Dos 22 isolados obtidos no HRPv, em 16 (72,7%) deles foi realizado o teste de sensibilidade a antifúngicos, obtendo a concentração mínima inibitória de cada isolado aos diferentes antifúngicos testados. Os medicamentos utilizados no teste foram a Flucitosina, o Fluconazol, o Voriconazol, a Anfotericina B, a Caspofungina e a Micafungina. (Tabela 5) Todos os isolados foram sensíveis aos antifúngicos sistemicos testados.

Tabela 5: Concentração inibitória mínima dos isolados de *Candida* sp. aos antifúngicos (método automatizado Vitek 2, Biomériuex®) do Hospital da Rede Privada.

	Flucitosina	**Fluconazol**	**Voriconazol**	**Anfotericina B**	**Caspofungina**	**Micafungina**
Espécie de *Candida*	**MIC (µg/mL)**	**MIC (µg/mL)**	**MIC (µg/mL)**	**MIC (µg/mL)**	**MIC (µg/mL)**	**MIC (µg/mL)**
C. albicans	≤ 1	≤1	≤ 0,12	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,06
C. albicans	≤ 1	≤ 1	≤ 0,12	0,5	≤ 0,25	≤ 0,06
C. albicans	≤ 1	≤ 1	≤ 0,12	0,5	≤ 0,25	≤ 0,06
C. albicans	≤ 1	≤ 1	≤ 0,12	0,5	≤ 0,25	≤ 0,06
C. albicans	≤ 1	≤ 1	≤ 0,12	0,5	≤ 0,25	≤ 0,06
C. albicans	≤ 1	≤ 1	≤ 0,12	0,5	≤ 0,25	≤ 0,06
C. albicans	≤ 1	≤ 1	≤ 0,12	0,5	≤ 0,25	≤ 0,06
C. albicans	≤ 1	≤ 1	≤ 0,12	0,5	≤ 0,25	≤ 0,06
C. glabrata	≤ 1	2	≤ 0,12	1	≤ 0,25	≤ 0,06
C. glabrata	≤ 1	4	≤ 0,12	0,5	0,5	≤ 0,06
C. glabrata	≤ 1	2	≤ 0,12	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,06
C. parapsilosis	≤ 1	≤ 1	≤ 0,12	0,5	1	1
C. parapsilosis	≤ 1	≤ 1	≤ 0,12	0,5	1	0,5
C. tropicalis	≤ 1	≤ 1	≤ 0,12	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,06
C. tropicalis	≤ 1	≤ 1	≤ 0,12	0,5	≤ 0,25	≤ 0,06
C. tropicalis	≤ 1	≤ 1	≤ 0,12	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,06

Pontos de corte* **=** Flucitosina: ≤4 (S) e ≥32 (R). Fluconazol: *C. albicans* - ≤2 (S) e ≥8 (R); *C. glabrata* - ≤32 (SDD) e ≥4 (R); *C. parapsilosis* - ≤2 (S) e ≥8 (R); *C. tropicalis* - ≤2 (S) e ≥8 (R). Voriconazol: *C. albicans* - ≤0,12 (S) e ≥1 (R); *C. glabrata* - ≤1 (S) e ≥4 (R); *C. parapsilosis* - ≤0,12 (S) e ≥1 (R); *C. tropicalis* - ≤0,12 (S) e ≥1 (R). Anfotericina B: ≤1 (S) e ≥2 (R). Caspofungina: *C. albicans* - ≤0,25 (S) e ≥1 (R); *C. glabrata* - ≤0,12 (S) e ≥0,5 (R); *C. parapsilosis* - ≤2 (S) e ≥8 (R); *C. tropicalis* - ≤0,25 (S) e ≥1 (R). Micafungina: *C. albicans* - ≤0,25 (S) e ≥1 (R); *C. glabrata* - ≤0,06 (S) e ≥0,25 (R); *C. parapsilosis* - ≤2 (S) e ≥8 (R); *C. tropicalis* - ≤0,25 (S) e ≥1 (R). (CLSI, 2012)

No presente estudo, os 16 (72,7%) isolados do hospital privado foram submetidos aos testes de susceptibilidade e apresentaram sensibilidade aos antifúngicos testados. Apesar destas amostras possuírem uma sensibilidade vinculada à análise do MIC faz-se necessário uma análise molecular dos genes de resistência destas cepas para confirmar o perfil de resistência. Diferente do estudo

realizado por Nunes e colaboradores (2011), em que dos 81 isolados avaliados, 68 (84,0%) apresentaram resistência a algum dos antifúngicos testados no TSA automatizado, seguindo as recomendações técnicas e de interpretação clínica do protocolo M27-A2 do CLSI.

Apesar da susceptibilidade apresentada pelas cepas isoladas ter sido grande, é importante salientar a necessidade do uso adequado de antimicrobianos para o tratamento de infecções fúngicas causadas por *Candida* sp. A resistência emergente dos isolados de *Candida* sp. aos antifúngicos ocorre principalmente devido ao grande uso dos mesmos na profilaxia. O Fluconazol é a droga de primeira escolha no tratamento e na profilaxia das infecções, devido à sua baixa toxicidade e farmacocinética favorável, e seu uso excessivo seleciona o surgimento de espécies que antes apresentavam-se susceptíveis. A *C. glabrata* e a *C. krusei* são as espécies que mais apresentam resistência ao Fluconazol. Na tabela 5 é possível observar que o MIC dos isolados de *C. glabrata* apresentaram-se mais elevados em comparação ao das outras espécies, confirmando a maior resistência dessa espécie (PAPPAS et al., 2009; NUNES et al., 2009; DEMITTO et al., 2012).

Geralmente, as cepas de *Candida* sp. apresentam boa susceptibilidade às equinocandinas (Caspofungina e Micafungina), até mesmo *C. glabrata* e *C. krusei* apresentam um MIC baixo para esse medicamento. No entanto, *C. parapsilosis* possui menor sensibilidade as equinocandinas quando comparada as outras espécies de *Candida* sp., devido a uma mutação genética, conferindo intolerância. O MIC dos isolados de *C. parapsilosis* se comparado ao das outras espécies testadas no presente estudo mostraram-se maiores, confirmando sua menor responsividade as equinocandinas. A identificação dessa espécie é importante devido à capacidade de formar biofilmes em cateteres e outros dispositivos médicos, aumentando sua permanência em ambiente hospitalar. (PAPPAS et al., 2009; MENEZES et al., 2012)

6. Conclusão

As infecções ocasionadas por cepas do gênero *Candida* sp. tornaram-se um grande problema de saúde pública, principalmente devido à emergência de candidíases por espécies de *Candida* não-albicans que ultimamente apresentam resistência, tanto inata quanto adquirida, ao fluconazol que é bastante usado na profilaxia de forma indiscriminada, bem como aos outros antifúngicos disponíveis no mercado, dificultando o tratamento dessas infecções. O conhecimento sobre infecções por *Candida* sp. nos diversos sítios anatômicos e tratamento de tais infecções permitiria ao profissional selecionar um tratamento farmacológico ou não farmacológico adequado para determinada candidíase.

A partir do atual estudo foi possível observar o grande número de cepas de *Candida* sp. isoladas nos hospitais da rede pública e privada do Distrito Federal. No entanto, o número de isolados na rede privada foi muito abaixo do esperado, considerando o período do estudo, devido à falta de treinamento e conhecimento do profissional responsável pela identificação das colônias e realização do antifungigrama. Sabendo que essas informações são de relevância clínica, é extremamente necessário um profissional nessa área capacitado e preparado para exercer tais atividades.

Os sítios anatômicos que mais apresentaram isolados de *Candida* sp. foram urina, sangue e aspirado endotraqueal ou secreção respiratória. No entanto, no hospital da rede pública houveram mais cepas isoladas na urina quando comparado com o hospital da rede privada. Por ser um microrganismo colonizante da uretra e da vagina, é comum encontrar cepas de *Candida* sp. em urina e, portanto, esperava-se que em ambos os hospitais o número de isolados fosse maior nesse tipo de amostra. Porém, no hospital da rede pública todos os isolados de *Candida* sp. com contagem acima de 100.000 colônias são identificados, enquanto que no hospital da rede privada são identificadas somente as colônias presentes em amostras de pacientes hospitalizados, pacientes gestantes ou que apresentem algum tipo de alteração em outros exames, principalmente no exame de urina EAS (elementos anormais e sedimentos).

Devido ao grande número de isolados de pacientes ambulatoriais e principalmente hospitalizados, vê-se que a candidíase apresenta-se como um

grande desafio para a clínica. Por isso, o diagnóstico necessita ser realizado de forma correta, pois a partir dele será decidido a necessidade de um tratamento farmacológico e a melhor escolha de um antifúngico.

7. Referências Bibliograficas

ABBES, S.; MARY, C.; SELLAMI, H.; MICHEL-NGUYEN, A.; AYADI, A.; RANQUE, S. Interactions between copy number and expression level of genes involved of fluconazole resistance in *Candida glabrata*. **Frontiers in cellular and infection Microbiology**, v. 3, n. 74, p 1-8; 2013.

ALBUQUERQUE, C.; BELTRÁN, S.; OLIVARES, R.; FALCONES, M. A.; AMARO, J.; FUENTES, M.; TAPIA, C. V. Distribución de especies y perfil de susceptibilidad de aislados de *Candida* spp: la importancia de vigilar también cepas de la comunidad. **Rev Chilena Infectol**, v. 30, n. 3, p. 244-251, 2013.

ANDRIOLI, J. L.; OLIVEIRA. O. S. A.; BARRETO, C. S.; SOUZA, Z. L.; OLIVEIRA, M. C. H.; CAZORLA, I. M.; FONTANA, R. Frequência de leveduras em fluido vaginal com e sem suspeita clínica de candidíase vulvovaginal. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 31, n. 4, p. 300-304, 2009.

BARTON, M.; O'BRIEN, K.; ROBINSON, J. L.; DAVIES, D. H.; SIMPSON, K.; ASZTALOS, E.; LANGLEY, J. M.; LE SAUX, N.; SAUVE, R.; SYNNES, A.; TAN, B.; REPENTIGNY, L.; RUBIN, E.; HUI, C.; KOVACS, L.; RICHARDSON, S. E. Invasive candidiasis in low birth weight preterm infants: risk factors, clinical course and outcome in a prospective multicenter study of cases and their matched controls. **Infect Dis**, v. 14, p. 1-10, 2014.

BEDOUT, C.; GOMÉZ, B. L. Candida y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano. **Infectio**, v. 14, n. S2, p. S159-S171, 2010.

BRUN, S.; BERGÈS, T.; POUPARD, P.; VAUZELLE-MOUREAU, C.; RENIER, G.; CHABASSE, D.; BOUCHARA, J. Mechanisms of Azole Resistance in Petite Mutants of *Candida glabrata*. **Antimicrob Agentes Chemother**, v. 48, n. 5, p. 1788-1796, 2004.

CLSI M27-S4. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Fourth informational supplement. Dezembro, 2012.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; CAMARGO, L. F. A.; RICHTMANN, R.; TELLES, F. Q.; SALLES, J. C.; CUNHA, C. A.; YASUDA, M. A. S.; MORETTI, M. L.; NUCCI, M. Brazilian guidelines for the management of candidiasis – a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Braz J Infect Dis**, v. 17, n. 3, p. 283-312, 2013.

COMO, J. A.; DISMUKES, W. E. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. **N Engl J Med**, v. 330, n. 4, p. 263–72, 1994.

CORRÊA, P. R.; david, p. r. S.; PERES, N. P.; CUNHA, K. C.; ALMEIDA, M. T. G. Caracterização fenotípica de leveduras isoladas da mucosa vaginal em mulheres adultas. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 31, n. 4, p. 177-181, 2009.

CORTES, J. A.; REYES, P.; GÓMES, C. H.; CUERVO, S. I.; RIVAS, P.; CASAS, C. A.; SANCHEZ, R. Clinical and epidemiological characteristics and risk factors for mortality in patients with candidemia in hospitals from Bogotá, Colombia. **Braz J Infect Dis**, v. 18, n. 6, p. 631-637, 2014.

COSTA, C. R.; SOUZA, L. K. H.; ATAÍDES, F. S.; FERRI, P. H.; COSTA, M. P.; FERNANDES, O. F. L.; SILVA, M. R. R. Molecular analysis and dimorphism of azole-susceptible and resistant *Candida albicans* isolates. **Rev Soc Bras Med Top,** v. 44, n. 6, p. 740-744, 2011.

DEMITTO, F. O.; AMARAL, R. C. R.; BIASI, R. P.; GUILHERMENTTI, E.; SVIDZINSKI, T. I. E.; BAEZA, L. C. Suscetibilidade a antifúngicos *in vitro* de *Candida spp.* em pacientes do Hospital Universitário Regional de Maringá-PR. **J Bras Patol Med Lab**, v. 48, n. 5, p. 315-321, 2012.

DIOMEDI, A. Nuevos antifungicos: Las equinocandinas. **Rev Chil Infect**, v. 21, n. 2, p. 89-101, 2004.

DYNOWSKA, M.; EJDYS, E.; BIEDUNKIEWICZ, A.; KUBIAK, D.; SUCHARZEWSKA, E.; ROSLAN, M. Yeasts isolated from frequently in-patients and out-patients. **Annals of Parasitology**, v. 60, n. 3, p. 199-206, 2014.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **J Bras Patol Med Lab**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GOLAS, M.; NETSVYETAYEVA, I.; SIKORA, M.; PIRSKORSKA, K.; SULIK-TYSZKA, B.; SWOBODA-KOPEC, E. Trends in Antifungal Susceptibility of Candida Species: One Year Observation. **Polish Journal of Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 217-222, 2014.

GUINEA, J.; ZARAGOZA, O.; ESCRIBANO, P.; MARTIN-MAZUELOS, E.; PEMÁN, J.; SANCHEZ-REUS, F.; CUENCA-ESTRELLA, M. Molecular Identification and Antifungal Susceptibility of Yeast Isolates Causing Fungemia Collected in a

Population-Based Study in Spain in 2010 and 2011. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 3, p. 1529-1537, 2014.

GUIVER, M.; LEVI, L.; OPPENHEIM, B. A. Rapid identification of *Candida* species by TaqMan PCR. **J Clin Pathol**, v. 54, p. 362-366, 2001.

HOLLAND, L. M.; SCHRODER, M. S.; TURNER, S. A.; TAFF, H.; ANDES, D.; GROZER, Z.; GACSER, A.; AMES, L.; HAYNES, K.; HIGGINS, D. G.; BUTLER, G. Comparative Phenotypic Analysis of the Major Fungal Pathogens *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 9, p. 1-18, 2014.

INNINGS, A.; ULLBERG, M.; JOHANSSON, A.; RUBIN, C. J.; NOREUS, N.; ISAKSSON, M.; HERRMANN, B. Multiplex Real-Time PCR Targeting the RNase P RNA Gene for Detection and Identification of *Candida* Species in Blood. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 874–880, 2007.

MARTINEZ, R. An update on the use of antifungal agents. **J Bras Pneumol**, v. 32, n. 5, p. 449-460, 2006.

MENEZES, E. A.; JUNIOR, A. A. V.; CUNHA, F. A.; CUNHA, M. C. S. O.; BRAZ, B. H. L.; CAPELO, L. G.; SILVA, C. L. F. Identificação molecular e suscetibilidade antifúngica de *Candida parapsilosis* isoladas no Ceará, Brasil. **J Bras Patol Med Lab**, v. 48, n. 6, p. 415-420, 2012.

NUNES, B. E.; NUNES, B. N.; MONTEIRO, J. C. M S.; PAES, A. L. V. Perfil de sensibilidade do gênero *Candida* a antifúngicos em um hospital de referência da Região Norte do Brasil. **Rev Pan Amaz Saude**, v. 2, n. 4, p. 23-30, 2011.

OLIVEIRA, V. K. P.; RUIZ, L. S.; OLIVEIRA, N. A. J.; MOREIRA, D.; HAHN, R. C.; MELO, A. S. A.; NISHIKAKU, A. S.; PAULA, C. R. Fungemia caused by *Candida species in a* Children's Public Hospital in the city of São Paulo, Brazil: Study in the period 2007-2010. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 56, n. 4, p. 301-305, 2014.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D.; BENJAMIM, D. K.; CALANDRA, T. F.; EDWARDS, J. E.; FILLER, S. G.; FISHER, J. F.; KULLBERG, B. J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A. C.; REX, J. H.; WALSH, T. J.; SOBEL, J. D. Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Disease Society of America. **Clin Infect Dis**, v. 48, n. 5, p. 503-535, 2009.

PHAM, C. D.; BOLDEN, C. B.; KUYKENDALL, R. J.; LOCKHART, S. R. Development of a Luminex Based Multiplex Assay for Detection of Mutations Conferring Resistance to Echinocandins in *Candida glabrata*. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 3, p. 790-795, 2014.

PRASAD, R.; RAWAL, M. K. Efflux pump proteins in antifungal resistance. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, n. 202, p. 1-13, 2014.

ROSSI, T.; LOZOVOY, M. A. B.; SILVA, R. V.; FERNADES, E. V.; GERALDINO, T. H.; COSTA, I. C.; SARIDAKIS, H. O.; WATANABE, M. A. E; FELIPE, I. Interactions Between *Candida albicans* and Host. **Ciências Biológ e da Saúde**, v. 32, n. 1, p. 15-28, 2011.

WILLE, M. P.; GUIMARÃES, T.; FURTADO, G. H. C.; COLOMBO, A. L. Historical trends in the epidemiology of candidaemia: analysis of an 11 year period in a tertiary care hospital in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, p. 288-292, 2013.

9. ANEXOS

9.1. Anexo 1

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - CEP/FS-UNB

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do perfil de resistência de microrganismos causadores de infecções oportunistas, nosocomiais e assintomáticas na Regional de Ceilândia/DF

Pesquisador: Thais Alves da Costa Lamounier

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 38856114.0.0000.0030

Instituição Proponente: Faculdade de Ceilândia - FUNDACAO UNIVERSIDADE DE BRASILIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.079.971

Data da Relatoria: 10/06/2015

Apresentação do Projeto:

O objetivo do presente estudo avaliar o perfil destes microrganismos com relação a resistência microbiana e análises moleculares na Regional de Saúde da Ceilândia no Distrito Federal. Estes dados poderão contribuir para o perfil epidemiológico de bactérias e leveduras que possam gerar quadros de morbidade e até mortalidade em determinados grupos de pacientes.

As amostras recebidas para a realização dos exames laboratoriais no Laboratório Regional da Ceilândia e no Laboratório do Hospital Regional da Ceilândia serão processadas de acordo com as rotinas laboratoriais baseadas nos Procedimentos Operacionais Padrões (POPs) internos e as Normas de Biossegurança. As cepas de bactérias e leveduras isoladas serão identificadas pelo método automatizado e será realizado o antibiograma para as cepas bacterianas de acordo com os padrões estabelecidos pela NCCLS. Para as leveduras não será realizado o antifungigrama .Para isso, será aplicado o Termo de Livre Consentimento e Esclarecido (TCLE), conforme modelo em ANEXO.Após a identificação das espécies, as colônias isoladas serão selecionadas para que, a partir dos inóculos obtidos de cada colônia, seja extraído o material genéticos dos microrganismos.Após a extração utilizando kits comerciais, o DNA será submetido às técnicas de PCR (Polymerase Chain Reaction) e qRT-PCR (Real Time PCR) utilizando oligonucleotídeos específicos para cada cepa de microrganismo. Os oligonucleotídeos serão definidos para regiões

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsunb@gmail.com

gênicas de resistência microbiana. As amostras serão analisadas em gel de agarose 1%. Além disso, será utilizado o programa WHONET como ferramenta para a análise de microrganismos já identificados e foram inseridos no sistema. O WHONET é um software de banco de dados desenvolvido para gestão e análises dos dados obtidos nos laboratórios de Microbiologia, com ênfase na análise de resultados de testes de susceptibilidade aos antimicrobianos. Este é utilizado em mais de 90 países para contribuir com programas nacionais de vigilância, bem como apoiar a decisão clínica e política de utilização de antibióticos, detectar surtos, identificar o desempenho dos testes realizados no laboratório e caracterizar o perfil microbiano isolado. O Laboratório Regional da Ceilândia dispões desta ferramenta. Assim, no presente estudo será possível realizar a análise do perfil e da resistência antimicrobiana das bactérias que já foram isoladas na cidade da Ceilândia/DF.

Critério de Inclusão:
Serão incluídas no projeto as amostras de urina, secreção vaginal, secreção de orofaringe, ponta de cateter, líquidos corporais, hemocultura ou qualquer outro material biológico em que houver isolamento de microrganismos.
Critério de Exclusão:
Amostras consideradas negativas serão excluídas da pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:
"Objetivo Primário:
Avaliar o perfil de resistência de microrganismos, como bactérias e leveduras, causadoras de infecções em diferentes sítios biológicos de amostras processadas no Laboratório Regional da Ceilândia.
Objetivo Secundário:
- Analisar as principais espécies de bactérias e leveduras causadoras de infecções assintomáticas, nosocomiais e ambulatoriais no Laboratório Regional da Ceilândia.
- Realizar técnicas moleculares de PCR convencional e PCR em tempo Real para avaliação do perfil de resistência antimicrobiana.
- Realizar análise estatísticas dos antimicrobianos sensíveis e resistentes das cepas analisadas com o auxílio do programa WHONET."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Riscos e benefícios, segundo o pesquisador:

"Riscos:

Não existem riscos iminentes de contaminação visto que as amostras serão processadas no Laboratório Regional da Ceilândia aonde já estão estabelecidas as normas de Biossegurança com a utilização de Equipamentos de Proteção Individual e Coletiva.

Beneficios:

Contribuir com informações clínicas e epidemiológicas sobre o perfil microbiano, bem como a utilização de antimicrobianos."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa trata de projeto de TCC apresentado pela orientadora para futura realização por aluno de graduação.

Critério de Inclusão: Serão incluídas no projeto as amostras de urina, secreção vaginal, secreção de orofaringe, ponta de cateter, líquidos corporais, hemocultura ou qualquer outro material biológico em que houver isolamento de microrganismos.

Critério de Exclusão: Amostras consideradas negativas serão excluídas da pesquisa.

As amostras serão provenientes de 100 participantes de pesquisa atendidos no Laboratório Regional da Ceilândia e no Laboratório do Hospital Regional da Ceilândia que se apresentarem para a realização dos exames laboratoriais.

Os usuários que levarem suas amostras ao laboratório serão convidados a participar pelos pesquisadores envolvidos. O Termo de Livre Consentimento e Esclarecido (TCLE) será aplicado pela equipe envolvida na pesquisa (estudantes de TCC, PIBIC e pela própria pesquisadora).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos apresentados em atendimento às pendências apontadas no parecer No. 1.061.262:

Carta em resposta às pendências apontadas pelo CEP - "Resposta Pendencia Maio 2015.pdf", postado em 18/05/2015;

Informações Básicas do Projeto - "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_414958.pdf", postado em 18/05/2015.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A Secretaria de Saúde foi incluída como instituição coparticipante vinculada ao CEP-FEPECS/SES-DF. PENDÊNCIA ATENDIDA

Não há mais pendências.

Protocolo de pesquisa em conformidade com a Resolução CNS 466/2012 e complementares.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

A realização das atividades do projeto na instituição coparticipante está condicionada à aprovação pelo CEP responsável, o CEP-FEPECS/SES-DF.

Em acordo com a Resolução 466/12 CNS, itens X.1.- 3.b. e XI.2.d, os pesquisadores responsáveis deverão apresentar relatórios parcial semestral e final do projeto de pesquisa, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa.

BRASILIA, 26 de Maio de 2015

Assinado por:
Marie Togashi
(Coordenador)

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsunb@gmail.com

9.2. Anexo 2

AVISO DE ALTERAÇÃO NO STATUS DO SEU TRABALHO

(Nr. de inscrição do participante: 00001392)

Prezado(a) Thaís Alves da Costa Lamounier,

O trabalho **Análise da frequência de cepas de Candida sp. isoladas nos laboratórios da rede pública e privada do Distrito Federal**, foi avaliado e seu status foi alterado para:

- Pôster: **Aceito**
- Apresentação Oral: **Recusado**
- Prêmio: **Recusado**

Visite o site oficial www.cbac.org.br para estar sempre atualizado sobre a programação científica e todas as novidades sobre o evento.

Outras informações:
E-mail: secretaria@lk.com.br
Tel.: (21) 3295 2800 / 3295 2815

Secretaria do 42º CBAC