

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Caroline Collioni Constante

**Candidemia por *Candida*
parapsilosis, *C. orthopsilosis* e *C.*
metapsilosis: Estudo dos Fatores de
Risco, Tipagem Molecular e
Suscetibilidade *In Vitro* a
Caspofungina.**

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2013

Caroline Collioni Constante

Candidemia por *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*: Estudo dos Fatores de Risco, Tipagem Molecular e Suscetibilidade *In Vitro* a Caspofungina.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Comarú Pasqualotto

Porto Alegre
2013

Agradecimentos

Ao meu orientador Alessandro C. Pasqualotto, pelos ensinamentos, oportunidade e paciência.

Aos colegas do laboratório de Biologia Molecular que contribuíram na realização deste trabalho.

Ao bolsista Alexandre Monteiro pelo empenho e participação nas técnicas moleculares.

Aos meus pais Odete e Hildo, e meu marido Fabio pelo incentivo, apoio e compreensão.

Sumário

Lista de abreviaturas	V
1. Introdução	1
1.1. Candidemia	2
1.2. Espécies de <i>candida</i>	3
1.3. <i>C. parapsilosis</i>	4
1.4. Fatores de risco de candidemia por <i>C. parapsilosis</i>	5
1.5. Perfil de suscetibilidade	7
1.6. As novas espécies: <i>Candida orthopsilosis</i> e <i>Candida metapsilosis</i>	9
1.6.1. Prevalência das novas espécies como causadoras de candidose	10
1.6.2. Métodos de diferenciação	10
1.6.3. Perfil de suscetibilidade	11
1.6.4. Perfil de virulência	12
1.6.5. Fatores de risco entre as espécies do complexo <i>C. parapsilosis</i>	14
1.7. Referências bibliográficas	16
2. Objetivos	23
3. Artigo científico redigido em inglês	24
4. Considerações finais	35
5. Anexos	37
5.1. Parecer do comitê de ética em Pesquisa da UFCSPA	37
5.2. Parecer do comitê de ética em Pesquisa ISCMPA	38
5.3. Protocolo de extração de DNA	40

5.4. Ficha de coleta de dados	43
5.5. Definições das variáveis	46

Lista de abreviaturas utilizadas

DNA: ácido desoxirribonucleico

IC: intervalo de confiança

ITS: *internal transcribed spacer*

LDH: lactato desidrogenase

MALDI-TOF: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight*

MIC: concentração inibitória mínima

mL: mililitro

µL: microlitro

OR: *odds ratio*

PCR: reação em cadeia da polimerase

RAPD: *randomly amplified polymorphic DNA*

RFLP: *restriction fragment length polymorphism*

R.P.M: rotações por minuto

TNF- α : *tumor necrosis factor alpha*

UTI: unidade de terapia intensiva

Resumo da Dissertação

Introdução: *Candida parapsilosis* é conhecida como uma importante causa de infecções da corrente sanguínea. Recentemente, *C. parapsilosis* foi dividida em três espécies distintas: *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Existe carência de dados clínicos e epidemiológicos destas espécies, e segundo alguns estudos prévios foi possível detectar que existem diferenças de suscetibilidade entre as espécies do complexo *Candida parapsilosis*.

Objetivos: Identificar variáveis que são fatores de risco para o desenvolvimento de candidemia pelas espécies do complexo *C. parapsilosis*, a prevalência de cada espécie e também avaliar a suscetibilidade *in vitro* a caspofungina.

Material e Métodos: Estudo de coorte retrospectivo. Os fatores de risco para candidemia foram analisados através da revisão de prontuários. Para identificação das espécies do complexo *C. parapsilosis* foi utilizado PCR em tempo real com sondas específicas (Molecular Beacons). A suscetibilidade á caspofungina foi determinada através da técnica de microdiluição em caldo.

Resultados: Dos 119 isolados incluídos no estudo, 83,3% foram identificados como *C. parapsilosis*, 15,0% *C. orthopsilosis* e 1,7% *C. metapsilosis*. Tumor sólido ($p=0,013$), uso prévio de beta-lactâmicos ($p<0,001$) e corticosteróides ($p=0,050$) foram fatores de risco associados com candidemia por *C. parapsilosis*, enquanto que insuficiência renal ($p<0,001$) e doença hepática crônica ($p=0,022$) foram fatores de risco associados com as espécies de *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. *C. parapsilosis* apresentou maiores MICs para caspofungina quando comparado com *C. orthopsilosis* ($p=0,036$).

Conclusões: A prevalência das novas espécies e o perfil de sensibilidade encontrada em nosso estudo foi semelhante à de estudos prévios. Nossos resultados também indicam que pacientes infectados por *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* apresentaram maior frequência de imunocomprometimento em comparação com *C. parapsilosis*, sugerindo reduzida virulência destas duas espécies. É de grande importância epidemiológica a identificação do complexo *C. parapsilosis*, pois existem diferenças entre estas espécies.

1. Introdução

Candida parapsilosis é uma importante causa de candidemia. (Pfaller e cols., 2000). Esta espécie é frequentemente relacionada com infecção da corrente sanguínea em pacientes recém-nascidos, imunodeprimidos e previamente tratados com antifúngicos, sendo também associada ao uso de dispositivos intravasculares e nutrição parenteral (Clark e cols., 2004; Almirante e cols., 2006).

Inicialmente, *C. parapsilosis* foi separada em três grupos, I-III (Lin e cols., 1995). No entanto, recentemente, através do sequenciamento de genes foi possível identificar que havia diferenças suficientes para a separação destes três grupos em novas espécies que são fortemente relacionadas: *C. parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis* (Tavanti e cols., 2005).

Embora ainda existam poucos estudos referentes a este tema, de modo que pouco se sabe sobre as diferenças dessas novas espécies do complexo *C. parapsilosis*, alguns estudos encontraram diferenças biológicas entre as espécies, incluindo a distribuição geográfica das mesmas, a suscetibilidade aos antifúngicos e a presença de fatores de virulência (Gácsér e cols., 2007; Gonçalves e cols., 2010; Orsi e cols., 2010; Ge e cols., 2011; Miranda-Zapico e cols., 2011).

1.1 Candidemia

Candidemia é definida como uma doença clínica associada à presença de leveduras do gênero *Candida* na corrente sanguínea. As infecções fúngicas que antes eram consideradas raras têm aumentado muito nas últimas décadas, especialmente a partir de 1980. Um levantamento epidemiológico nos Estados Unidos da América mostrou que entre os anos de 1979 e 2001, a infecção de corrente sanguínea causada por fungos aumentou em 207%. A maioria destas infecções, cerca de 80%, é causada por fungos pertencentes ao gênero *Candida*, patógenos que comumente afetam pacientes criticamente doentes (Martin e cols., 2003).

As espécies de *Candida* são o quarto organismo mais isolado em infecções de corrente sanguínea de ambiente hospitalar. No Brasil, as taxas de incidência variam de 1,66 a 2,49 casos por 1.000 admissões, números estes bem maiores (3 a 10 vezes) do que o encontrado em países do Hemisfério Norte (Colombo e cols., 2006; Colombo e cols., 2007).

As hemoculturas são o teste de primeira escolha no caso de suspeita de infecções de corrente sanguínea. As técnicas atuais usam meio de cultura processados e sistemas automatizados, que melhoraram consideravelmente a sensibilidade das culturas de sangue para a detecção de microorganismos. No entanto, a sensibilidade destas culturas para o diagnóstico de fungemia ainda é limitada, sendo estimada em 50-75% (Cuenca e cols., 2012). Após a positividade do frasco de hemocultura, esta amostra deve ser semeada em meio de cultura adequado e, após o crescimento de leveduras, são realizadas

provas de assimilação de carboidratos para identificação da espécie de *Candida*. Todo este processo costuma demorar diversos dias, levando a um diagnóstico tardio (Meyer e cols., 2004). As dificuldades diagnósticas e de tratamento colaboram para a alta taxa de mortalidade destas infecções (40-60%), que também estão associadas a um prolongado tempo de internação na unidade de terapia intensiva (UTI), resultando em aumento global dos custos hospitalares (Dimopoulos e cols., 2008; França e cols., 2008).

1.2 Espécies de *Candida* causadoras de infecção

Mais de 17 diferentes espécies de *Candida* foram relatadas como agentes etiológicos de candidose invasiva em humanos. Entretanto, cerca de 90% destas infecções são atribuídas a cinco espécies de *Candida*: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. As demais espécies, mesmo sendo consideradas agentes incomuns de candidemia, estão aumentando sua prevalência nos últimos anos; dentre elas, temos: *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. rugosa*, *C. kefyr*, *C. famata*, *C. inconspícua*, *C. norvegensis*, *C. lipolytica*, *C. zeylanoides* e *C. pelliculosa*, entre outras (Pfaller e cols., 2007a; Pfaller e cols., 2007b).

Muitos estudos têm sido desenvolvidos para documentar a epidemiologia da candidemia no Brasil (Pasqualotto e cols., 2008; Motta e cols., 2010; Nucci e cols., 2013). Investigações têm demonstrado resultados similares em diversas regiões do país: *C. albicans* é a causa mais comum de candidemia, responsável por aproximadamente metade dos casos, seguida por

C. parapsilosis (usualmente a segunda espécie em frequência, em especial na América Latina) e *C. tropicalis*. A proporção de casos de candidemia por *C. glabrata* permanece baixa, sendo na maioria dos estudos, inferior a 5% (Pasqualotto e cols., 2008; Motta e cols., 2010; Nucci e cols., 2013).

A emergência de espécies de *Candida* não-*C. albicans* como agentes de candidemia tem sido justificada pela pressão seletiva exercida pelo aumento do uso profilático e empírico de antifúngicos, potencialmente facilitando a proliferação de espécies resistentes, bem como pelo maior número de procedimentos médicos invasivos e de indivíduos imunossuprimidos vistos na prática clínica (Pfaller e cols., 2000; Presterll e cols., 2007; Dimopoulos e cols., 2008).

1.3 *Candida parapsilosis*

C. parapsilosis é considerada um patógeno exógeno, pois diferentemente das outras espécies de *Candida*, costuma causar infecções sem a colonização prévia de outros sítios, o que sugere que esta levedura possa ter acesso à corrente sanguínea diretamente de fontes ambientais, e também pelo fato de ser encontrado mais frequentemente na pele, ao invés de mucosas (Almirante e cols., 2006).

C. parapsilosis é conhecida por sua habilidade de formar biofilmes em cateteres ou outros dispositivos implantados, de ser facilmente transportado e espalhado pelas mãos colonizadas dos profissionais de saúde, por sua persistência no ambiente hospitalar, por estar associado com o uso de nutrição

parenteral e também por causar infecções em lactantes e neonatos (Pfaller e cols., 2008). Devido a sua origem exógena, as infecções por esta espécie poderiam ser prevenidas pela atenção às boas técnicas de controle de infecção, incluindo a higienização das mãos e adequada colocação e cuidados com cateter (Levin e cols., 1998).

1.4 Fatores de risco de candidemia por *C. parapsilosis*

Apenas poucos estudos têm avaliado os fatores de risco para candidemia por *C. parapsilosis*, utilizando análise multivariada. Segundo Almirante e cols. (2006) os fatores independentes para fungemia por *C. parapsilosis*, em comparação com *C. albicans*, incluíram pacientes neonatos (*odds ratio* [OR] 7,5; 95% intervalo de confiança [IC] 2,1-26,8), transplantados (OR 9,2; IC 95% 1,9-43,3), tratados previamente com antifúngicos (OR 5,4; IC 95% 1,8-15,9) ou necessitando de nutrição parenteral total (OR 2,2; IC 95% 1,09-4,6). Segundo Clark e cols. (2004), além da nutrição parenteral, a internação em UTI (OR 16,4; IC 95% 1,8-148,1) foi também considerada fator de risco independente para esta candidemia. Enquanto que para Weems e cols. (1987) foi encontrado como fator de risco apenas o uso de nutrição parenteral. Cateter venoso central não foi o principal fator de risco, segundo Krcmery e cols. (1998), em seu estudo com pacientes com câncer; os fatores de risco observados foram semelhantes aos descritos com outras fungemias, tais como a terapia antimicrobiana anterior, neutropenia e profilaxia prévia com azóis. Para Leven e cols. (1998), o uso de cateter venoso central implantável

ou semi-implantável foi a única variável associada com fungemia por *C. parapsilosis* ($p=0,016$); resultados semelhantes foram observados no estudo realizado por Hachem e cols. (2008), onde a presença de cateter foi fator de risco independente para candidemia por *C. parapsilosis*. Segundo Horasan e cols. (2010), a infecção por *C. parapsilosis* foi mais associada com cateter venoso central ($p=0,008$), e idade avançada ($p=0,039$), quando comparado com as demais espécies de *Candida*.

Em estudo realizado com crianças por Dotis e cols. (2012), a análise multivariada demonstrou que o único fator de risco independente para candidemia por *C. parapsilosis* foi a presença de ventilação mecânica 48 horas antes da infecção (OR 2,44; [95% CI 1,44–4,14; $p=0,001$]). Já o uso de cateter urinário uma semana antes da infecção mostrou reduzir o risco de desenvolvimento de candidemia devido a *C. parapsilosis*, quando comparado com as demais espécies de *Candida* (OR 0,37; 95% CI 0,19–0,72; $p=0,003$).

Os preditores independentes para mortalidade em pacientes com candidemia por *C. parapsilosis* parecem ter sido pouco estudados (Choi e cols., 2009; Leroy e cols., 2009). A maioria dos estudos avaliou preditores para morte em pacientes com candidemia causada por outras espécies, o que inclui variáveis como diabetes melito, imunossupressão, ventilação mecânica, temperatura corporal acima de 38,2°C (Leroy e cols., 2009), choque séptico, não retirada do cateter venoso central (Choi e cols., 2009), alto escore para APACHE II, terapia antifúngica inadequada e formação de biofilme por espécies de *C. parapsilosis* e *C. albicans* (Tumbarello e cols., 2007). As infecções por *C. parapsilosis* se associam com menor mortalidade, em

comparação com aquelas causadas por outras espécies de *Candida* (Tumbarello e cols., 2007).

1.5 Perfil de suscetibilidade

O perfil de resistência das espécies de *Candida* tem sido bem estudado. *C. parapsilosis* costuma apresentar boas taxas de sensibilidade aos principais antifúngicos utilizados na prática clínica (anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol e 5-flucitosina), podendo variar um pouco dependendo da região demográfica, mas na maioria dos locais estas cepas costumam apresentar sensibilidade aos antifúngicos superior a 95% (Pfaller e cols., 2000; Colombo e cols., 2006; Pfaller e cols., 2007a; Nucci e cols., 2013).

As equinocandinas são a mais nova classe de agentes antifúngicos; desde que foram introduzidas no manejo das candidoses invasivas, estas se mostraram drogas altamente eficazes, consideravelmente menos tóxicas do que anfotericina B, além de manter ação contra espécies de *Candida* resistentes aos azólicos (Brown e cols., 2003; Forrest e cols., 2008). As equinocandinas atualmente disponíveis são caspofungina, anidulafungina e micafungina. Equinocandinas são lipopeptídeos semissintéticos que atuam inibindo a síntese da parede celular do fungo através do bloqueio não competitivo da β -1,3-D-glucano sintetase, que é responsável pela formação de β -1,3-D-glucano, o polissacarídeo estrutural mais importante da parede da célula fúngica. O bloqueio desta enzima provoca uma instabilidade osmótica comprometendo a integridade da membrana destes micro-organismos, levando

a célula fúngica à morte. Esse mecanismo é extremamente peculiar porque a parede celular é um componente que está presente só no fungo, e isso garante uma seletividade de ação, com baixa toxicidade para humanos (Barchiesi e cols., 2007; Cortés e cols., 2011; Simon e cols., 2013).

Uma recente preocupação é o fato das espécies de *C. parapsilosis* demonstrarem suscetibilidade reduzida *in vitro* às equinocandinas (Pfaller e cols., 2007a; Pfaller e cols., 2008; Lockhart e cols., 2008). Esta redução está associada a mutações em duas regiões altamente conservadas do Fks1p, conhecidos como *hot spot 1* e *hot spot 2* que codificam uma importante subunidade da glucano sintase (Efron e cols., 2008). As concentrações inibitórias mínimas (MICs) das equinocandinas para *C. parapsilosis* costumam ser muito superiores àquelas observadas para *C. albicans* (Barchiesi e cols., 2006; Efron e cols., 2008).

Alguns estudos demonstraram que após o uso de caspofungina para tratamento empírico em suas instituições, ocorreu aumento de candidemia por espécies de *Candida* antes consideradas menos comuns, como *C. parapsilosis* (Forrest e cols., 2008; Kabbaraj e cols., 2008).

Embora *C. parapsilosis* seja naturalmente menos suscetível as equinocandinas do que as demais espécies de *Candida*, a maioria dos isolados permanece sensível a todas as três equinocandinas, sugerindo que estas espécies devem ser cuidadosamente monitoradas no que diz respeito à resistência emergente a equinocandinas (Pfaller e cols., 2008; Ostrosky-Zeichner e cols., 2003). Ainda, dados clínicos revelam resposta clínica similar

de *C. parapsilosis* às equinocandinas, em comparação com outras espécies de *Candida* (Reboli e cols., 2007; Colombo e cols., 2010).

1.6 As novas espécies no complexo *Candida parapsilosis*: *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis*

Na década de 1980, ocorreu um fato inusitado em uma instituição no Texas: documentou-se uma alta incidência de *C. parapsilosis* como agente etiológico das infecções hospitalares, excedendo as taxas de *C. albicans*. Devido a este fato, foi realizando uma investigação para ver a possibilidade de um surto de uma única fonte, onde foram obtidos os perfis isoenzimáticos dos isolados de *C. parapsilosis*. Ao invés disto, os resultados deste estudo mostraram que havia três grupos geneticamente distintos de *C. parapsilosis* entre os isolados clínicos (Lin e cols., 1995). Entretanto, recentemente, o sequenciamento de diversos genes mostraram diferenças suficientes que levaram à separação dos três grupos (I, II e III) previamente estabelecidos em novas espécies estreitamente relacionadas, são elas respectivamente: *C. parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis*, e *Candida metapsilosis*, que são, até o momento, fenotipicamente indistinguíveis (Tavanti e cols., 2005).

Os baixos níveis de variabilidade na sequência de DNA entre os isolados de *C. parapsilosis* e os relativamente altos níveis de heterogeneidade genética entre os isolados de *C. orthopsilosis*, sugerem que as espécies de *C. parapsilosis* podem ter evoluído muito recentemente a partir da *C. orthopsilosis* (Tavanti e cols., 2005).

1.6.1 Prevalência das novas espécies como causadoras de candidose

A prevalência encontrada para estas espécies de *Candida* é bastante semelhante em diversas regiões do mundo, sendo a *C. parapsilosis* a espécie mais comum, representando mais de 85% dos casos, seguidas pela *C. orthopsilosis*, com aproximadamente 10% e por fim *C. metapsilosis* com percentuais geralmente inferiores a 5% (Bonfietti e cols., 2012; Pemán e cols., 2012; Treviño-Rangel e cols., 2012). Poucos estudos têm demonstrado diferenças significantes nesta prevalência, como o conduzido por Ge e cols. (2012), onde foi encontrado que *C. parapsilosis* correspondeu a 71,9% dos isolados, enquanto que *C. metapsilosis* representou os 28,1% restantes, e não foi identificado *C. orthopsilosis*.

1.6.2 Métodos de diferenciação

Vários métodos moleculares já foram descritos para identificação das três espécies do complexo *C. parapsilosis*, entre eles o RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA*) (Toro e cols., 2011), RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) (Mirhendi e cols., 2010), sequenciamento do ITS (*internal transcribed spacer*) (Gonçalves e cols., 2010), PCR (*polymerase chain reaction*) multiplex em tempo real usando sondas específicas do tipo *molecular*

beacons (Garcia-Effron e cols. 2011), PCR em tempo real baseado em DNA mitocondrial (Souza e cols., 2012) e espectrometria de massa – MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight*) (Hendrickx e cols. 2011). Apesar de cada técnica apresentar suas particularidades, todas são boas ferramentas para a discriminação entre as espécies.

1.6.3 Perfil de suscetibilidade

A maioria dos estudos que avaliou o perfil de suscetibilidade *in vitro* das espécies do complexo *C. parapsilosis* para as equinocandinas, mostrou haver diferença entre as três espécies, sendo que a *C. parapsilosis* apresentou MICs mais elevados do que *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (Gomez-Lopez e cols., 2008; Van Asbeck e cols., 2008; Ge e cols., 2012). Em um estudo experimental realizado por Szilágyi e cols. (2012) foi encontrado que a eficácia da caspofungina foi maior contra *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, quando comparado com *C. parapsilosis*. Segundo Chen e cols. (2010), as cepas de *C. metapsilosis* apresentaram menores valores de MICs em 24h para caspofungina ($p < 0,01$) do que as de *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*. Neste estudo não houve diferença significativa entre os valores de MIC entre *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*. Entretanto, algumas pesquisas encontraram similares perfis de suscetibilidade para equinocandinas entre as três espécies do complexo *C. parapsilosis* (Gonçalves e cols., 2010; Treviño-Rangel e cols., 2012).

1.6.4 Perfil de virulência

Estudos têm demonstrado que *C. metapsilosis* é particularmente associada com virulência reduzida, em comparação com *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis* (Gácser e cols., 2007; Orsi e cols., 2010; Bertini e cols., 2013; Melo e cols., 2011; Sabino e cols., 2011). Bertini e cols (2013) avaliaram em um modelo *in vitro* de co-incubação com células epiteliais bucais humanas as propriedades adesivas de isolados clínicos pertencentes ao complexo *C. parapsilosis*; neste estudo, foi encontrado que os isolados de *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis* apresentaram semelhante propriedade de adesão, enquanto que *C. metapsilosis* mostrou reduzida habilidade para aderência nestas células em comparação com *C. parapsilosis* ($p < 0,05$). Apesar da atividade da ecto-fosfatase ter sido relacionada com a propriedade de adesão, neste estudo este fato não foi observado, o achado foi confirmado por experimentos de inibição da fosfatase. Ainda em um modelo experimental, foi induzida candidose vaginal com cepas das três espécies em ratos tratados com estrogênios, sendo observado que ratos infectados com *C. metapsilosis* exibiram reduzida carga fúngica, principalmente nas fases iniciais da infecção ($p < 0,005$).

No estudo *in vitro* realizado por Orsi e cols (2010), foi demonstrado que ao comparar a atividade anticandidal em células micróglia BV2 entre as três espécies, *C. metapsilosis* foi mais suscetível do que *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*, especialmente no ensaio de duas horas. *C. metapsilosis* foi também significativamente menos fagocitada do que *C. parapsilosis* e *C.*

orthopsilosis e mais propensa a acidificação intracelular das leveduras contendo fagolisossomos. Ainda, *C. metapsilosis* causou pouco ou nenhum dano às células micróglia, ao contrário do observado nas demais espécies do complexo. Com relação aos níveis de lactato desidrogenase (LDH), quando as células foram infectadas com as três espécies de *Candida* estudada, não houve variação nos níveis de LDH nas primeiras 24 horas, entretanto nas avaliações de 48 e 72 horas foi observado que existia uma relação tempo-dependente no aumento da atividade da LDH; em particular *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis* induziram os maiores e intermediários níveis de LDH respectivamente, enquanto que *C. metapsilosis* apresentou os menores níveis de LDH em todos os pontos analisados.

Em um estudo conduzido por Gácser e cols (2007) foram avaliados os danos celulares através de microscopia em tecidos reconstituídos infectados com leveduras. *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis* mostraram severa alteração morfológica e dano celular. As alterações celulares causadas por *C. metapsilosis* foram muito limitadas, não havia leveduras aderidas em células do tecido epitelial e a estrutura do tecido foi semelhante a do controle. Para quantificar a lesão celular, foram dosados os níveis de LDH lançado pelas espécies do grupo *C. parapsilosis* no sobrenadante de cultura de tecidos oral e de epiderme após 48 horas de incubação. *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis* tiveram níveis mais elevados de LDH, quando comparados com *C. metapsilosis*.

Sabino e cols (2011) mostraram que *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* foram menos citotóxica do que *C. parapsilosis*. E a produção de fator de

necrose tumoral alfa (TNF- α) foi significativamente menor ($p < 0,05$) entre as cepas de *C. metapsilosis* do que as demais representantes do complexo.

A capacidade das leveduras para formar biofilme é um dos seus mais importantes fatores de virulência, pois a formação deste facilita a colonização de implantes e ainda defende as leveduras do sistema imunológico do hospedeiro e contra a ação de antifúngicos. Com relação à formação de biofilme, existem divergências entre os estudos realizados até o momento, alguns encontraram que somente a *C. parapsilosis* foi capaz de produzir biofilme (Tavanti e cols., 2007; Tosun e cols., 2012), enquanto que outros mostraram que as espécies de *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* também possuem esta habilidade (Tavanti e cols., 2005; Lattif e cols., 2010). Em um estudo conduzido por Melo e cols (2011) foi demonstrado que apesar das três espécies possuírem capacidade de formação de biofilme, houve uma ordem na quantificação desta formação, sendo a *C. parapsilosis* com maior produção, seguida por *C. orthopsilosis* e por fim *C. metapsilosis*.

1.6.5 Fatores de risco entre as espécies do complexo *C. parapsilosis*

Em um estudo conduzido por Blanco-Blanco e cols (2013), o único até então a pesquisar fatores de risco para candidemia pelo complexo *C. parapsilosis*, foi demonstrado que fungemia por *C. orthopsilosis* foi relacionada principalmente com nutrição parenteral (100% dos pacientes que apresentaram *C. orthopsilosis* haviam feito uso prévio de nutrição parenteral), e recém-

nascidos (50% dos pacientes com *C. orthopsilosis* eram recém-nascidos). *C. parapsilosis sensu stricto*, no entanto, foi recuperada principalmente de pacientes com mais de 50 anos (69,2%) e apenas 46,1% estavam recebendo nutrição parenteral. Neste estudo, o único fator de risco que foi estatisticamente significativo para candidemia por *C. orthopsilosis* foi o uso de nutrição parenteral ($p=0,02$).

Referencias bibliográficas

Almirante B, Rodríguez D, Cuenca-Estrella M, Almela M, Sanchez F, Ayats J, *et al.* Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control populations-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol.* 2006 May;44(5):1681-5.

Barchiesi F, Spreghini E, Tomassetti S, Giannini D, Scalise G. Caspofungin in combination with Amphotericin B against *Candida parapsilosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Mar;51(3):941-5.

Barchiesi F, Spreghini E, Tomassetti S, Della Vittoria A, Arzeni D, Manso E, *et al.* Effects of caspofungin against *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Aug;50(8):2719-27.

Bertini A, De Bernardis F, Hensgens LA, Sandini S, Senesi S, Tavanti A. Comparison of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* adhesive properties and pathogenicity. *Int J Med Microbiol.* 2013 Mar;303(2):98-103.

Blanco-Blanco MT, Gómez-García AC, Hurtado C, Galán-Ladero MA, Lozano MC, García-Tapias A, *et al.* *Candida orthopsilosis* fungemias in a Spanish tertiary care hospital: Incidence, epidemiology and antifungal susceptibility. *Rev Iberoam Micol.* 2013 May 13. pii: S1130-1406(13)00043-0. doi:10.1016/j.riam.2013.04.001

Bonfietti LX, Martins Mdos A, Szeszs MW, Pukiskas SB, Purisco SU, Pimentel FC, *et al.* Prevalence, distribution and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* bloodstream isolates. *J Med Microbiol.* 2012 Jul;61(Pt 7):1003-8.

Brown AL, Greig JR. Caspofungin versus amphotericin B for invasive candidiasis. *N Engl J Med.* 2003 Mar 27;348(13):1287-8.

Chen YC, Lin YH, Chen KW, Lii J, Teng HJ, Li SY. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010 Nov;68(3):284-92.

Choi HK, Jeong SJ, Lee HS, Chin BS, Choi SH, Han SH, *et al.* Blood stream infections by *Candida glabrata* and *Candida krusei*: A single-center experience. *Korean J Intern Med.* 2009 Sep;24(3):263-9.

Clark TA, Slavinski SA, Morgan J, Lott T, Arthington-Skaggs BA, Brandt ME, *et al.* Epidemiologic and Molecular Characterization of an Outbreak of *Candida*

parapsilosis Bloodstream Infections in a Community Hospital. J Clin Microbiol. 2004 Oct;42(10):4468-72.

Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, *et al.* Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. J Clin Microbiol. 2006 Aug;44(8):2816-23.

Colombo AL, Guimarães T, Silva LR, de Almeida Monfardini LP, Cunha AK, Rady P, *et al.* Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. Infect Control Hosp Epidemiol. 2007 May;28(5):570-6.

Colombo AL, Ngai AL, Bourque M, Bradshaw SK, Strohmaier KM, Taylor AF, *et al.* Caspofungin use in patients with candidiasis caused by common non-albicans *Candida* species: review of the caspofungin database. Antimicrob Agents Chemother. 2010 May;54(5):1864-71.

Cortés L JA, Russi N JA. Echinocandins. Rev Chilena Infectol. 2011 Dec;28(6):529-36.

Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, Bille J, Donnelly JP, *et al.* ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. Clin Microbiol Infect. 2012 Dec;18 Suppl 7:9-18

Dimopoulos G, Ntziora F, Rachiotis G, Armaganidis A, Falagas ME. *Candida albicans* versus non-albicans intensive care unit-acquired bloodstream infections: differences in risk factors and outcome. Anesth Analg. 2008 Feb;106(2):523-9

Dotis J, Prasad PA, Zaoutis T, Roilides E. Epidemiology, risk factors and outcome of *Candida parapsilosis* bloodstream infection in children. Pediatr Infect Dis J. 2012 Jun;31(6):557-60.

Effron GG, Katiyar SK, Park S, Edlind TD, Perlin DS. A Naturally Occurring Proline-to-Alanine Amino Acid Change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* Accounts for Reduced Echinocandin Susceptibility. Antimicrob agents and chemother. 2008 Jul;52:2305-12.

França JCB, Ribeiro CEL, Telles FQ. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. Rev Soc Bras Med Trop. 2008 Jan-Feb;41(1):23-8.

Forrest GN, Weekes E, Johnson JK. Increasing incidence of *Candida parapsilosis* candidemia with caspofungin usage. J Infect. 2008 Feb;56:126-9.

Gácsér A, Schäfer W, Nosanchuk JS, Salomon S, Nosanchuk JD. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet Biol*. 2007 Dec;44(12):1336-41.

Garcia-Effron G, Canton E, Pemán J, Dilger A, Romá E, Perlin DS. Assessment of two new molecular methods for identification of *Candida parapsilosis sensu lato* species. *J Clin Microbiol*. 2011 Sep;49(9):3257-61.

Ge YP, Lu GX, Shen YN, Liu WD. In Vitro Evaluation of Phospholipase, Proteinase, and Esterase Activities of *Candida parapsilosis* and *Candida metapsilosis*. *Mycopathologia*. 2011 Dec;172(6):429-38.

Ge YP, Boekhout T, Zhan P, Lu GX, Shen YN, Li M, *et al*. Characterization of the *Candida parapsilosis* complex in East China: species distribution differs among cities. *Med Mycol*. 2012 Jan;50(1):56-66.

Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Rodriguez D, Almirante B, Pahissa A, Rodriguez-Tudela JL, *et al*. Prevalence and Susceptibility Profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: Results from Population-Based Surveillance of Candidemia in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Apr;52(4):1506-9.

Gonçalves SS, Amorim CS, Nucci M, Padovan AC, Briones MR, Melo AS, *et al*. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. *Clin Microbiol Infect*. 2010 Jul;16(7):885-7.

Hachem R, Hanna H, Kontoyiannis D, Jiang Y, Raad I. The changing epidemiology of invasive candidiasis *Candida Glabrata* and *Candida Krusei* as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy. *Cancer* 2008 Jun;112(11):2493-9.

Hendrickx M, Goffinet JS, Swinne D, Detandt M. Screening of strains of the *Candida parapsilosis* group of the BCCM/IHEM collection by MALDI-TOF MS. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 Aug;70(4):544-8.

Horasan ES, Ersöz G, Göksu M, Otag F, Kurt AO, Karaçorlu S, *et al*. Increase in *Candida parapsilosis* fungemia in critical care units: a 6-years study. *Mycopathologia*. 2010 Oct;170(4):263-8.

Kabbaraj N, Lacroix C, Peffault de Latour R, Socié G, Ghannoum M, Ribaud P. Breakthrough *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii* blood stream infections in allogenic hematopoietic stem cell transplant recipients receiving long-term caspofungin therapy. *Hematologica*. 2008 Apr;93:639-640.

Krcméry V Jr, Spánik S, Grausová S, Trupl J, Krupová I, Roidová A, *et al*. *Candida parapsilosis* fungemia in cancer patients--incidence, risk factors and outcome. *Neoplasma* 1998;45(5):336-42.

Lattif AA, Mukherjee PK, Chandra J, Swindell K, Lockhart SR, Diekema DJ, *et al.* Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*. *Int J Med Microbiol.* 2010 Apr;300(4):265-70.

Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, Mira JP, Gouin F, Sollet JP, *et al.* Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med.* 2009 May;37(5):1612-8.

Leven AS, Costa SF, Mussi NS, Basso M, Sinto SI, Machado C, *et al.* *Candida parapsilosis* Fungemia Associated with Implantable and Semi-Implantable Central Venous Catheters and the Hands of Healthcare Workers. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998 Apr;30(4):243-9.

Lin D, Wu LC, Rinaldi MG, Lehmann PF. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *J Clin Microbiol.* 1995 Jul;33(7):1815-21.

Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. Geographic Distribution and Antifungal Susceptibility of the Newly Described Species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in Comparison to the Closely Related Species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol.* 2008 Aug; 46:2659-64.

Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J. Med.* 2003 Apr 17;348(16):1546-54.

Melo AS, Bizerra FC, Freymüller E, Arthington-Skaggs BA, Colombo AL. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. *Med Mycol.* 2011 Apr;49(3):253-62.

Meyer MH, Letscher-Bru V, Jaulhac B, Waller J, Candolfi E. Comparison of Mycosis IC/F and Plus Aerobic/F Media for Diagnosis of Fungemia by the Bactec 9240 System. *J Clin Microbiol.* 2004 Feb;42(2):773-7.

Motta AL, Almeida GM, Almeida Júnior JN, Burattini MN, Rossi F. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. *Braz J Infect Dis.* 2010 Sep-Oct;14(5):441-8.

Miranda-Zapico I, Eraso E, Hernández-Almaraz JL, López-Soria LM, Carrillo-Muñoz AJ, Hernández-Molina JM, *et al.* Prevalence and antifungal susceptibility patterns of new cryptic species inside the species complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a Spanish tertiary hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Oct;66(10):2315-22.

Mirhendi H, Bruun B, Schønheyder HC, Christensen JJ, Fursted K, Gahrn-Hansen B, *et al.* Molecular screening for *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* among Danish *Candida parapsilosis* group blood culture isolates:

proposal of a new RFLP profile for differentiation. J Med Microbiol. 2010 Apr;59(Pt 4):414-20.

Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, *et al.* Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. PLoS ONE. 2013 Mar 19; 8(3): e59373. doi:10.1371/journal.pone.0059373.

Orsi CF, Colombari B, Blasi E. *Candida metapsilosis* as the least virulent member of the '*C. parapsilosis*' complex. Med Mycol. 2010 Dec;48(8):1024-33.

Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Pappas PG, Hamill RJ, Larsen RA, Horowitz HW, *et al.* Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Oct;47(10):3149-54.

Pasqualotto AC, Zimmerman RA, Alves SH, Aquino VR, Branco D, Wiltgen D, *et al.* Take Control over your fluconazole prescriptions: the growing importance of *Candida glabrata* as an agent of candidemia in Brazil. Infect Control Hosp Epidemiol. 2008 Sep;29(9):898-9.

Pemán J, Cantón E, Quindós G, Eraso E, Alcoba J, Guinea J, *et al.* Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. J Antimicrob Chemother. 2012 May;67(5):1181-7.

Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Messer SA, Houston A, *et al.* Bloodstream Infections Due to *Candida* Species: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in North America and Latin America, 1997-1998. Antimicrob Agents Chemother. 2000 Mar;44(3):747-51.

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Meis JF, Gould IM, *et al.* Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2005: an 8.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species and Other Yeast Species to Fluconazole and Voriconazole Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion Testing. J Clin Microbiol. 2007 Jun;45(6):1735-45(a).

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev. 2007 Jan;20(1):133-63 (b).

Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, *et al.* *In vitro* Susceptibility of Invasive Isolates of *Candida* spp. to Anidulafungin, Caspofungin, and Micafungin: Six Years of Global Surveillance. J Clin Microbiol 2008 Jan; 46:150-6.

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ng KP, Colombo A, *et al.* Geographic and Temporal Trends in Isolation and Antifungal Susceptibility of *Candida parapsilosis*: a Global Assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. J Clin Microbiology. 2008 Mar;46(3):842-9.

Presterl E, Daxböck F, Graninger W, Willinger B. Changing pattern of candidemia 2001-2006 and use of antifungal therapy at the Hospital of Vienna, Austria. *Clin Microbiol Infect.* 2007 Nov;13(11):1072-6.

Reboli AC, Rotstein C, Pappas PG, Chapman SW, Kett DH, Kumar D, *et al.* Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis. *N Engl J Med.* 2007 Jun 14;356(24):2472-82.

Sabino R, Sampaio P, Carneiro C, Rosado L, Pais C. Isolates from hospital environments are the most virulent of the *Candida parapsilosis* complex. *BMC Microbiol.* 2011 Aug 8;11:180.

Simon J, Sun HY, Leong HN, Barez MY, Huang PY, Talwar D, *et al.* Echinocandins in invasive candidiasis. *Mycoses.* 2013 May 7.

Souza ACR, Ferreira RC, Gonçalves SS, Quindós G, Eraso E, Bizerra FC, *et al.* Accurate Identification of *Candida parapsilosis* (*Sensu Lato*) by Use of Mitochondrial DNA and Real-Time PCR. *J Clin Microbiol.* 2012 Jul; 50(7): 2310–2314.

Szilágyi J, Földi R, Gesztelyi R, Bayegan S, Kardos G, Juhász B, *et al.* Comparison of the Kidney Fungal Burden in Experimental Disseminated Candidiasis by Species of the *Candida parapsilosis* Complex Treated with Fluconazole, Amphotericin B and Caspofungin in a Temporarily Neutropenic Murine Model. *Chemotherapy.* 2012 May;58(2):159-64.

Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To Replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. *J Clin Microbiol.* 2005 Jan;43(1):284-92.

Tavanti A, Hensgens LA, Ghelardi E, Campa M, Senesi S. 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 May;45(5):1455-62.

Toro M, Torres MJ, Maite R, Aznar J. Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Mar;17(3):418-24.

Tosun I, Akyuz Z, Guler NC, Gulmez D, Bayramoglu G, Kaklikkaya N, *et al.* Distribution, virulence attributes and antifungal susceptibility patterns of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from clinical samples. *Med Mycol.* 2013 Jul;51(5):483-92

Treviño-Rangel Rde J, Garza-González E, González JG, Bocanegra-García V, Llaca JM, González GM. Molecular characterization and antifungal susceptibility of the *Candida parapsilosis* species complex of clinical isolates from Monterrey, Mexico. *Med Mycol.* 2012 Oct;50(7):781-4.

Tumbarello M, Posteraro B, Treccarichi EM, Fiori B, Rossi M, Porta R, *et al.* Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as

predictors of mortality for patients with candidemia. *J Clin Microbiol.* 2007 Jun;45(6):1843-50.

Van Asbeck E, Clemons KV, Martinez M, Tong AJ, Stevens DA. Significant differences in drug susceptibility among species in the *Candida parapsilosis* group. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008 Sep;62(1):106-9.

Weems JJ Jr, Chamberland ME, Ward J, Willy M, Padhye AA, Solomon SL. *Candida parapsilosis* Fungemia Associated with Parenteral Nutrition and Contaminated Blood Pressure Transducers. *J Clin Microbiol.* 1987 Jun;25(6):1029-32.

2. Objetivos

O objetivo principal deste estudo foi o de identificar variáveis que fossem fatores de risco para o desenvolvimento de candidemia para as espécies pertencendo ao complexo *C. parapsilosis*.

Os objetivos específicos deste projeto foram:

- a) Determinar a prevalência de cada espécie do complexo *C. parapsilosis*;
- b) Comparar a mortalidade geral em 30 dias entre os pacientes com candidemia causada pelo complexo *C. parapsilosis*;
- c) Avaliar a sensibilidade *in vitro* (MIC) de *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* à equinocandina caspofungina.

Different risk factors for candidemia occur for *Candida* species belonging to the *C. parapsilosis* complex

Constante CC,^a Monteiro AA,^a Alves SH,^b Carneiro LC,^a Machado MM,^a Severo LC,^c Park S,^d Perlin DS,^d Pasqualotto AC^{a,c,#}

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Brazil^a;
Universidade Federal de Santa Maria, Brazil^b; Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Brazil^c; Public Health Research Institute (PHRI), New Jersey Medical School-UMDNJ, NJ, USA^d

Running title: candidemia by *Candida parapsilosis* complex

Address correspondence to Alessandro C. Pasqualotto,
pasqualotto@ufcspa.edu.br.

Submetido para revista Medical Mycology

ABSTRACT

Previous studies showed reduced virulence for some species belonging to the *C. parapsilosis* complex. We studied patients with candidemia caused by *C. parapsilosis* complex over a seven-year period (n=119). Renal failure (p <0.001) and chronic liver disease (p=0.022) were found to be risk factors for *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*; solid tumor (p=0.013), prior use of corticosteroids (p=0.050) and beta-lactam (p <0.001) were risk factors for *C. parapsilosis*. *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis* infections were associated at a greater frequency with immunocompromised patients than *C. parapsilosis sensu stricto*.

Introduction

C. parapsilosis is one of the most frequent *Candida* species causing candidemia [1, 2]. Recently the *C. parapsilosis* complex was divided into three species: *C. parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* [3]. The importance of proper speciation in the *C. parapsilosis* complex has been justified by species variability in virulence and drug susceptibility [4-6]. Here we investigated whether there is any difference in risk factors for candidemia in patients infected by these three species.

Materials and methods

Isolates of *C. parapsilosis* recovered from blood culture in a 1,200-bed Brazilian tertiary hospital were studied (2004-2010). Fungal isolates were originally identified at the species level with ID32C (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France). Only the incident yeast recovered from blood was studied. Clinical notes of patients were reviewed, in order to determine risk factors for candidemia presented in the 30 days preceding the infection. Microbiological data, severity of illness and the outcome of candidemia were also studied.

DNA was extracted using the fast small scale isolation protocol, as described elsewhere [7]. RNA was removed by treatment with RNase A (Pharmacia[®]) for 1 h at 37°C. Species in the *C. parapsilosis* complex were differentiated by real-time PCR (Applied Biosystems 7500) using specific probes (molecular beacons; MB). Reactions were performed in a 25µL mixture that consisted of 12.5µL of Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen), 0.4µM of each primer (ITS-R:5'-GAGTTTAATCTCTGGCAGGC-3'; ITS-F:5'-GCGGAAGGATCATTACAGAA-3'), 4mM MgCl₂, and 0.5µM of MB C.

parapsilosis (5'd FAM–CGCGATTTTCTTACACATGTGTTTTTATCGCG–BHQ–13), in addition to 2µL of extracted DNA. Positive and negative controls were used in every reaction. Samples that tested negative for *C. parapsilosis sensu stricto* were evaluated in simplex PCR tests containing MBs for the *C. orthopsilosis* (0.5µM of 5'd CAL Fluor Red 610–CGCGATTTTACACATGTGTTTTTCTATCGCG–BHQ–23') or *C. metapsilosis* (0.8µM of 5'd Quasar 670–CGCGATCCTTTTCTTTCTACACATGTATCGCG–BHQ–23'). All thermal cycling conditions were as follows: 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, and 45 cycles of 30 sec at 95°C, 30 sec at 50°C, and 30 sec at 72°C.

Caspofungin was obtained as standard powders from its manufacturer. Susceptibility testing was performed using CLSI M27-A3 broth microdilution (BMD) method. *C. parapsilosis* ATCC 22019 and *C. krusei* ATCC 6258 were used as control organisms for all experiments. We used clinical breakpoints to define *C. parapsilosis* complex isolates as susceptible to echinocandins (MIC values of ≤4µg/mL) [8].

The chi-square test or Fisher's exact test were used to compare qualitative variables and quantitative data was analyzed with the Mann-Whitney U test with SPSS v.16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). *P* values of <0.05 were considered statistically significant.

Results

From the 119 isolates included in the study, 99 (83.3%) were identified as *C. parapsilosis*, 18 (15.0%) were *C. orthopsilosis* and 2 (1.7%) were *C. metapsilosis*. The clinical notes of 93 patients were available for review. As

shown in Table 1, marked variations occurred in risk factors for candidemia for these patients infected by different species in the *C. parapsilosis* complex. Renal failure ($p < 0.001$) and chronic liver disease ($p = 0.022$) were risk factors for *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*, while solid tumor ($p = 0.013$), prior use of corticosteroids ($p = 0.050$) and β -lactam ($p < 0.001$) were risk factors for *C. parapsilosis*. No difference was observed in terms of disease severity, as determined by the APACHE II score (for adults; $p = 0.614$), PRISM III score (for children; $p = 0.842$), presentation with septic shock ($p = 1.000$), admission to the intensive care unit ($p = 0.833$), and overall in-hospital mortality ($p = 0.580$).

Differences in susceptibility to caspofungin were also found within the *C. parapsilosis* complex. Higher MICs were observed for *C. parapsilosis* (median 0.5; interquartile range, IQR, 0.5-1.0) relative to *C. orthopsilosis* (median 0.5; IQR 0.25-0.5; $p = 0.036$). MIC results were similar between *C. parapsilosis sensu stricto* and *C. metapsilosis* (median 0.75; IQR 0.5-1.0; $p = 0.761$). All isolates were found to be susceptible to caspofungin.

Discussion

Until very recently virtually nothing was known about risk factors for candidemia related to each of the *Candida* species in the *C. parapsilosis* complex. The only study published so far found that parenteral nutrition increased the risk for candidemia caused by *C. orthopsilosis*. However, this study did not investigate the potential role of additional risk factors such as underlying diseases, as evaluated by us [9]. Previous studies have shown that *C. metapsilosis* was associated with reduced virulence, in comparison to *C.*

orthopsilosis and *C. parapsilosis*, and may reflect a diminished ability to adhere to epithelial cells [10]. Also, *C. metapsilosis* has limited ability to produce tissue damage, and culture supernatants produce lower levels of lactate dehydrogenase [4,5] and tumor necrosis factor- α [11]. Accordingly, the frequency of *C. metapsilosis* as the agent of candidemia within the *C. parapsilosis* complex in different studies has been quite low [6,12,13]. On the other hand, *C. parapsilosis sensu stricto* has the greatest ability to form a biofilm [14]. *C. orthopsilosis* appears to have similar virulence properties to *C. parapsilosis sensu stricto*, even though limited data is available to this respect [4,5,10]. Our data indicate that patients infected by both *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis* demonstrate a higher frequency of immunocompromising conditions, in comparison to *C. parapsilosis sensu stricto*, suggesting reduced virulence for the first two species. As shown in this study, patients infected by different species in the *C. parapsilosis* complex had similar disease severity.

In this work, as in previous studies [6, 15] *C. parapsilosis* was shown higher MICs *in vitro* to caspofungin than *C. orthopsilosis sensu stricto*. In a pharmacodynamic study involving an experimental murine candidiasis, caspofungin efficacy against *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* was higher than against *C. parapsilosis* [13]. *C. metapsilosis* shows significantly lower MIC values to caspofungin ($p < 0.01$), in comparison to *C. parapsilosis sensu stricto* and *C. orthopsilosis* [16]. In contrast, *C. parapsilosis sensu stricto* and *C. orthopsilosis* showed similar *in vitro* susceptibility profiles to caspofungin [11, 17]. Despite differences in MIC, all isolates collected over a seven-year period in our study were susceptible to caspofungin.

Some limitations of this study deserve mention. Due to its retrospective nature some medical files were missing. The reason why caspofungin was the only echinocandin evaluated in our study was because other drugs in the class were not available in the Brazilian market at the time the study was planned.

In conclusion, this study demonstrating that patients with candidemia caused by *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis* have different predisposing conditions to the bloodstream infection, in comparison to those infected by *C. parapsilosis sensu stricto*. These data reinforce the importance of performing a proper speciation in the *C. parapsilosis* complex.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by an independent research grant by Merck Sharp & Dohme (MSD) to A.C.P. and Pfizer to D.S.P.

CONFLICT OF INTEREST

We do not have any potential conflicts of interests related particularly to this article. A.C.P. has received research grants and given paid talks on behalf of Pfizer, United Medical (Gilead), Astellas, and MSD. D.S.P. has grant support from Merck, Pfizer, and Astellas and serves on advisory committees for these companies. His lab is also funded by NIH grant AI066561. None of the other authors has a conflict of interest to declare.

REFERENCES

1. Antunes AG, Pasqualotto AC, Diaz MC, *et al.* Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Inst. Med. Trop. de São Paulo.* 2004; **46**: 239-241.
2. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, *et al.* Bloodstream Infections Due to *Candida* Species: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; **44**: 747-751.
3. Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR, *et al.* *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To Replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. *J. Clin. Microbiol.* 2005; **43**: 284-292.
4. Orsi CF, Colombari B, Blasi E. *Candida metapsilosis* as the least virulent member of the '*C. parapsilosis*' complex. *Med. Mycol.* 2010; **48**: 1024-1033.
5. Gácsér A, Schäfer W, Nosanchuk JS, *et al.* Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet. Biol.* 2007; **44**:1336-1341.
6. Gomez-Lopez A, Lastruey-Izquierdo A, Rodriguez D, *et al.* Prevalence and Susceptibility Profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: Results from Population-Based Surveillance of Candidemia in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; **52**: 1506–1509.
7. Melo AS, de Almeida LP, Colombo AL, *et al.* Evolutionary distances and identification of *Candida* species in clinical isolates by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Mycopathologia.* 1998; **142**: 57-66.

8. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts—3rd ed CLSI document M27-S3. 2008.
9. Blanco-Blanco MT, Gómez-García AC, Hurtado C, *et al.* *Candida orthopsilosis* fungemias in a Spanish tertiary care hospital: Incidence, epidemiology and antifungal susceptibility. *Rev Iberoam Micol.* 2013; May 13. pii: S1130-1406(13)00043-0. doi:10.1016/j.riam.2013.04.001
10. Bertini A, de Bernardis F, Hensgens LAM, *et al.* Comparison of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* adhesive properties and pathogenicity. *Int. J. Med. Microbiol.* 2013; doi: 10.1016/j.ijmm.2012.12.006.
11. Sabino R, Sampaio P, Carneiro C, *et al.* Isolates from hospital environments are the most virulent of the *Candida parapsilosis* complex. *BMC Microbiol.* 2011; 11:180. doi: 10.1186/1471-2180-11-180.
12. Gonçalves SS, Amorim CS, Nucci M, *et al.* Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010; **16**: 885–887.
13. Szilágyi J, Földi R, Gesztelyi R, *et al.* Comparison of the Kidney Fungal Burden in Experimental Disseminated Candidiasis by Species of the *Candida parapsilosis* Complex Treated with Fluconazole, Amphotericin B and Caspofungin in a Temporarily Neutropenic Murine Model. *Chemotherapy.* 2012; **58**: 159-164.

14. Tosuni I, Akyuz Z, Guler NC, *et al.* Distribution, virulence attributes and antifungal susceptibility patterns of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from clinical samples. *Med. Mycol.* 2012; doi: 10.3109/13693786.2012.745953.
15. Asbeck EV, Clemons KV, Martinez M, *et al.* Significant differences in drug susceptibility among species in the *Candida parapsilosis* group. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; **62**: 106-109.
16. Chen YC, Lin YH, Chen KW, *et al.* Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in Taiwan. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 2010; **68**: 284-292.
17. Treviño-Rangel Rde J, Garza-González E, González JG, *et al.* Molecular characterization and antifungal susceptibility of the *Candida parapsilosis* species complex of clinical isolates from Monterrey, Mexico. *Med. Mycol.* 2012; **50**:781-784.

Table 1. Comparison of risk factors for candidemia among species belonging to the *Candida parapsilosis* complex.

Variables	<i>Candida</i>	<i>Candida orthopsilosis</i> (n=17)	p value
	<i>parapsilosis</i> (n=75)	and <i>Candida metapsilosis</i> (n=1)	
Renal failure	19 (25.3%)	13 (72.2%)	<0.001
Chronic liver disease	1 (1.3%)	3 (16.7%)	0.022
Solid tumor	32 (42.7%)	2 (11.1%)	0.013
β -lactam antibiotic use	60 (80.0%)	6 (33.3%)	<0.001
Use of corticosteroids	26 (34.7%)	2 (11.1%)	0.050

Data presented as n (%).

4. Considerações finais

A ocorrência de infecções fúngicas da corrente sanguínea tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, e destas cerca de 80% são causadas por leveduras do gênero *Candida*. *C. parapsilosis* tem emergido como um importante patógeno fúngico, é a segunda espécie de *Candida* mais frequente na América Latina e tem demonstrado MICs maiores que outras espécies de *Candida* às equinocandinas. Recentemente, *C. parapsilosis* foi diferenciada em mais duas espécies *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*.

Pouco se sabia até então sobre a existência de diferentes condições predisponentes em pacientes com candidemia causada pelas espécies do complexo *C. parapsilosis*. O único estudo até agora publicado encontrou que apenas o uso de nutrição parenteral seria fator de risco para candidemia por *C. orthopsilosis*; no entanto, não foram avaliadas doenças de base como as demonstradas como fator de risco na nossa pesquisa. No nosso estudo, embora não se tenha encontrado diferença na severidade da doença e na mortalidade causada por estas espécies, foi demonstrado que existem diferentes condições predisponentes para candidemia entre elas.

Ainda no nosso meio não havia sido realizado estudo *in vitro* de suscetibilidade à caspofungina, a única equinocandina disponível no Brasil no momento da realização do estudo, e de acordo com alguns estudos prévios encontramos que existe diferença com relação aos MIC quando comparado *C.*

orthopsilosis e *C. parapsilosis*, sendo que esta última possui MICs mais elevados.

A adequada caracterização das espécies pertencentes ao complexo *C. parapsilosis* se justifica pela carência de dados epidemiológicos referentes ao tema, bem como pelos resultados discordantes observados em alguns estudos que avaliaram a sensibilidade *in vitro* das mesmas às equinocandinas.

Como perspectivas desta pesquisa, precisamos considerar que, neste estudo, devido a sua natureza retrospectiva, houve perda de informação de prontuários; assim, o seguimento deste, com um número maior de amostras pode vir a contribuir para um melhor conhecimento destas novas espécies, pois um número mais representativo de amostras de *C. metapsilosis* permitiria uma avaliação mais adequada das diferenças clínicas entre elas. Também poderia ser avaliada a suscetibilidade *in vitro* das outras duas equinocandinas disponíveis atualmente no mercado brasileiro, já que esta classe antifúngica está sendo amplamente utilizada atualmente. Também seria importante que os laboratórios liberassem o resultado como complexo *C. parapsilosis*, e não apenas *C. parapsilosis*, devido ao fato de que às novas espécies não podem ser diferenciadas fenotipicamente.



UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Protocolo para apresentação de Projeto de Pesquisa aprovado pelo
CEP ISCMPA

Data de recebimento CEP UFCSPA	Número
23/05/2011	004/11

Nome do projeto: Candidemia por *Cândida parapsilosis*: Estudo dos fatores de risco, preditores de mortalidade, tipagem molecular e susceptibilidade *in vitro* à Caspofungina.

Autores: Alessandro Pasqualotto, Cristine Souza Goebel, Alexandre Monteiro e Caroline Constante

Protocolo: 3173/09

Parecer: 545/09

Data de Aprovação no CEP ISCMPA: 24/02/2010

Situação: Homologado

Data: 25/05/2011

[Assinatura]
Dora Gerardo Veiros Tabares
Coordenadora do CEP UFCSPA



Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Rua Pez, Anjos D'Ára, 295 – Telefone: (51) 3214.8080 – Fax: (51) 3214.8585
 CEP 90024-000 - Porto Alegre – Rio Grande do Sul – CNPJ: 92815000/0001-68
 2009 – www.santacasa.org.br – E-mail: marketing@irmandadescma.br



PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer Complementar II nº 545/09

Protocolo nº 3173/09

Título: “*Candidemia por *Cândida parapsilosis*: Estudo dos fatores de risco, preditores de mortalidade, tipagem molecular e suscetibilidade *in vitro* à caspofungina*”.

Pesquisador Responsável: Alessandro Comaró Pasqualotto

Instituição onde se realizará – Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

Data de Entrada: 05/10/2009

II – Objetivos – Objetivo Geral: O objetivo deste estudo é identificar variáveis que são fatores de risco independentes para o desenvolvimento de candidemia por *C. parapsilosis*.

Objetivos Específicos:

- Comparar a mortalidade geral em 30 dias entre os pacientes com candidemia causada por *C. parapsilosis* e outras espécies de *Candida*;
- Determinar os preditores independentes de mortalidade em pacientes com candidemia por *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. ortopsilosis*;
- Avaliar a sensibilidade *in vitro* (MIC) de *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. ortopsilosis* à equinocandina caspofungina.

III – Sumário do Projeto

Descrição e caracterização da amostra: Estudo de coorte retrospectivo. Serão considerados para o estudo todos os casos de candidemia ocorridos no Complexo Hospitalar da Santa Casa durante o período compreendido entre fevereiro de 1995 a fevereiro de 2009. Neste estudo será analisada toda a população de pacientes, tanto adultos como pediátricos, que tiverem diagnóstico de candidemia durante este período.

Critérios de inclusão e exclusão: Para inclusão neste estudo, os pacientes deverão ter sinais e sintomas temporalmente relacionados ao diagnóstico de candidemia.

Adequação das condições - Hospital escola com infra-estrutura adequada para a realização do estudo descrito.

IV – Comentários:

- **Justificativa do uso de placebo** – Não se aplica.

- **Análise de riscos e benefícios** – Estudo somente em prontuários não acrescentando riscos aos sujeitos da pesquisa.

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/SCMPA – Fone/Fax (51) 3214-8571 – e-mail: cep@irmandadescma.br
 Reconhecido: Conselho Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP / Ministério da Saúde
 FID – Institutional Review Board pelo U.S. Department of Health and Human Services (DHHS)
 Office for Human Research Protections (OHRP) sob número - F80032006
 FWA – Federação Associação sob número - FWA0022943



Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Rua Prof. Américo Dias, 295 – Telefone: (51) 3214.8080 – Fax: (51) 3214.8783
 CEP 91029-000 – Porto Alegre – Rio Grande do Sul – CNPJ: 92815000/0001-68
 Site: www.santacasa.org.br – E-mail: marketing@santacasa.iche.br



- **Adequação do termo de consentimento e forma de obtê-lo** – Não se aplica TCLE, o pesquisador declara que as identidades dos pacientes serão preservadas.

- **Informação adequada quanto ao financiamento** – Foi apresentada a planilha de custo e o contrato de Patrocínio do estudo, adequados.

- **Outros centros no caso de estudos multicêntricos** – Não se aplica.

V - Parecer do Relator – *“Após reavaliação do protocolo acima descrito, o presente comitê não encontrou óbices quanto ao desenvolvimento do estudo em nossa Instituição e poderá ser iniciado a partir da data deste parecer”.*

VI - Data da Reunião: 03/11/2009.

VII - Data da Reavaliação: 14/12/2009.

VIII - Data da 2ª. Reavaliação: 24/02/2010.

“Projeto e Termo de Consentimento, Aprovados”.

Obs.: 1 - O pesquisador responsável deve encaminhar à este CEP, Relatórios de Andamento dos Projetos desenvolvidos na ISCMPA, Relatórios Parciais (pesquisas com duração superior à 6 meses), Relatórios Finais (ao término da pesquisa) e os Resultados Obtidos (cópia da publicação).

2 - Para o início do projeto de pesquisa, o investigador deverá apresentar a chefia do serviço onde será realizada a pesquisa, o Parecer Consubstanciado de aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética.

Porto Alegre, 24 de Fevereiro de 2010.


 Prof. Dr. Cláudio Tokken
 Coordenador do CEP/ISCMPA

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/ISCMPA Fone/Fax: (51) 3214-8571 – e-mail: cep@santacasa.org.br
 Reconhecido: Conselho Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP / Ministério da Saúde
 IRB – Institutional Review Board pelo U.S. Department of Health and Human Services (DHHS)
 Office for Human Research Protections (OHRP) sob número - IRB00002509
 FVA – Federalwide Assurance sob número - FVA00002949

Parecer 345/09

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA DE CANDIDA

I. REAGENTES:

1. Tampão protoplasto (p/ 1mL)

β -mercaptoetanol (PHARMACIA)	10,0 μ L
Tris – HCl 1M pH 7,4.....	100,0 μ L
EDTA 0,5 M pH 8,0.....	20,0 μ L
Lyticase.....	0,25 mg
Água ultrapura.....	870,0 μ L

OBS.: Preparar o tampão na hora do uso.

2. Tampão de lise (p/ 1mL)

NaOH 10M.....	20,0 μ L
SDS 10%.....	100,0 μ L
Água ultrapura.....	880,0 μ L

Colocar o SDS por último para não precipitar

II. PROCEDIMENTO

1. CRESCIMENTO DA LEVEDURA

Repicar a *Candida* em ágar Sabouraud, após crescimento, pegar uma colônia isolada e passar para um tubo contendo 2mL de Sabouraud líquido, incubar a 30°C overnight.

2. EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DE LEVEDURAS

- Transferir 1,3mL da cultura para um tubo eppendorf de 1,5mL e centrifugar a 6.000 r.p.m. durante 3 min.
- Remover o sobrenadante e ressuspender as células em 1mL de H₂O destilada—agitar no vórtex;
- Centrifugar a 6.000 rpm por 3 min.
- Descartar o sobrenadante, ressuspender as células em 200µL de tampão protoplasto. Agitar no vórtex e incubar por 1 hora a 37 °C .
- Adicionar 200µL de solução de lise e misturar cuidadosamente por inversão.
- Incubar a amostra a 65 °C por 20 min e esfriar rapidamente no gelo
- Adicionar 200µL de acetato de potássio 5M pH 5,4, misturar gentilmente por inversão e incubar no gelo por 15 min.
- Centrifugar em velocidade máxima por 3 min e transferir o sobrenadante (+/- 500µl) para outro tubo.
- Repetir a centrifugação se necessário. Desprezar os tubos com o pellet.
- Adicionar 0,6 vol. isopropanol, (300µL) ao sobrenadante, misturar gentilmente por inversão e incubar a temperatura ambiente por 5 min.

(Pode-se parar aqui o procedimento deixando os tubos em temperatura ambiente até o dia seguinte)

- Centrifugar 5 min em velocidade máxima e descartar o sobrenadante.
- Adicionar 1mL de etanol 70% ao precipitado, misturar por inversão e incubar a temperatura ambiente por 10 min e centrifugar 10 min em velocidade máxima.
- Repetir a lavagem com etanol 70%.
- Secar o pellet por 10 min (ao ar ou no fluxo) e dissolver o DNA em 20 – 50 µL de água ultrapura.

3. TRATAMENTO COM RNAse,

Cada tubo:

50 μ L DNA (já está no tubo)

48 μ L água

1 μ L Tris – HCl 1 M pH 7,5

1 μ L RNase A

100 μ L volume total = misturar

- Incubar 1 h 37°C .
- Acrescentar a cada tubo 10 μ L acetato de sódio (NaOAc) 3 M pH +/- 4,5;
- Acrescentar a cada tubo 220 μ L etanol absoluto;
- Misturar. Incubar 10 min no gelo.
- Centrifugar 15 min velocidade máxima.
- Desprezar o sobrenadante.
- Acrescentar a cada tubo 500 μ L etanol 80%. Misturar.
- Centrifugar 15 min velocidade máxima, 14.000 rpm;
- Retirar o etanol.
- Secar o pellet 15 min no fluxo ou a temperatura ambiente.
- Ressuspender o pellet em 50 μ L de água ultrapura.

Estocar a – 20 °C.

Quantificar concentração e a pureza de DNA.

Candidemia por *Candida parapsilosis*

1) Dados de identificação

Nome _____

Prontuário: _____ Sexo: M F Idade: _____

Data Nasc: __ / __ / ____ Data Intern: __ / __ / ____ Peso estimado: ____ kg

2) Doenças de base

Diabete	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	DPOC	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Insuf. card.	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Hepatop. crônica	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Insuf. renal	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Doença neurol.	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Câncer	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Neoplasia sólida	<input type="checkbox"/> Neoplasia hematológica
Transplante	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Órgão sólido	<input type="checkbox"/> Medula

3) Sobre a espécie de *Candida* causando candidemia

Qual foi a espécie: _____ Duração da candidemia: _____ dias

Tempo para crescimento: _____ horas Veia periférica Central Não informado

Tempo para crescimento: _____ horas Veia periférica Central Não informado

Bacteremia concomitante? Sim Não

Mais de uma espécie isolada, simultaneamente? Sim. Quais? _____
 Não

Outro sítio de isolamento de *Candida*? Sim. Quais? _____
 Não

4) Momento da candidemia

Data candidemia: __ / __ / ____ Internado em UTI Sim Não

Gravidade da doença aguda Sepses Sepses grave Choque séptico

APACHE II (adultos): _____ PRISM III (crianças): _____

Cateter venoso central (últimas 48h) Sim Não

Não-tunelizado

Monólúmen ____ dias; ____ sítio Duplo lúmen ____ dias; ____ sítio

- Triplo lúmen ___ dias; ___ sítio Schilley (diálise) ___ dias; ___ sítio
 Swan-ganz ___ dias; ___ sítio Não especificado ___ dias; ___ sítio
 Semi-tunelizado
 Hickman ___ dias; ___ sítio Broviac ___ dias; ___ sítio
 Permicath (diálise) ___ dias; ___ sítio Não especificado ___ dias; ___ sítio
 Totalmente implantado (port-a-cath) ___ dias; ___ sítio
 Inserção periférica (PICC) ___ dias; ___ sítio
 Membro superior Membro inferior

Relação da infecção com o CVC

- Confirmado Não associada Não tinha CVC

Nutrição parenteral (últimas 48h) Sim Não Com lipídeos Sem lipídeos

Neutropenia Sim Não <1000 ___ dias <500 ___ dias <100 ___ dias

5) Últimos 30 dias (antes da candidemia)

Corticoterapia Sim Não Imunossupressores Sim Não

Quimioterapia Sim Não

Cirurgia Sim. Qual(is): _____

Não

Antibióticos Sim Não

- Quinolonas Glicopeptídeo Beta-lactâmicos
 Carbapenêmico Aminoglicosídeo Sulfonamidas

Antifúngicos Sim Não

- Voriconazol Fluconazol Itraconazol
 Caspofungina Anidulafungina Anfotericina B

6) Terapia antifúngica Tratou Não tratou

Anfo B deoxicolato Duração ___ dias Dose diária (média) ___ mg/kg

Anfo lipossomal Duração ___ dias Dose diária (média) ___ mg/kg

Anfo complexo lipídico Duração ___ dias Dose diária (média) ___ mg/kg

<input type="checkbox"/> Fluconazol	Duração ___ dias	Dose diária (média) ____ mg/kg
<input type="checkbox"/> Itraconazol	Duração ___ dias	Dose diária (média) ____ mg/kg
<input type="checkbox"/> Voriconazol	Duração ___ dias	Dose diária (média) ____ mg/kg
<input type="checkbox"/> Caspofungina	Duração ___ dias	Dose diária (média) ____ mg/kg
<input type="checkbox"/> Anidulafungina	Duração ___ dias	Dose diária (média) ____ mg/kg
<input type="checkbox"/> Outro	Duração ___ dias	Dose diária (média) ____ mg/kg

7) Manejo do CVC

Remoção ou troca do CVC Sim. Após _____ dias Não Sem CVC

Remoção ou troca de todos os CVC Sim Não

8) Desfecho

Alta hospitalar Sim. Duração da internação: _____ dias Não

Óbito na internação Sim. Tempo entre candidemia e óbito: _____ dias Não

DEFINIÇÕES DAS VARIÁVEIS

Doenças de base

- Diabete

A ocorrência apenas de hiperglicemia durante a internação não caracteriza diabete.

- Insuficiência cardíaca

Documentar apenas se paciente com sintomas NYHA classe III ou IV.

- Insuficiência renal

Rastrear pela presença de creatinina elevada (acima dos limites de normalidade).

- Hepatopatia crônica

Infecção crônica pelo vírus da hepatite C ou B (independente dos valores de transaminases), ou esteatose hepática ou cirrose de qualquer etiologia.

- DPOC

Doença pulmonar obstrutiva crônica, seja enfisema pulmonar ou bronquite crônica.

Sobre a espécie de *Candida* causando candidemia

Obs.: Este dado é referênte apenas à primeira hemocultura positiva.

- Duração da candidemia

Definida pelo número de dias entre a primeira e a última hemocultura positivas para *Candida*, com intervalo menor que 7 dias entre as colheitas. Obter esta informação no laboratório central.

- Tempo para crescimento

Obter esta informação no laudo da hemocultura, emitido pelo laboratório central. É fundamental que se registre se a hemocultura foi colhida de veia periférica ou através do lumen do CVC (ou ambos).

- Bacteremia concomitante

Marcar esta opção caso a *Candida* tenha sido isolada em hemocultivo onde também havia bactéria.

- Isolamento de mais de uma espécie de *Candida*

Isto vale para a primeira hemocultura positiva.

- Outro sítio de isolamento de *Candida*

Anotar todos os sítios onde cresceu *Candida*, incluindo urina, cateter, escarro, lavado bronco-alveolar (LBA), ferida operatória, abscesso, líquido pleural, *et cetera*.

Momento da candidemia

- Data candidemia

Data em que a primeira amostra positiva foi colhida. Obter esta informação no laboratório central.

- Escore APACHE II

Calculá-lo apenas para adultos (anotar o pior resultado das últimas 24 horas, tendo como referência a data da candidemia; variáveis não disponíveis não pontuam).

- Escore PRISM III

Calculá-lo apenas para crianças.

- Classificação da sepse

Para entrada no estudo, todo o paciente deve ter sepse, definida por 2 ou mais dos seguintes: febre, taquicardia, taquipnéia e hipotensão. Sepse grave significa disfunção orgânica secundária à sepse, enquanto choque séptico implica sepse grave associada a hipotensão, não reversível com fluidos IV.

- Cateter venoso central (CVC)

Marcar se havia CVC presente nas 48h que antecederam a candidemia, bem como o número de dias desde a inserção. Ao marcar um tipo de CVC, definir também o sítio onde o mesmo está inserido: F, femoral; S, subclávia; J, jugular. Se houver registro do nome comercial do CVC, anotar.

- Neutropenia

Definida pela presença de menos de 1000 neutrófilos (ver no laboratório central).

Anotar também há quantos dias o paciente está com menos de 1000, 500 ou 100 neutrófilos.

- Relação da infecção com o CVC

A candidemia está comprovadamente relacionada ao CVC se houver crescimento de *Candida* (mesma espécie) na ponta do cateter. Se o CVC foi removido e não cresceu *Candida*, então não há associação.

30 dias anteriores à candidemia

- Antibiótico

Quinolonas: ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, norfloxacino ...

Glicopeptídeos: vancomicina

Beta-lactâmicos: cefalosporinas, penicilinas, amoxi-sulbactam, ampi-sulbactam, *et cetera*

Carbapenêmicos: imipenem, meropenem, ertapenem

Aminoglicosídeo: gentamicina, ampicacina

Sulfonamidas: sulfametoxazol-trimetoprima

- Antifúngicos

Marcar “anfotericina” se houver uso de qualquer formulação de anfotericina, seja anfo deoxicolato ou formulação lipídica.

- Corticoterapia

Apenas se uso sistêmico (e não tópico) de corticosteróides.