



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

MADI VEIGA DINIZ

**CANDIDEMIAS ASSOCIADAS A NEOPLASIAS
HEMATOLÓGICAS: PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E
SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA**

RECIFE

2016

MADI VEIGA DINIZ

**CANDIDEMIAS ASSOCIADAS A NEOPLASIAS
HEMATOLÓGICAS: PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E
SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia do Centro
de Ciências da Saúde para obtenção do
Grau de Mestre em Patologia, da
Universidade Federal de Pernambuco.

Área de Concentração : Patologia

Orientadora : Prof^a Dr^a Rejane Pereira Neves

Co-orientador : Prof^o Dr. Lucas André Cavalcanti

Brandão

RECIFE

2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

D585c Diniz, Madi Veiga.
 Candidemias associadas a neoplasias hematológicas: perfil
 epidemiológico e sensibilidade antifúngica / Madi Veiga Diniz. – 2016.
 75 f.: il.; tab.; 30 cm.

 Orientadora: Rejane Pereira Neves.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
 CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Recife, 2016.
 Indui referências, apêndices e anexos.

 1. Câncer. 2. Candidemia. 3. Candida. 4. Diagnóstico micológico. 5.
 Sensibilidade a antifúngicos. I. Neves, Rejane Pereira (Orientadora). II.
 Título.

616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-119)

MADI VEIGA DINIZ

CANDIDEMIAS ASSOCIADAS A NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS:
PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Patologia.

Aprovada em: 26/02/2016

BANCA EXAMINADORA

Profº Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto (Examinador interno)
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Profª Drª Fabíola Maria Marques do Couto (Examinador externo)
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Profº Dr. André Ferraz Goiana Leal (Examinador externo)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

R E I T O R

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE- REITOR

Prof^a. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof.^a Adriana Maria da Silva Teles

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof^a. Manuela Figueroa Lyra de Freitas

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Lucas André Cavalcanti Brandão

RECIFE

2016

OFEREÇO

*A todos os pacientes do Serviço de Onco-hematologia
do Hospital de Câncer de Pernambuco.
Sem eles a pesquisa não seria possível*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por aumentar a minha fé e me dar forças para seguir em frente.

À Universidade Federal de Pernambuco-UFPE pela oportunidade de participar deste programa e obter essa formação e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado Pernambuco – FACEPE pelo apoio financeiro.

Ao meu marido Wellington que, com muito amor, sempre me apoiou e incentivou a começar e continuar esta jornada.

Aos meus queridos e amados filhos, Gabriel e Júlia, que sempre participaram dos meus projetos compreendendo minha ausência.

À minha família, pela confiança e incentivo em minhas escolhas.

À minha orientadora Prof^a Rejane, que me acolheu, acreditou na minha capacidade e mostrou-me o fascínio do mundo acadêmico. Agradeço-lhe pelo apoio, dedicação e ensinamentos que foram fundamentais para o meu aproveitamento.

Ao meu co-orientador Prof^o Lucas, pela sua disponibilidade e tranquilidade em colaborar com nosso estudo.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições, críticas e sugestões nesse trabalho.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Patologia pelas palavras de incentivo e apoio nos momentos difíceis.

À turma do mestrado pelos momentos de estudo compartilhado, pelos momentos de aprendizado, dificuldade, alegria e descontração juntos.

Ao grupo do Serviço de Onco-hematologia do HCP pelo acolhimento e disponibilidade com a pesquisa.

Aos colegas e amigos que fazem o Laboratório do Hospital Agamenon Magalhães pelo auxílio na realização dos exames da pesquisa e pela compreensão nos momentos de ausência no trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório do Hospital das Clínicas (ULAB) pelo carinho e apoio nos momentos difíceis.

Aos novos amigos que fiz no Laboratório de Micologia Médica da UFPE, professores e alunos, pelo auxílio teórico e prático, pelo acolhimento e dedicação em todos os momentos desta caminhada.

.

Muito obrigada!

*“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e
nunca se arrepende.”*

Leonardo da Vinci

RESUMO

Pacientes acometidos por neoplasias hematológicas realizam tratamento quimioterápico intenso e têm alto risco de desenvolver infecções invasivas por espécies de *Candida* spp. devido à baixa resposta imune, neutropenia e outros fatores de risco, contribuindo para uma elevada morbimortalidade. Entretanto, devido a peculiaridades da imunossupressão a que são submetidos, a distinção entre os processos infecciosos ainda não é uma tarefa fácil podendo levar o paciente a óbito. O presente estudo teve como objetivo diagnosticar candidemias e avaliar o perfil epidemiológico e sensibilidade antifúngica em pacientes acometidos por neoplasias hematológicas. O diagnóstico micológico foi realizado através da taxonomia clássica e automatizada e confirmado pela técnica molecular (PCR-Reação em Cadeia da Polimerase) e identificação proteômica (MALDI-TOF MS). O teste de sensibilidade antifúngica seguiu as recomendações M27-A3 do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (2008). A análise estatística descritiva foi realizada no programa GraphPad Prism6 através do teste exato de Fisher e cálculo do *Odds ratio* (intervalo de confiança de 95% para $p < 0,05$). Foram analisadas 105 amostras sanguíneas de 62 pacientes internados no serviço de Onco-hematologia do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) no período de janeiro de 2015 a setembro de 2015. Dentre estas, foram isoladas nove (8,57%) leveduras do gênero *Candida*, sendo seis (66,66%) *C. tropicalis* e três (33,34%) *C. albicans*. O óbito ocorreu em 66,6% dos casos de candidemia demonstrando haver associação estatística significativa ($p = 0,03$, *Odds Ratio* = 5,53). O internamento em UTI, como fator de risco, foi associado à candidemia ($p = 0,0008$ *Odds ratio* = 24,8) e o choque séptico ao óbito ($p = 0,0476$ *Odds ratio* = 25,67). Ao teste de sensibilidade antifúngica, os isolados mostraram sensibilidade aos antimicóticos anfotericina B, caspofungina, micafungina, anidulafungina e fluconazol. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que candidemia é uma infecção invasiva frequente causada por espécies de *Candida* não-*albicans*, em pacientes com neoplasias hematológicas, como a espécie *C. tropicalis*.

Palavras-chave: Câncer. Candidemia. *Candida*. Diagnóstico micológico. Sensibilidade a antifúngicos.

ABSTRACT

Patients affected by neoplasia hematological which require intense chemotherapy treatment have high risk of developing invasive infections by *Candida* spp species due to low immune response, neutropenia and other risk factors contributing to high morbimortality. However, due to peculiarities of the immunosuppression that are submitted, the distinction between the infectious processes is still not an easy task and may progress rapidly and take the patient to death. The study aimed to identify the candidemia and epidemiological profile in patients with hematologic neoplasia. The mycological diagnosis was performed by classical taxonomy and automated and confirmed to molecular technique (PCR-polymerase chain reaction) and proteomics (MALDI-TOF MS). The antifungal susceptibility testing followed the M27 -A3 & recommendations of the Clinical Laboratory Standards Institute (2008). The descriptive statistical analysis was performed using GraphPad Prism6 program through the Fisher exact test and calculation of *Odds ratio* (95% confidence interval for $p < 0.05$). Blood samples (105) were analysed of 62 patients admitted in the oncohematology service of the Hospital of Pernambuco (HCP) from January 2015 to September 2015. Among samples studied, nine (8,57%) were found positive for yeasts of the genus *Candida* in which identified six (66,66%) species *C. tropicalis* and three (33,34%) *C. albicans*. The death occurred in 66.6 % of cases of candidemia demonstrated significant statistical association ($p = 0,03$, *Odds ratio* = 5,53). The admission to the ICU, as a risk factor was associated with candidemia ($p = 0.0008$ *Odds ratio* = 24.8) and septic shock with death ($p = 0.0476$ *Odds ratio* = 25.67). The antifungal susceptibility testing, isolates were presented, in its entirety, sensitive to antifungal agents amphotericin B, caspofungin, micafungin, anidulafungin and fluconazole. Among the patients with candidemia 66,6% evolved to death. Based on these results, one can conclude that candidemia is a common invasive infection caused by *Candida* non-*albicans* species in patients with hematological malignancies, such as *C. tropicalis* species.

Keywords: Cancer. Candidemia. *Candida*. Mycological diagnosis. Antifungal susceptibility

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mecanismos de evasão do sistema imunológico utilizados por <i>Candida albicans</i> .	19
Figura 2: Mecanismos de resistência antifúngica.....	31
Tabela 1: Incidência de candidemia na população estudada.....	65
Tabela 2: Avaliação dos fatores de risco em relação à incidência de candidemia entre os pacientes com neoplasia hematológica.....	66
Tabela 3: Avaliação da candidemia como fator de risco para óbito entre os pacientes com neoplasia hematológica.....	66
Tabela 4: Avaliação do uso da UTI como fator de risco para óbito entre os pacientes com candidemia.....	66
Tabela 5: Avaliação do choque séptico como fator de risco para óbito entre os pacientes com neoplasia hematológica e candidemia	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SIGLAS	Descrição em português	Descrição em inglês
CHCA	ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico	α -cyano-4-hydroxycinnamic acid
ALS	Adesinas	Aglutinin-Like Sequence
BHI	Infusão de cérebro e coração	Brain Heart Infusion
CDR	Resistência de <i>Candida</i> a fármacos	<i>Candida</i> drug resistance
CFM	Concentração Fungicida Mínima	Minimum Fungicide Concentration
CI	Candidemias invasivas	Invasive candidemias
CIM	Concentração Inibitória Mínima	Minimum Inhibitory Concentration
CTAB	Hexadecil Trimetil Amônio Brometo	Hexadecyl Trimetil Ammonium Bromide
CYP	Citocromo P 450	Cytochrome P 450
DMSO	Dimetilsulfóxido	dimethyl sulfoxide
DNA	Ácido desoxiribonucléico	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetra- Acético	Ethylenediamine tetraacetic acid
ERG	Gene da síntese do ergosterol	Ergosterol biosynthesis gene
FKS	Gene de síntese de glucano	Glucan synthase gene
Gpm	Mutase fosfoglicerato	Phosphoglycerate mutase
Hgtp	Transportador de glicose de alta afinidade	High- affinity glucose transporter
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer	International Agency for Research on Cancer

IFI	Infecções fúngicas invasivas	Invasive fungal infection
IL	Interleucina	Interleukin
INF- γ	Interferon gama	Interferon gama
LNH	Linfoma não Hodgkin	Non- hodgkin lymphoma
MALDI-TOF MS	Matriz Assistida por Dessorção / Ionização por Laser em Tempo de Voo Espectrometria de Massa	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry
MAMP	Padrão molecular associado ao micróbio	Microbe- associated molecular patterns
MDR	Droga multiresistente	Multiresistant drug
MOPS	Morpholinopropan-.1- Sulfonsäure acid	Ácido 3- morfolino propano- 1- sulfônico
OMS	Organização Mundial de Saúde	World Health Organization
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase	Polymerase Chain Reaction
PL	Fosfolipase	Phospholipase
Pra	Antígeno regulado pelo Ph	pH- regulated antigen
PRR	Receptor de reconhecimento do patógeno	Pattern recognition receptor
RPMI	—	Roswell Park Memorial Institute
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro	Ribonucleico acido Messenger
Saps	Aspartil proteases	Aspartyl proteases
TFA	Ácido trifluoroacético	Trifluoroacetic acid
Th1	Linfócitos T auxiliaries tipo 1	Type 1 Helpers T lymphocytes
Th2	Linfócitos T auxiliaries tipo 2	Type 2 Helpers T lymphocytes
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa	Tumoral Necrose Factor alfa

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Candidemias e Neoplasias hematológicas.....	16
2.2 Perfil epidemiológico das candidemias	20
2.3 Antifúngicos e seus mecanismos de ação.....	26
2.4 Mecanismos de resistência antifúngica	30
3. MÉTODOS.....	33
3.1 Aspectos éticos	33
3.2 Locais de desenvolvimento do estudo	34
3.3 População.....	34
3.4 Período de referência	34
3.5 Desenho e tipo de estudo	34
3.6 Método de coleta e processamento das amostras	34
3.6.1 Coleta das amostras de sangue	35
3.7 Realização do diagnóstico micológico	36
3.7.1 Exame direto.....	36
3.7.2 Identificação pelo CHROMagar <i>Candida</i>	36
3.7.3 Taxonomia clássica.....	36
3.7.3.1 Auxonograma.....	37
3.7.2.2 Zimograma.....	38
3.7.2.3 Capacidade de hidrólise da uréia.....	38
3.7.4 Identificação por automação.....	38
3.7.5 Taxonomia molecular (PCR).....	39
3.7.6 Identificação proteômica (MALDI-TOF MS)	40
3.8 Avaliação <i>in vitro</i> da sensibilidade antifúngica para levedura	41
3.9 Definição das variáveis.....	42
3.10 Métodos estatísticos.....	43
4 RESULTADOS.....	43
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
REFERÊNCIAS.....	45

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE.....	55
APÊNDICE B - Ficha de dados clínicos e pessoais.....	58
APÊNDICE C - Artigo: “Candidemia em pacientes com neoplasia hematológica: diagnóstico por taxonomia polifásica e sensibilidade antifúngica”.....	59
ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP.....	74

1 APRESENTAÇÃO

As neoplasias malignas, também denominadas de câncer, são caracterizadas por um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células malignas que invadem os tecidos e órgãos além das mutações no genoma de uma célula, que podem se disseminar para outras regiões do corpo. A origem é dada por condições multifatoriais que podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar ou promover a doença (INCA, 2016).

Nas últimas décadas, o registro brasileiro de câncer tem apresentado novos casos devido ao processo de envelhecimento populacional e às mudanças das relações entre pessoa e meio ambiente. Esta condição clínica tem sido cada vez mais prevalente no Brasil e, atualmente, é a principal causa de morte nos países desenvolvidos e a segunda causa de morte nos países em desenvolvimento sendo, por esta razão, considerado um problema de saúde pública mundial (INCA, 2016).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC - International Agency for Research on Cancer) estimam 27 milhões de casos novos e 17 milhões casos de morte por câncer no mundo, para o ano de 2030. No Brasil, a estimativa para o ano de 2016, é de, aproximadamente, 596 mil casos novos e 190 mil casos de morte por câncer o que demonstra a complexidade da doença no país (INCA, 2016).

As neoplasias podem ser classificadas em tumores sólidos e neoplasias hematológicas (INCA, 2016). Os pacientes acometidos por estas neoplasias são submetidos a tratamento quimioterápico e, com isso, desenvolvem imunossupressão e, consequente leucopenia e neutropenia. Esta é considerada uma das mais relevantes condições de risco para o aparecimento destas infecções, principalmente se o número de neutrófilos for menor ou igual a 500 células/mm³ (HUGHES et al., 2002; DE LA SERNA et al., 2013; WALSH T. J. et al., 2013). Ademais, outros fatores como a idade avançada, antibioticoterapia de amplo espectro, uso de corticosteroides, cateter venoso central e imunossupressores contribuem para o aparecimento das infecções (COLOMBO et al., 2006).

Adicionalmente, a proliferação de células malignas, imunologicamente ineficazes, substitui a produção de células sanguíneas normais podendo predispor o paciente às infecções contribuindo, assim, para uma elevada razão entre morbidade e mortalidade (HUGHES et al., 2002; DE LA SERNA et al., 2013).

A proporção da infecção pode atingir cerca de 80% destes pacientes, nos quais, 20 a 30% estão associados a infecções documentadas, sobretudo, as de origem fúngica (COLOMBO, 2013) sendo as infecções fúngicas invasivas (IFI) importantes causas de morte em pacientes com neutropenia que realizam quimioterapia para o tratamento das neoplasias (WALSH et al., 2013).

As leveduras do gênero *Candida* são o principal agente causador de IFI (RUHNKE et al., 2012) sendo responsáveis por cerca de 80% das infecções fúngicas em pacientes com saúde crítica (COLOMBO et al., 2006; PAPPAS et al., 2009). Portanto, o diagnóstico fidedigno das IFI é fundamental para estudo epidemiológico, clínico e avaliação da resposta terapêutica, assim como, a seleção dos antifúngicos (COLOMBO et al., 2007; WALSH et al., 2013). Atualmente, os antimicóticos mais utilizados no tratamento das infecções invasivas nosocomiais incluem os polienos, azólicos e as equinocandinas (MACÊDO et al., 2011; KIM et al., 2014).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo diagnosticar candidemias em pacientes acometidos por neoplasias hematológicas através da taxonomia clássica, automação, identificação proteômica (MALDI-TOF MS) e teste molecular (PCR). Além disso, avaliar a incidência, o perfil epidemiológico das candidemias e de sensibilidade antifúngica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Candidemias e neoplasias hematológicas

As neoplasias hematológicas correspondem a um grupo heterogêneo de doenças malignas que atingem os precursores hematopoéticos da medula óssea e além desta, envolvem o sangue, gânglios linfáticos, baço e fígado. O desenvolvimento das mutações genéticas nas neoplasias hematológicas sofre influência de fatores de risco genéticos e ambientais. Nos fatores genéticos, há uma transformação maligna resultante do acúmulo de mutações genéticas. Os fatores ambientais compreendem os agentes químicos, drogas, exposição à radiação, tabagismo, alimentação e infecções (HOFFBRAND et al., 2008).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as neoplasias hematológicas são classificadas em neoplasias mieloproliferativas, neoplasias mielodisplásicas / mieloproliferativas, síndromes mielodisplásicas, leucemias mieloides agudas, neoplasias de

células linfoides precursoras, neoplasias de células linfóide B maduras, neoplasias de células T e NK maduras, linfomas de Hodgkin e linfomas não-Hodgkin (OMS, 2008).

De acordo com o INCA, dentre as neoplasias hematológicas mais frequentes, estimam-se 5.540 casos novos de leucemias em homens e 4.530 casos novos em mulheres para o ano de 2016. Esses valores correspondem a um risco de 5,63 casos novos para cada 100 mil homens e 4,38 para cada 100 mil mulheres. Em se tratando do linfoma não-Hodgkin (LNH), a estimativa para o ano de 2016, no Brasil, é de 5.210 casos novos em homens e 5.030 casos novos em mulheres. Tais valores correspondem a um risco estimado de 5,27 casos novos a cada 100 mil homens e 4,88 a cada 100 mil mulheres. Em relação ao linfoma de Hodgkin (LH) são 1.460 casos novos em homens e 1.010 casos novos em mulheres (INCA, 2016).

Os pacientes com neoplasias hematológicas fazem parte de um grupo de alto risco para desenvolvimento de infecções. Dentre estas, as infecções fúngicas invasivas (IFI) são uma das principais causas de morbimortalidade e promovem aumento do tempo de internamento e custos hospitalares (WALSH et al., 2013; LI et al., 2014).

Em 2009, Lai e colaboradores investigaram a colonização por *Candida* e os fatores de risco para o desenvolvimento de IFI em pacientes com neoplasias hematológicas. O estudo, realizado com 114 pacientes, mostrou que a leucopenia por mais de 10 dias e a antibioticoterapia são fatores de risco para IFI.

Liu e colaboradores (2012) estudaram pacientes com neoplasias hematológicas, infecções fúngicas invasivas e seus fatores de risco. Os autores concluíram que a quimioterapia com leucopenia, antibioticoterapia e a idade avançada contribuem para o aparecimento de infecções invasivas.

Um estudo multicêntrico e prospectivo, em 2014, analisou a epidemiologia e os fatores de risco no aparecimento de candidemias em pacientes hospitalizados com neoplasias hematológicas. As IFI foram causadas, em sua maioria, por espécies de *Candida* não-*albicans* (87,5%) sendo *C. parapsilosis* a espécie mais frequente. A taxa de mortalidade encontrada foi elevada (45%) e associada ao tempo de internamento (GAMALETSOU et al., 2014).

Tang e colaboradores (2014), estudaram fatores de risco associados à candidemia em pacientes com neoplasias hematológicas e tumores sólidos. A presença de cateter venoso central (99%), antibioticoterapia (93%), e imunossupressão (86%) foram encontrados com maior frequência.

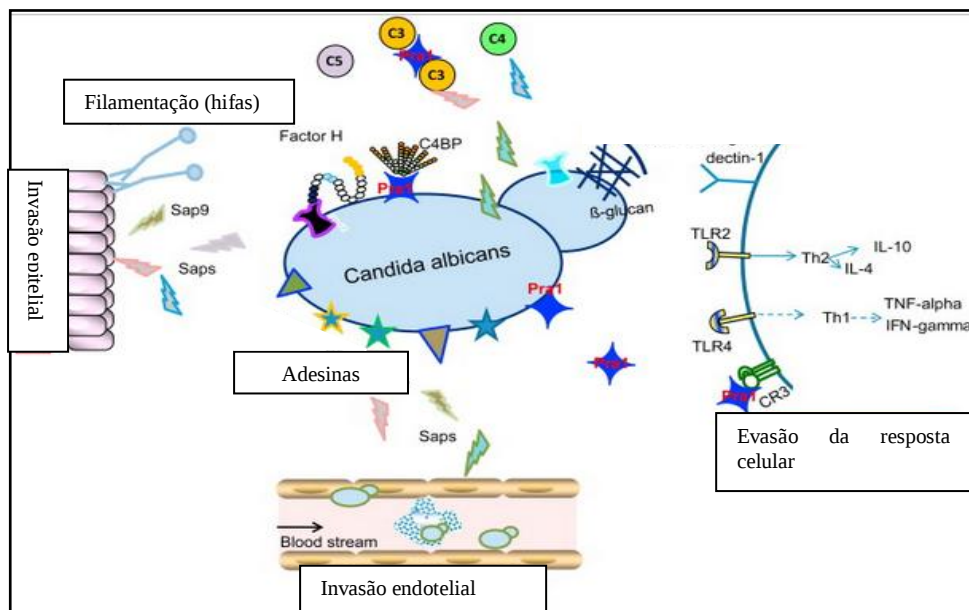
Li e colaboradores (2014) avaliaram, em abril de 2004 a abril de 2013, 1.922 pacientes adultos com neoplasias hematológicas internados por mais de 48 horas e, dos episódios de infecção identificados, 20,51% foram de origem fúngica. Neste estudo foi encontrada associação entre a presença de IFI e alguns fatores de risco como a neutropenia (contagem absoluta de neutrófilos $<1.500/\text{mm}^3$), presença de cateter venoso central e hospitalização prolongada. Os autores concluíram que a neutropenia grave aumenta a incidência de IFI e a taxa de mortalidade nestes pacientes.

Neste contexto, os fungos são agentes que colonizam a microbiota como sapróbios. Mas, em condições especiais, como a deficiência no mecanismo de defesa humoral e celular do hospedeiro, e a depender de alguns fatores de virulência dos fungos podem, como oportunistas, promover doenças secundárias (LACAZ et al., 2002). A estrutura celular é semelhante a dos outros eucariotos, constituída basicamente por uma membrana, um citoplasma com as organelas distribuídas aleatoriamente, por todo interior celular e o núcleo, que armazena o material genético (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

A parede celular fúngica é uma estrutura complexa composta por proteínas, polissacarídeos (80-90% da composição) e glicoproteínas interligados. Os polissacarídeos compreendem as glucanas, mananas e, em menor quantidade, a quitina. A parede celular promove rigidez, suporte osmótico e proteção física à célula. A membrana celular é composta por uma camada bilateral de fosfolípídeos intercalada por moléculas de ergosterol. (LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

A maioria das infecções fúngicas nos seres humanos é causada por fungos oportunistas. Em condições normais, o fungo pode colonizar a cavidade oral, trato gastrointestinal, respiratório e urinário. A infecção se manifesta quando há mudança na relação entre o hospedeiro e a microbiota, assim como o sistema imune (DE ROSSI et al., 2011). Assim, em indivíduos imunologicamente competentes, a resposta imune aos fungos acontece com eficácia, o que não ocorre em pacientes imunossuprimidos. A resposta imune antifúngica requer ação da defesa imune inata e adaptativa (COSTA et al., 2008).

Portanto, o fungo para se tornar patogênico, lança mão de várias estratégias de virulência como: a habilidade para aderir em superfícies epiteliais; evasão do sistema complemento e resposta celular; invasão do tecido através de produção de enzimas (Figura 1). (LIM et al., 2012; LUO S. et al., 2013).

Figura 1: Mecanismos de evasão do sistema imunológico utilizados por *Candida albicans*

Fonte: Adaptado Luo et al., 2013

(Saps: aspartil proteases; Pra 1: antígeno- 1 regulador pH; CR3: receptor complemento 3; TLR : receptor toll like)

A adesão às células epiteliais é fundamental à sobrevivência do fungo. Este mecanismo acontece através de proteínas expressas na superfície do fungo, as adesinas, uma família de genes chamada Agglutinin-Like Sequence (ALS) que codificam oito destas proteínas. As principais são: Ala 1p, Als1p e Hwp1p (ALMEIDA et al., 2008; DE ROSSI et al., 2011; LIM et al., 2012).

No processo de invasão celular, a proteína Als3 se liga a caderinas de células epiteliais e, assim, o fungo é endocitado pela célula hospedeira (ZHAO et al., 2004; DE ROSSI et al., 2011).

Além disso, *C. albicans* utiliza a Als3 para se ligar à ferritina das células epiteliais e adquirir o ferro, essencial para seu crescimento (ALMEIDA et al., 2008; DE ROSSI et al., 2011). Este fungo é pleomórfico, ou seja, tem a capacidade de se diferenciar de levedura (blastosporos) para a forma filamentosa (hifas ou pseudohifas). Esta característica representa uma resposta do fungo para sobreviver em condições adversas como variações de temperatura e pH (KARKOWSKA-KULETA et al., 2009; DE ROSSI et al., 2011; LIM et al., 2012).

As aspartil proteases (Saps) e fosfolipases (PL) também são enzimas importantes no processo de invasão ao hospedeiro, pois agem na degradação das barreiras físicas (pele e

mucosas), na digestão das proteínas e evasão do fungo dos linfócitos e células fagocíticas (DE ROSSI et al., 2011).

Ademais, a produção de hemolisina, proteína que degrada hemácias, desempenha um papel importante na virulência. Esta proteína é essencial devido à aquisição de ferro, um elemento inorgânico necessário ao desenvolvimento dos fungos. A habilidade de obtê-lo é fundamental para a manutenção do processo infeccioso (SARDI et al., 2013).

No processo de evasão do sistema complemento, *C. albicans* desenvolvem maneiras de inibir a ativação desse sistema pela captura de reguladores do complemento, como Fator H, FHL-1, C4BP e plasminogênio do plasma humano para superfície. Além disso, as proteínas de superfície, como o Pra1 (antígeno 1 regulado por pH), fator H, Gpm1 (mutase fosfoglicerato 1), Hgtp1 (transportador 1 de glicose de alta afinidade) agem bloqueando os componentes do complemento. O fator H é visto apenas nas células de leveduras; enquanto o Pra1, Gpm1 e Hgtp 1 são expressos na superfície de hifas e leveduras. As Saps também atuam inativando e degradando os componentes C3b, C4b e C5 do complemento (DE ROSSI et al., 2011; LIM et al., 2012; LUO et al., 2013).

Na evasão da resposta imune celular, *C. albicans* controlam a ação dos fagócitos atraídos para o local através de mudanças nos MAMPs (padrão molecular associado ao micróbio) na superfície da célula fúngica para escapar do reconhecimento pelos PRRs (receptor reconhecimento do patógeno) dos fagócitos, como a dectina-1. Ainda a respeito da resposta celular, as células Th1 medeiam proteção dependente de fagócitos onde há produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF-alfa e INF-gama. Enquanto as células Th2 estimulam a produção de citocinas anti-inflamatórias como as interleucinas IL-4 e IL-10 que estão associadas à desativação de fagócitos, falha na resposta imune humoral e progressão da doença (COSTA et al., 2008; LIM et al., 2012; LUO et al., 2013).

O crescimento das formas filamentosas parece estar mais adaptado para evadir da resposta celular com produção de IL-4, enquanto a levedura é considerada a forma de proliferação, pois induz a produção de IL-12 (COSTA et al., 2008; LIM et al., 2012; LUO et al., 2013).

2.2 Perfil epidemiológico das candidemias

Candidemias são infecções da corrente sanguínea causadas por espécies de *Candida* e

correspondem às principais causas de infecções fúngicas nosocomiais. É a micose oportunista mais importante no mundo que tem conduzido a uma crescente morbidade e mortalidade (PAPPAS et al., 2009; NUCCI et al., 2010; CHEN et al., 2012; RUHNKE et al., 2012; AHMADI et al., 2013; COLOMBO et al., 2013; TAJ-ALDEEN et al., 2014).

As leveduras do gênero *Candida* estão inseridas taxonomicamente no Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Saccharomycetaceae. São micro-organismos eucarióticos, de forma ovóide ou esférica que se reproduzem assexuadamente por brotamento ou gemulação, dando origem a células denominadas blastoconídios ou de forma sexuada com produção de ascospores (LACAZ et al., 2002; GIOLO et al., 2010). Fungo polimórfico e diplóide que está presente em humanos como micro-organismo comensal, mas pode promover o desenvolvimento de várias patologias (KARKOWSKA-KULETA et al., 2009; DE ROSSI et al., 2011).

Candida spp têm habilidade de modificar sua forma de levedura para filamentosa (hifa ou pseudohifa) e pode crescer à temperatura de 37°C. A pseudohifa é uma célula alongada e possui constrições entre as junções celulares assemelhando-se à levedura. A hifa verdadeira é uma célula longa sem constrições. Apenas as espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis* têm a característica de formar hifa verdadeira (LIM et al., 2012).

A capacidade de polimorfismo da *C. albicans* é visto como um importante fator de virulência onde a levedura é a forma de disseminação do fungo e a hifa garante a invasão do fungo no epitélio tecidual (LIM et al., 2012).

O gênero *Candida* é constituído por, aproximadamente, duzentas diferentes espécies de leveduras, mas apenas algumas, cerca de vinte, estão associadas a micoses oportunistas em humanos. As espécies de maior interesse clínico compreendem: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* (ALVARES et al., 2007; COLOMBO et al., 2012; COLOMBO et al., 2013). Entretanto, foram relatados casos graves de infecções invasivas causadas por outras espécies de *Candida* não-*albicans*. Dentre estas *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis* e *C. inconspicua* (COLEMAN et al., 1998; COLOMBO et al., 2013).

Atualmente, testes moleculares e proteômicos estão sendo aplicados na revisão taxonômica desempenhando papel fundamental na caracterização de algumas espécies emergentes, como as que compõem os complexos *C. parapsilosis*, *C. rugosa* e *C. haemulonii* (TAVANTI et al., 2005; GONÇALVES et al., 2010; COLOMBO et al., 2013).

O gênero *Candida* causa infecção fúngica invasiva com maior frequência (RUHNKE et al., 2012; BAILLY et al., 2016) sendo responsável por cerca de 80% das infecções fúngicas

em pacientes com saúde crítica e é a 4ª causa mais comum de infecções de corrente sanguínea (COLOMBO et al., 2003; PAPPAS et al., 2009; RUHNKE et al., 2012; QUINDÓS et al., 2014). A incidência de infecções fúngicas invasivas por *Candida* é relatada em torno de 8% com mortalidade de 40 a 60% em pacientes hospitalizados (BASSETI et al., 2013; COLOMBO et al., 2003). Tal estimativa tem evidenciado a necessidade de diagnóstico precoce e tratamento adequado (BASSETI et al., 2014).

Nos Estados Unidos da América, na década de 90, um estudo realizado por Pfaller e colaboradores em 50 hospitais, mostraram que *Candida* spp responderam por 8% dos 4.725 episódios de infecção de corrente sanguínea documentados naquelas instituições, sendo assim, considerada a quarta principal causa de infecção invasiva (PAPPAS et al., 2009; CHEN et al., 2012; AHMADI et al., 2013; QUINDÓS et al., 2014) em hospitais terciários americanos (COLOMBO et al., 2013) e Europa, sendo responsável por mais de 85% de todas as fungemias (QUINDÓS et al., 2014).

A incidência das candidemias invasivas (CI) é mais elevada na América Latina, Dinamarca e Espanha. Essas diferenças epidemiológicas podem ser explicadas pela avaliação de fatores de risco na população analisada, variação de idade e metodologias estudadas (QUINDÓS et al., 2014).

Os fatores específicos para CI em pacientes com neoplasias hematológicas compreendem colonização por *Candida*, nutrição parenteral, uso prolongado de antibiótico, cateter venoso central e uso de agentes quimioterápicos (CORNELLY et al., 2007; PAPPAS et al., 2009; AHMADI et al., 2013; COLOMBO et al., 2013; LI et al., 2014; QUINDÓS et al., 2014). Contudo, o fator de risco mais importante para a ocorrência de CI é considerado a neutropenia prolongada (LLAMAS et al., 2012; YONGHUA LI et al., 2014).

A espécie *C. albicans* continua sendo considerada o agente mais incidente de candidíase invasiva (COLOMBO et al., 2006; MÍMICA et al., 2009; PAPPAS et al., 2009; TAJ-ALDEEN et al., 2013). Todavia, espécies emergentes de *Candida* não-*albicans* aparecem promovendo infecções, devido ao aumento do uso profilático de drogas antifúngicas (BASSETTI et al., 2010; CHEN et al., 2012).

Quanto aos aspectos epidemiológicos e terapêuticos, é essencial identificar a espécie da levedura para monitorar taxas de infecção hospitalar e permitir o diagnóstico precoce de surtos de infecções por *Candida*. Tal procedimento é fundamental para definir o esquema terapêutico e diminuir o tempo de internamento e custos hospitalares, pois apesar de *C.albicans* ser a espécie mais frequentemente isolada nas infecções invasivas, a incidência

de espécies de *Candida* não-*albicans* é crescente (QUINDÓS et al., 2014) e, em alguns casos, associada a altas taxas de mortalidade (MIMICA et al., 2009).

Nas últimas décadas, vários estudos têm relatado uma progressiva mudança na etiologia das candidemias invasivas em diferentes grupos de pacientes e serviços hospitalares distintos. O padrão etiológico de candidemias sofre variações geográficas relevantes documentadas em diferentes países. Entretanto, *C. albicans* permanece sendo a espécie mais frequente em vários estudos (QUINDÓS et al., 2014).

Apesar disso, a incidência de infecções causadas por espécies de *Candida* não-*albicans* tem crescido em todo o mundo. Esta mudança epidemiológica pode estar associada à imunossupressão severa, uso de antibióticos de amplo espectro e em pacientes de idade avançada (HORN et al., 2009; SARDI et al., 2013).

Al Tthaqafi e colaboradores (2014) avaliaram, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2009, 252 pacientes com candidemia e câncer encontrando, em pacientes com neoplasia hematológica, *C. albicans* (34,1%) seguida por *C. tropicalis* (15,5%), *C. parapsilosis* (11,9%) e *C. glabrata* (9,1%). Destes, houve uma taxa de mortalidade de 50,0% para as espécies de *C. albicans* e 57,8% para as espécies de *Candida* não-*albicans*.

Estudo retrospectivo realizado por Chen e colaboradores (2012), em um centro médico terciário, em Taiwan entre 2006 a 2009 mostrou que nos 447 episódios de candidemia, *C. albicans* foi a espécie mais frequentemente identificada (57,7%), seguida por *C. tropicalis* (15,0%), *C. parapsilosis* (13,0%) e *C. glabrata* (8,3%).

Doi e colaboradores (2016) estudaram 2.563 episódios de infecções nosocomiais no período de 2007 a 2010 e concluíram que *Candida* spp. foi o sétimo agente mais prevalente dos casos em pacientes com malignidades e *C. albicans* foi a espécie mais frequente.

C. tropicalis é isolada mais frequentemente em pacientes com tumores sólidos ou neoplasias hematológicas e em pacientes com idade avançada (> 70 anos). Na Ásia e parte da América Latina (Brasil e Colômbia), ela aparece como segundo agente promotor de infecção invasiva (LIM et al., 2012; QUINDÓS et al., 2014). Age como oportunista em hospedeiro neutropênico quando há supressão da flora bacteriana e danos na mucosa gástrica. Esta espécie apresenta sensibilidade à anfotericina B e, na maioria das vezes, aos triazólicos (DE CASTRO et al., 2012).

Em países de América Latina, particularmente o Brasil, *C. tropicalis*, oportunista em pacientes neutropênicos, é relatada como o segundo ou terceiro agente etiológico mais comum de candidemia em pacientes com neoplasias, sendo sua frequência maior em leucemias e menor em tumores sólidos.

Na pesquisa desenvolvida em 2012, Chen e colaboradores verificaram que *C. albicans* foi a espécie de *Candida* mais comum encontrada em pacientes da Europa, Estados Unidos e Taiwan seguida de *C. tropicalis*. Esta foi associada mais frequentemente a pacientes com leucemia e neutropenia prolongada.

Em Taiwan, Tang e colaboradores (2014) estudaram 41.440 pacientes com câncer e diagnosticaram 242 episódios de candidemia. Dentre as espécies de *Candida* encontradas nas neoplasias hematológicas, *C. albicans* foi a mais comum (63,0%) seguida pela *C. tropicalis* (22,2%), *C. parapsilosis* (7,4%) e *C. glabrata* (7,4%). A elevada taxa de mortalidade (50,8%) foi associada à ausência de tratamento com antifúngicos.

Um estudo epidemiológico mostrou que as espécies de *Candida* não-*albicans* foram mais predominantes na Ásia, Sul da Europa e América do Sul e que a espécie *C. tropicalis* apareceu com mais frequência na Argentina e Ásia Oriental dependendo da região e tipo do estudo. Esta espécie foi associada à neoplasia hematológica e neutropenia (FALAGAS; ROUSSOS; VARDAKAS, 2010).

No Sul da Índia, Adhikary e Joshi (2011) estudaram candidemias por dois anos e, encontraram a seguinte distribuição *C. tropicalis* (39,7%), *C. albicans* (26,4%), *C. lipolytica* (5,8%), *C. famata* (4,4%) e *C. parapsilosis* (4,4%). A taxa de mortalidade foi de 37% nos pacientes com malignidades hematológicas em tratamento quimioterápico. As espécies de *C. tropicalis* foram sensíveis à anfotericina B e voriconazol.

Chander e colaboradores (2013) no Norte da Índia, analisaram amostras de sangue em pacientes imunocomprometidos e encontraram 40,7% de *C. tropicalis*, *C. albicans* (29,6%), *C. glabrata* (18,5%) e outras (11,1%). Neste estudo, houve associação entre candidemia e uso de antimicrobianos de amplo espectro e cateter venoso central. Além disso, 81,8% dos isolados de *C. tropicalis*, apresentaram resistência ao fluconazol e 72,7% ao itraconazol.

C. glabrata aparece como segunda ou terceira causa mais frequente de candidemias nos Estados Unidos e Europa. Isolados desta espécie apresentam menor sensibilidade ao fluconazol e, alguns estudos demonstram que cerca de 10% destas amostras apresentaram resistência a este fármaco. Por conseguinte, há um aumento de infecções causadas por *C. glabrata* em pacientes expostos, por longos períodos, a esse antifúngico (DE CASTRO et al., 2012; DEMITTO et al., 2012; COLOMBO et al., 2013).

Na América do Norte, por exemplo, observa-se o predomínio de *C. glabrata* entre as espécies de *Candida* não-*albicans*; na América do Sul, há frequência mais elevada de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (COLOMBO et al., 2003).

Apesar disso, em outros países, *C.glabrata* é a espécie menos comum. Na América Latina, há baixa frequência correspondendo a apenas 4-7% de todas as demais (PFALLER et al., 2012).

No Brasil, o aumento crescente de isolados de *C. glabrata* nos períodos de 1995-2003 até 2005-2007 foi identificado em hospitais que administravam, mais frequentemente, o fluconazol para o tratamento de candidíases invasivas (QUINDÓS et al., 2014).

Na Espanha, de 2008 a 2009 foram analisados isolados de *Candida* spp de 79 centros médicos e, aproximadamente, 90-95% destes, corresponderam a cinco espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (QUINDÓS et al., 2014).

Bailly e colaboradores (2016) em estudo retrospectivo na França, em pacientes com neoplasias hematológicas e tumores sólidos, encontraram 19,5% das infecções invasivas devido à *Candida* spp. onde a distribuição das espécies foi *C. albicans* (53%), *C. glabrata* (16,2%), *C. parapsilosis* (7,9%) e *C. tropicalis* (7,5%).

C. glabrata e *C. krusei* estão associadas com tumores sólidos, pacientes idosos (> 65 anos), neonatos neutropênicos, transplantados e uso de corticoides. *C. glabrata* é a espécie emergente mais importante como causa de infecção invasiva nos Estados Unidos sendo responsável por 20-24% de todas as espécies. Um estudo demonstrou que *C. glabrata* elevou a incidência de infecções fúngicas invasivas, dentre as espécies de *Candida*, nos Estados Unidos (QUINDÓS et al., 2014). Em ambas as espécies, faz-se necessário o uso de altas doses de anfotericina B para o tratamento de infecções invasivas (COLOMBO et al., 2013).

C. krusei é um patógeno hospitalar ocasional e aparece em pacientes com neoplasias hematológicas e transplantados. *C. krusei* é resistente ao fluconazol e, provavelmente, por isso, há aumento de relatos em pacientes neutropênicos expostos, prolongadamente, a este antifúngico. Mas, na maioria dos casos, apresenta sensibilidade ao voriconazol (DE CASTRO et al., 2012; DEMITTO et al., 2012; COLOMBO et al., 2013).

C. parapsilosis stricto sensu, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* compõem complexo que está associado a manifestações clínicas que incluem endocardite, artrite séptica, peritonite, fungemia e infecções neonatais (TAVANTI et al., 2005).

C. parapsilosis é responsável por 7% a 15% das candidemias nos Estados Unidos e Europa. Em países da América Latina, aparece como segunda causa de infecção fúngica invasiva. Sua incidência é maior em crianças e recém-nascidos, internados em unidades de terapia intensiva, sendo responsável por 17-50% dos casos (DE CASTRO et al., 2012).

No Brasil, *C.parapsilosis* pode ser encontrada em todas as idades e, mais frequentemente, em hospitais da rede pública (COLOMBO et al., 2013). Esta espécie se

mostra sensível à anfotericina B, triazólicos, equinocandinas (DE CASTRO et al., 2012; COLOMBO et al., 2013) e é associada à menor taxa de mortalidade (CHEN et al., 2013).

Estudo realizado em seis hospitais terciários do Rio de Janeiro e São Paulo-Brasil, analisando 145 episódios de candidemia, mostrou que as espécies mais frequentes foram *C. albicans* (37%), *C. parapsilosis* (25%), *C. tropicalis* (24%), *C. rugosa* (5%) e *C. glabrata* (4%) (COLOMBO et al., 2003).

Em estudo epidemiológico realizado no Brasil por Colombo e colaboradores (2007), foram identificados 7.038 episódios de infecção invasiva sendo as espécies de *Candida* spp responsáveis por 282 (4%), destes *C. albicans* foi a mais frequente, mas as espécies de *Candida* não-*albicans* corresponderam a 62% dos casos, nos quais predominaram *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.

Singaravelu e colaboradores (2014) mostraram *C. parapsilosis* como principal agente causador de infecção na Europa, Ásia e América do Sul. Nos isolados analisados, encontraram incidência de *C. parapsilosis* de 15,5% na América do Norte, 16,3% na Europa e 23,4% na América Latina. Nos Estados Unidos é a terceira espécie mais comum como causa de sepse em neonatos. Os autores estudaram os fatores que influenciam na virulência da *C. parapsilosis* como aderência, metabolismo de lipídeos e secreção de enzimas hidrolíticas.

Devrim e colaboradores (2015) estudaram, na Turquia, 135 episódios de candidemia em 114 pacientes pediátricos com câncer no período de 2007 a 2013 e encontraram *C. parapsilosis* (61,4%) como principal agente da candidemia e, em seguida, *C. albicans* (18,5%), e *C. tropicalis* (14,8%). A taxa de mortalidade no estudo foi de 4,44%.

Diante deste contexto, a análise das diferenças geográficas das espécies de *Candida* spp. e perfil de sensibilidade *in vitro* a agentes antifúngicos são importantes para avaliar mudanças na distribuição destas espécies e comportamento frente às novas drogas (MIMICA et al., 2009; TAJ-ALDEEN et al., 2013). O diagnóstico fidedigno dessas espécies é fundamental para estudo epidemiológico e clínico, assim como, a avaliação da resposta terapêutica. (COLOMBO et al., 2007).

2.3 Antifúngicos e seus mecanismos de ação

As substâncias com potencial antifúngico surgiram na década de 1950 com o aparecimento dos polienos (nistatina e anfotericina B). A partir dos anos 70, os azóis

(cetoconazol, itraconazol, fluconazol) surgiram no mercado com extensa aplicação devido a seu amplo espectro e menor toxicidade. Em 1990, foi lançada a nova formulação da anfotericina B, chamada formulação lipídica, que apresentava menor toxicidade renal. A introdução destes fármacos no mercado representou um grande avanço no controle das infecções fúngicas (LLAMAS et al., 2012)

O uso indiscriminado dos azóis promoveu o aparecimento de espécies emergentes com capacidade de resistir às drogas existentes. Para este fim, nos anos 2000, surgiu uma nova promessa de drogas antifúngicas, as equinocandinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina) (BIDART et al., 2004).

A profilaxia com agentes antifúngicos em pacientes com febre persistente e uso de antibioticoterapia de amplo espectro pode ser aplicada na suspeita de IFI. Nestes casos, alguns antimicóticos são indicados para tratamento empírico, como a anfotericina B desoxicolato (AMB-D), anfotericina B lipossomal, itraconazol, voriconazol ou caspofungina (KIM et al., 2014).

Devido às distintas características de várias espécies de *Candida*, do ponto de vista terapêutico e epidemiológico, há necessidade de identificar as leveduras ao nível de espécie, e avaliar a sensibilidade desses micro-organismos frente aos principais antifúngicos. Esse procedimento é fundamental para permitir a escolha do esquema terapêutico adequado (DEMITTO et al., 2012). Além disso, o tratamento das candidemias não é abrangente devido ao surgimento de dificuldades ocasionadas pela elevada toxicidade dos antifúngicos e aumento de espécies resistentes (KHAN et al., 2007).

Os antifúngicos utilizados no tratamento das candidíases compõem quatro classes de medicamentos: polienos, azólicos, análogos de nucleosídeos e equinocandinas (PAPPAS et al. 2009, KATHIRAVAN et al. 2012). Os polienos incluem a anfotericina B e suas formulações (desoxicolato, complexo lipídico e dispersão coloidal). Os azólicos: fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e ravuconazol. Na classe dos análogos nucleosídicos, a fluocitosina é o fármaco mais conhecido. Quanto às equinocandinas, são conhecidas três drogas principais: caspofungina, micafungina e anidulafungina (MARTINEZ et al, 2006).

Os polienos, especificamente a anfotericina B, origina-se do actinomiceto *Streptomyces nodosus*, têm ação fungicida ligando-se ao ergosterol, esteróide presente na membrana de fungos sensíveis, alterando a permeabilidade desta e causando a perda de constituintes citoplasmáticos. Além disso, leva a uma lesão oxidativa que resulta em alterações metabólicas prejudiciais à sobrevivência celular (KATHIRAVAN et al. 2012).

A formulação lipossomal apresenta menor toxicidade na infusão, ou seja, as reações adversas agudas tais como febre, calafrios, tremores, náusea, vômitos e dor de cabeça e baixa toxicidade renal. Em se tratando das formulações lipídicas, o índice terapêutico pode ser ajustado permitindo o uso de doses mais elevadas com reduzida toxicidade renal (FILIPIN; SOUZA, 2006). A anfotericina B lipossomal é um agente antifúngico indicado como terapia alvo para infecções fúngicas invasivas devido ao seu amplo espectro e sua eficácia (DE LA SERNA et al., 2013).

Pfaller e colaboradores (2002) estudaram amostras de pacientes oriundos dos Estados Unidos, Canadá, América Latina e Europa onde *C. albicans* foi a espécie mais encontrada sendo esta mais susceptível à anfotericina B (CIM = 1,0 mg/ml) seguida pelos isolados resistentes de *C. glabrata* (CIM = 4,0 mg/ml), *C. parapsilosis* (CIM = 4,0 mg/ml) e *C. krusei* (CIM = 8,0 mg/ml).

Em 2014, Kalantar e colaboradores identificaram nos isolados estudados 40% de espécies de *C. albicans* e 60% de espécies de *Candida* não-*albicans* e elevada resistência ao antifúngico anfotericina B em todos os isolados de *Candida* não-*albicans*.

Os azólicos têm ação fungistática e atuam inibindo a enzima 14 alfa-demetilase, codificada pelo gene ERG11, do citocromo P450 dos fungos, bloqueando a demetilação do lanosterol e a síntese de ergosterol, o que altera a permeabilidade da membrana e a viabilidade fúngica. Esse bloqueio ocorre pela ligação do átomo de nitrogênio do anel imidazólico ou triazólico ao grupo heme da 14- α -demetilase que se encontra no sítio ativo da enzima, impedindo sua atividade. Também agem modificando a síntese de lipídeos e inativando enzimas do processo oxidativo dos fungos (CANUTO et al., 2002; KATHIRAVAN et al. 2012).

Estudo desenvolvido por Pfaller e colaboradores (2003), entre o período de 1992 a 2001, em várias regiões dos Estados Unidos evidenciou *C. glabrata* (18,3%) como a espécie mais comum das espécies de *Candida* não-*albicans*. Além disso, verificaram que 12% dos isolados de *C. glabrata* apresentaram resistência ao fluconazol. Os autores não encontraram associação entre a incidência da espécie e sua resistência ao antifúngico testado.

No Japão, entre outubro de 2006 e março de 2013, Koh e colaboradores demonstraram a eficácia clínica em 68,9% dos 103 pacientes com neoplasias hematológicas e neutropenia febril tratados, empiricamente, com voriconazol.

Um estudo multicêntrico realizado na Coreia (2014) por Kim e colaboradores, avaliou a administração empírica do itraconazol em 438 pacientes com neoplasias

hematológicas que possuíam neutropenia febril persistente e demonstrou eficácia em 56,5% dos casos estudados.

Em 2015, Farmakiotis e colaboradores identificaram *C.glabrata* como a mais comum das espécies de *Candida* não-*albicans* em isolados de pacientes com câncer. Os autores constataram 20,5% dos isolados com CIM > 64 mg/L para o fluconazol e 10,3% foram resistentes à caspofungina. Além disso, encontraram associação entre o início precoce do tratamento com redução da taxa de mortalidade.

Won e colaboradores (2015) realizaram estudo multicêntrico na Coreia em pacientes com neoplasias hematológicas através da identificação de isolados de *Candida* spp..As espécies mais frequentes foram *C. albicans* (40,4%), *C. parapsilosis* (19,9%), *C. tropicalis* (17,6%) e *C. glabrata* (14,2%). Os autores identificaram aumento significativo no uso do fluconazol entre os anos de 2005 e 2011 e aumento na taxa de resistência ao fluconazol (CIM> 64 ug/ml) em isolados de *C. glabrata* com associação entre o aumento do uso do fluconazol e incidência de *C. glabrata*.

As equinocandinas, formadas a partir da fermentação de alguns fungos como *Aspergillus nidulans* e *Glorea luzonensis*, apresentam seu mecanismo de ação baseado na inibição da síntese da β -D- 1,3 glucana codificada pelo gene FKS1, essencial para a formação da β - glucana, componente da parede celular. Elas possuem ação fungicida para todas as espécies de *Candida*, incluindo as resistentes ao itraconazol e fluconazol, como *C. glabrata* (SANGULARD; ODDS, 2002; DIOMEDI et al., 2004; KATHIRAVAN et al., 2012).

As equinocandinas agem inibindo, de forma competitiva, a síntese de D-glucano, principal polissacarídeo da célula e que representa cerca de 50-60% do peso seco da membrana. Essa inibição leva à instabilidade e rompimento da parede com morte celular. Os efeitos adversos desta droga são mínimos, pois o alvo não é visto nas células dos mamíferos (SANGULARD; ODDS, 2002; DIOMEDI et al., 2004; KATHIRAVAN et al., 2012).

Como a maioria dos pacientes neutropênicos com neoplasias hematológicas são tratados, profilaticamente, com os antifúngicos triazólicos (fluconazol, voriconazol ou poaconazol), as equinocandinas (anidulafungina, micafungina e caspofungina) são recomendadas no início do tratamento das candidemias invasivas nestes pacientes (BORGES-SÁ et al., 2012; WALSH et al., 2004).

As equinocandinas têm rápida ação fungicida contra as espécies de *Candida* spp e baixa toxicidade sendo, assim, considerada uma boa opção nos pacientes graves (BORGES-SÁ et al., 2012; WALSH et al., 2004).

Bailly e colaboradores (2016) estudaram, na França, isolados de pacientes com neoplasias hematológicas e malignidades sólidas e a sensibilidade antifúngica onde verificaram que os isolados de *C. albicans* mostraram sensibilidade ao fluconazol (CIM 0- 0,5 mg/ml). Resistência a esta droga foi notada em isolados de *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Quanto ao antifúngico voriconazol, foi evidenciada resistência em duas espécies *C. albicans* e *C. glabrata*. Todos os isolados demonstraram sensibilidade à anfotericina B. Entretanto, o aumento da CIM para anfotericina B foi visto em isolados de *C. tropicalis* após seis meses do seu uso. Em relação às equinocandinas, o estudo comprovou um aumento do consumo da caspofungina e micafungina no qual foi relacionado ao aumento da CIM em isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* após alguns meses do seu uso.

O uso dos antifúngicos deve ser acompanhado pela susceptibilidade antifúngica devido à resistência apresentada ao fluconazol pelas espécies *C. glabrata* e *C. krusei* (WALSH et al., 2013).

Portanto, alguns critérios devem ser estabelecidos para a seleção das drogas antifúngicas, como diferenças no espectro de atividade antifúngica, biodisponibilidade, formulação, interação medicamentosa e efeitos colaterais, o que torna indispensável o conhecimento das classes de medicamentos para se obter resposta terapêutica adequada (MACÊDO et al., 2011).

2.4 Mecanismos de resistência antifúngica

Atualmente, vários estudos têm relatado a importância do mecanismo de resistência antifúngica entre as espécies de *Candida* por ser um transtorno crescente. A resistência aos antifúngicos está relacionada ao uso indevido destas drogas levando a um tratamento ineficaz (DE CASTRO et al., 2012). Deste modo, algumas espécies de fungos emergentes, como as de *Candida* não-*albicans*, vêm apresentando resistência aos antifúngicos mais comumente utilizados, os polienos; pois, a utilização profilática ou empírica de drogas antifúngicas pode acarretar o aparecimento de cepas resistentes secundárias e a substituição de espécies suscetíveis por outras com resistência intrínseca (COLOMBO et al., 2007).

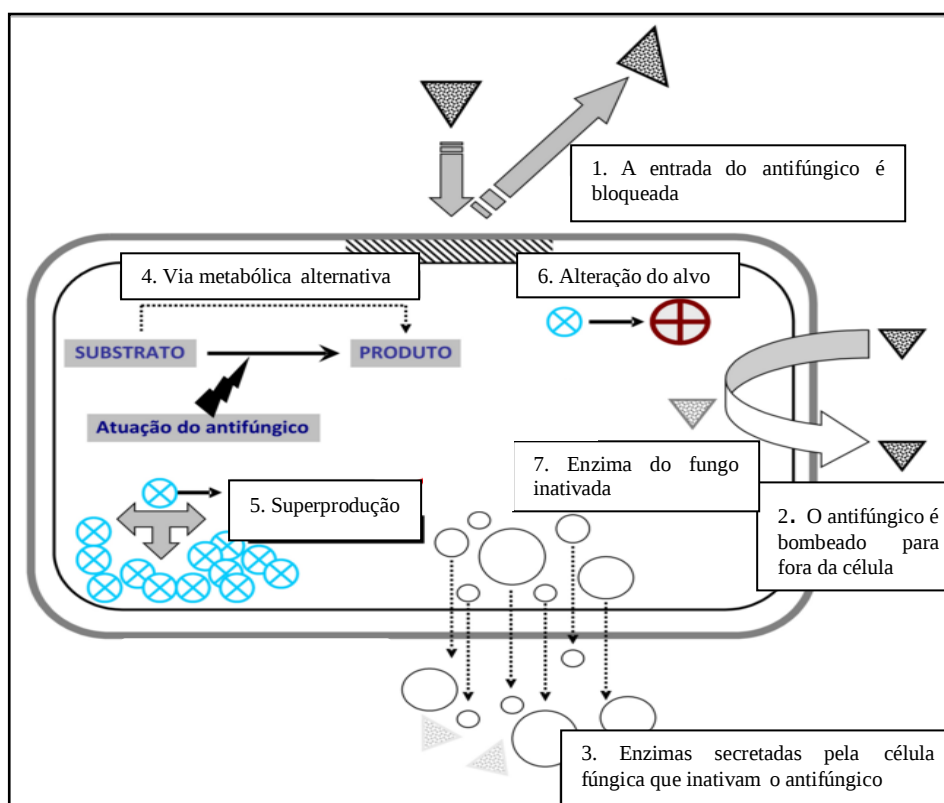
Algumas limitações nos métodos convencionais de diagnóstico, como a baixa sensibilidade (GIOLO et al., 2010) e o tempo elevado, favorecem o tratamento empírico com antifúngicos em pacientes com alto risco para infecção promovendo o aparecimento de resistência a estes fármacos (CORNELLY et al., 2007; DEMITTO et al., 2012; ZABALZA et al., 2013). Em consequência disso, há necessidade de desenvolver outros métodos para

obtenção de diagnóstico preciso e rápido, como as técnicas moleculares e proteômicas para, assim, optar pelo antifúngico mais eficaz e de menor toxicidade. Ademais, é importante avaliar a resistência *in vitro* e *in vivo* em isolados de *Candida* não-*albicans*, assim como, a resistência inata e adquirida (GIOLO et al., 2010).

Apesar de *C. albicans* ser a espécie mais comumente encontrada nas infecções invasivas, algumas espécies *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii* têm surgido retratando a mudança nesse quadro atual. A variação na distribuição das espécies pode estar relacionada com o potencial de virulência e a resistência desses micro-organismos aos antifúngicos (DEMITTO et al, 2012).

Nesse contexto, a resistência aos azólicos envolve quatro mecanismos: redução da concentração do fármaco, alteração do sítio alvo, regulação positiva da enzima alvo e desvio na via de biossíntese (Figura 2).

Figura 2: Mecanismos de resistência antifúngica



Fonte: Adaptado www.microbiologia.vet.br

A diminuição do antifúngico intracelular ocorre pela regulação positiva de genes codificantes para as proteínas de multirresistência (*CDR1* e *CDR2*) e principal facilitadora de transporte (*MDR*), que constituem as bombas de efluxo responsáveis pelo bombeamento da

droga do meio intracelular para o meio extracelular (KANAFANI & PERFECT et al., 2008; ZHANG et al., 2013).

A alteração do sítio alvo acontece através da mutação do gene *ERG11* (*ERG16*, *CYP51*) que altera a sequência de DNA que codifica a enzima lanosterol 14 alfa-demetilase, alvo para as drogas antifúngicas azólicas. Com a mudança na configuração desta enzima haverá diminuição na afinidade por estes fármacos (KANAFANI & PERFECT et al., 2008; COLOMBO et al., 2013; ZHANG et al., 2013).

Na regulação positiva da enzima há manutenção de altas concentrações desta, mesmo na ação do fármaco; não sendo suficiente para inibir a enzima disponível em grandes quantidades. Esta regulação pode acontecer com aumento da tradução do gene para RNA mensageiro (RNAm) que contém a informação para a tradução na enzima, aumento da taxa de transcrição do RNAm, diminuição da degradação do RNAm ou da enzima produzida (KANAFANI & PERFECT et al., 2008).

O desvio na via de biossíntese é decorrente da inibição da enzima 14- alfa-demetilase, catalizadora da síntese do ergosterol. Consequentemente, há o acúmulo do precursor lanosterol que é convertido em 14- α -metilfecosterol e sofre ação da enzima Δ -5,6-desaturase, resultando em produtos tóxicos. Todavia, com a inativação da Δ -5,6-desaturase, ocorre o acúmulo do 14- α -metilfecosterol, mantendo as membranas intactas e inibindo a ação dos azólicos (COLOMBO et al., 2013).

A resistência adquirida a anfotericina B é rara e está relacionada, na maioria das vezes, com alterações genéticas que modificam a composição dos esteróis na membrana celular. A alteração dos genes que codificam as enzimas C-5 esterol desaturase (*ERG3*) e Δ -(24)-esterol metiltransferase (*ERG6*), envolvidas na biossíntese do ergosterol, faz com que ocorra o acúmulo de outros esteróis, que não o ergosterol, diminuindo o alvo para esse antifúngico (VANDEPUTTE et al., 2007, KANAFANI & PERFECT , 2008).

A resistência às equinocandinas aparece em casos de mutação no gene *FKS1*. A sensibilidade reduzida é observada em testes de suscetibilidade *in vitro* para esse antifúngico em consequência do chamado “efeito paradoxal”. Neste efeito, o fungo suporta altas concentrações desse fármaco nos testes *in vitro*, devido ao aumento da síntese de quitina que aumenta a rigidez da parede celular (KANAFANI & PERFECT, 2008).

Na última década, pesquisadores empenham-se em estudar os mecanismos moleculares que estão associados à resistência aos antifúngicos como Pfaller e colaboradores (2011) que evidenciaram os mecanismos moleculares mais comuns de resistência antifúngica

adquirida aos azólicos: indução de bombas de efluxo pelos genes *MDR* ou *CDR* e mutações no gene *ERG11*, codificador da enzima alvo.

Colombo e colaboradores (2013), demonstraram mecanismos de resistência através do efluxo da droga em isolados de *C. glabrata*. Mutações no gene *ERG11* e mudanças na enzima 14-alfa-demetilase foram descritas com *C.krusei* e fluconazol.

Estudo realizado por Zhang e colaboradores (2013), para avaliar a susceptibilidade da *C. albicans* aos antifúngicos azólicos, mostrou associação entre mutações do gene *ERG11* e resistência aos azólicos em isolados clínicos na China.

Em 2014, Ricardo e colaboradores estudaram isolados de *C. krusei* obtidos de pacientes com leucemia durante terapia com voriconazol e avaliaram os mecanismos de resistência envolvidos. Os autores constataram a presença de mecanismos de resistência *in vivo* e *in vitro* após longo período de tratamento com este antifúngico mostrando papel relevante no efluxo da droga e mutação na enzima alvo ERG 11p.

3. MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Esta pesquisa foi submetida para análise ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) com registro de aprovação (CAAE: 36507614.0.0000.5208) para posterior desenvolvimento do estudo, de acordo com a Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, a qual preconiza sobre a ética da pesquisa envolvendo seres humanos, e garante a privacidade do sujeito envolvido na pesquisa (ANEXO A).

Ademais, atendendo aos critérios estabelecidos, os dados obtidos ficarão arquivados, à responsabilidade do pesquisador, pelo período mínimo de cinco anos.

Os pacientes que, após informação, concordaram em participar da pesquisa, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE (APÊNDICE A). Na ocasião, foram esclarecidos a justificativa, os objetivos, benefícios e procedimentos utilizados, assim como, os possíveis riscos que poderiam acometer ao paciente em suas fases de execução.

3.2 Locais de desenvolvimento do estudo

Os pacientes estudados estavam internados no Serviço de Onco-hematologia do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) – Centro de referência em oncologia no Estado de Pernambuco.

O estudo foi desenvolvido no Laboratório Central do Hospital Agamenon Magalhães-PE, Laboratório de Micologia Médica e de Biologia Molecular do Departamento de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e no Centro de Técnicas Estratégicas do Nordeste (CETENE).

3.3 População

A população do estudo incluiu pacientes diagnosticados com neoplasias hematológicas, de ambos os gêneros, com idade a partir de 18 anos, internados no Serviço de Onco-hematologia do Hospital de Câncer de Pernambuco.

3.4 Período de referência

O estudo foi realizado no período de janeiro de 2015 a setembro de 2015 e teve início com a avaliação de prontuários para seleção dos pacientes que atendessem aos critérios de inclusão da pesquisa.

3.5 Desenho e tipo de estudo

O desenho do estudo experimental foi do tipo exploratório e prospectivo com análise das candidemias desenvolvidas em pacientes acometidos por neoplasias hematológicas.

3.6 Método de coleta e processamento das amostras

O registro dos pacientes foi efetuado através do preenchimento de uma ficha de dados pessoais e clínicos (APÊNDICE B). Posteriormente, foi executada a coleta do material biológico para o diagnóstico laboratorial micológico.

3.6.1 Coleta das amostras de sangue

O material biológico utilizado na pesquisa, o sangue periférico, foi adquirido para realizar os exames de hemograma, a proteína C reativa e diagnóstico laboratorial micológico.

A punção venosa foi realizada de acordo com os critérios preconizados pela ANVISA (2013) nas seguintes etapas:

- Lavagem das mãos com água e sabão;
- Preparação do material com identificação do frasco com nome do paciente, leito, data, hora e local de coleta (sítio anatômico), imediatamente ao procedimento;
- Limpeza da tampa de borracha com algodão embebido em álcool 70%;
- Após a escolha do melhor local de punção para a coleta de sangue; colocar o garrote e escolher a veia mais calibrosa e menos móvel;
- Realização da antisepsia com clorexidine alcoólico 0,5% ou álcool iodado ou álcool 70%, friccionando a pele em círculos semiabertos a partir do ponto a ser puncionado;
- Punção venosa com coleta de 5 a 10 mL de sangue em dois tubos de hemocultura, 01 mL para o tubo sem anticoagulante e 2,7 mL para o tubo com o anticoagulante Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético-EDTA;
- Transferência da amostra para os frascos adequados. Lavagem das mãos. Encaminhamento das amostras ao laboratório.

Para tanto, foram utilizados frascos a vácuo (BD- Becton-Dickinson, Franklin Lajes, NJ, USA). A amostra coletada com EDTA foi utilizada para a realização do hemograma através do analisador hematológico LH 750® Coulter (Princípio Coulter- Beckman Coulter) e do exame direto.

Além desta, foi coletada uma amostra sem anticoagulante em tubos a vácuo (BD- Becton-Dickinson (Franklin Lajes, NJ, USA), em quantidade mínima de 01 mL, para realização do analito bioquímico de proteína C reativa através do analisador automático Vitros 250 (Orho-Clinical Diagnostics; Bioquímica Seca- Johnson e Johnson).

Após a coleta, as amostras de hemocultura foram dispensadas em frascos BD BACTEC* Plus Aerobic contendo meio Brain Heart Infusion-BHI (Infusão de cérebro e coração) para diagnóstico micológico através da taxonomia clássica e automatizada. Esta última foi desenvolvida através do equipamento Bactec 9120/ Phoenix-BD (Becton-Dickinson, Franklin Lajes, NJ, USA).

3.7 Realização do diagnóstico micológico

3.7.1 Exame direto

O exame direto foi realizado com as amostras de sangue periférico coletadas com EDTA, onde lâminas foram preparadas sem adição de corante ou clarificante para visualização das estruturas fúngicas (LACAZ et al., 2002).

3.7.2 Identificação pelo CHROMagar *Candida*

Este é um meio de isolamento cromogênico que tem como princípio a produção de cor nas colônias, por reações enzimáticas específicas, com um substrato cromogênico do meio. Após o crescimento das leveduras, foram preparadas suspensões (escala 0,5 de MacFarland) em água destilada esterilizada. Posteriormente, as referidas suspensões foram semeadas no meio CHROMagar *Candida*® (Difco, USA) (Mímica et al., 2009), contido em placas de Petri, e incubadas a 37°C durante 48 horas. A leitura seguiu as cores relacionadas às espécies, a exemplo de *C. albicans*, que se torna verde, *C. tropicalis*, de cor azul e *C. krusei*, de cor rosa.

3.7.3 Taxonomia clássica

A fenotipagem clássica foi baseada nos critérios propostos por Barnett et al. (2000) e Hoog et al. (2000), com identificação das características morfofisiológicas das leveduras. As amostras clínicas foram semeadas, em duplicata, em placas de Petri contendo meio Ágar Sabouraud (Difco, USA) adicionado de 50 mg/L de cloranfenicol mantidas à temperatura de 30°C e 37°C por até 15 dias. Após o surgimento das colônias, foram observadas as

características macroscópicas, como cor e textura das colônias; nas características microscópicas, a forma das células, brotação, possível formação de micélio verdadeiro e pseudomicélio, bem como produção de clamidosporos.

Após o isolamento, a purificação foi realizada colocando fragmentos da colônia em água destilada esterilizada adicionada de 50 mg/L cloranfenicol. Desta suspensão 0,2mL foram semeados por esgotamento na superfície do meio Ágar Sabouraud (Difco, USA) com antibiótico contido em placas de Petri.

As características fisiológicas foram avaliadas através da realização dos testes de auxonograma (assimilação de fontes de carbono e nitrogênio), zimograma (fermentação de fontes de carbono) e produção de urease.

Posteriormente, foi realizada a taxonomia por automação (BD Diagnostic Systems, Franklin Lakes, NJ, USA) no Hospital Agamenon Magalhães (HAM) e o teste molecular-PCR (Manarelli & Kurtzman, 1998) no Departamento de Micologia Médica (UFPE). Em seguida, as amostras foram encaminhadas ao Centro de Técnicas Estratégicas do Nordeste (CETENE) para identificação proteômica através da técnica de MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics-Bremen, Germany). Após a identificação, foi realizado o teste de sensibilidade antifúngica de acordo com as instruções descritas no documento M27-A3 (CLSI, 2008) no Departamento de Micologia Médica (UFPE).

3.7.3.1 Auxonograma

O auxonograma analisa a capacidade do fungo de assimilar fontes de carbono e nitrogênio. Foram preparadas suspensões (escala 0,5 de MacFarland) dos isolados em água contendo extrato de levedura (YE). Imediatamente após esta etapa, foi realizado *pour plate* das referidas suspensões e, após a solidificação do meio, foram adicionadas, separadamente, as diferentes fontes de carbono (dextrose, galactose, sacarose, lactose, maltose entre outras) e fontes de nitrogênio (sulfato de amônio e nitrato de potássio) sendo o meio incubado à 28°C ($\pm 2^\circ$) por três dias. A leitura foi realizada a cada 24 horas, por três dias, para verificar se houve formação de um halo opaco ao redor da fonte inoculada. O aparecimento deste caracteriza que a referida fonte foi utilizada para o crescimento da levedura (Barnett; Payne; Yarrow, 2000; De Hoog; Guarro, 2000).

3.7.3.2 Zimograma

O teste para análise da capacidade de fermentação de fontes de carbono foi realizado em tubos de vidro (150 mm x 12 mm), contendo em seu interior tubos de Durham invertidos (50 mm x 6 mm). Adicionou-se a cada tubo uma solução contendo extrato de malte (0,5%) ou água peptonada, fonte de carbono a ser testada (4%) além da suspensão de cada isolado de levedura (100µL), com a referida suspensão ajustada a 0,5 na escala de McFarland. Os tubos foram incubados à temperatura de 28°C ($\pm 2^\circ$) por 10 dias, sendo o teste observado diariamente para constatação da possível produção de gás (dióxido de carbono), caracterizando a capacidade do isolado em fermentar a fonte testada (Barnett; Payne; Yarrow, 2000; De Hoog; Guarro, 2000).

3.7.3.3 Capacidade de hidrólise da uréia

Culturas com até 48h de crescimento foram semeadas em Ágar Uréia de Christensen e incubadas a 28°C ($\pm 2^\circ$). Após 24 - 72 horas, os tubos foram examinados a fim de verificar a mudança de cor do amarelo para o rosa, sendo este, indicador da produção de urease. Amarelo = negativo; Rosa = positivo (Barnett; Payne; Yarrow, 2000; De Hoog; Guarro, 2000).

3.7.4 Identificação por automação

A metodologia é baseada na fluorescência com sistema que apresenta alta sensibilidade e realiza leitura das amostras a cada 10 min, acelerando o tempo de detecção e fornecendo alarmes tanto visuais quanto sonoros, em caso de amostras positivas.

As amostras de hemocultura coletadas em frascos BD Bactec* Plus Aerobic/F foram incubadas no equipamento automatizado Bactec 9120/ Phoenix™-BD para sinalização em caso de positividade. Nestes casos, foram preparadas suspensões de colônias das leveduras em 3,0 ml de solução salina estéril (solução aquosa a 0,45% a 0,50% de NaCl, pH 4,5 a 7,0) para análise no equipamento BD Phoenix™ com classificação de gênero e espécie fúngicos. A turvação foi ajustada de acordo com a escala (1,80 - 2,20) de McFarland.

Posteriormente, as suspensões das leveduras foram colocadas em cassetes junto com os respectivos cartões de identificação e inseridos, manualmente, na câmara de vácuo do

aparelho Phoenix™. Logo que o vácuo é acionado e o ar introduzido, a suspensão da levedura é pressionada através do tubo de transferência para dentro de microcanais preenchendo todos os poços de teste presentes nos cartões.

Os cartões inoculados e vedados foram incubados a $35,5 \pm 1,0^\circ\text{C}$. Posteriormente, foram removidos da incubadora a cada 15 min, sendo transportados para o sistema óptico de reação de leituras e retornando para a incubadora. Os dados foram coletados em intervalos de 15 min durante todo o período de incubação (até 15 horas).

3.7.5 Taxonomia molecular (PCR)

Extração de DNA

Os isolados foram repicados em placas contendo Ágar Sabouraud adicionado de cloranfenicol e mantidos a 37°C por cinco dias. A massa celular obtida foi transferida para tubos de extração rosqueados contendo pérolas de vidro. O DNA foi extraído de acordo com a metodologia proposta por Fredricks, Smith; Meier (2005).

Inicialmente, foi adicionado 700µL de tampão CTAB pré-aquecido aos tubos de extração contendo as pérolas de vidro e a massa celular, sendo então agitados no Fast-Prep por 1 min a 5,5 m/s. e os tubos colocados em banho-maria por 1 hora a 65°C . Logo após foi realizada centrifugação a 13000 r.p.m por 10 min e o sobrenadante foi transferido para tubos Eppendorf ao qual foi adicionado solução de clorofórmio-álcool-isoamílico. Em seguida, foi realizada outra centrifugação e o sobrenadante foi recuperado e transferido para outro Eppendorf e acrescentado isopropanol. As amostras foram mantidas a -20°C por 30 min e, em seguida, realizou-se a centrifugação nas mesmas condições supracitadas. Após esta etapa, observou-se a formação de “pellet”, o sobrenadante foi descartado e foram realizadas três (3) lavagens sucessivas com etanol a 70%. Os tubos de Eppendorf foram deixados em posição horizontal para completa secagem do “pellet”. Posteriormente foi adicionado 55µL de água ultra pura ao DNA que foi mantido em geladeira para ressuspensão. O DNA extraído foi quantificado em fotômetro quantificador de DNA (Nanodrop 1000 Spectrophotometer).

Amplificação com primer espécie-específico

A amplificação foi realizada segundo Manarelli & Kurtzman (1998) utilizando como controles as ATCC 90028 de *C.albicans* e ATCC 750 de *C.tropicalis* e primers espécie-específicos para *C. albicans* (senso: CAL5-TGTTGCTCTCTCGGGGCGGCCG

e anti-senso: NL4CAL- AAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTAAA) e outro para *C. tropicalis*(senso: CTR22- TGGGCGGTAGGAGAATTGCGTTA e anti-senso: NL4CTR1- ITAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTATA) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C durante 5 min, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30s, anelamento a 50°C durante 60s, e extensão a 72°C durante 90s, com uma extensão final a 72°C durante 10 min, sendo essas etapas realizadas em termociclador (Techne). Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% com 1 X tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) durante 40 min a 3V/cm. O gel foi corado com *GelRed*TM e fotografado sob luz ultravioleta.

3.7.6 Identificação proteômica (MALDI-TOF MS)

Os isolados foram submetidos à análise por espectrometria de massa através da técnica *matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight* (MALDI-TOF MS Bruker Daltonics Inc.,USA/Germany).

A técnica se baseia na aplicação de energia laser a uma amostra embebida em uma matriz que consegue vaporizar e ionizar essa matriz que arrasta as proteínas contidas nela. Estas proteínas ionizadas são submetidas à aceleração em um campo elétrico e migração através de um tubo de vácuo até um detector. O tempo que transcorre desde a vaporização/ionização para a detecção depende do quociente massa/carga (m/z) dessa proteína. Esse quociente permite determinar sua massa exata.

O MALDI-TOF MS foi realizado, em duplicata, seguindo o protocolo da Bruker Daltonics (Bremen,Germany). Para extração proteica, foram utilizadas colônias puras, cultivadas em Sabouraud Dextrose Ágar (Difco, USA) por até 24 horas. As etapas da extração e análise estão descritas a seguir:

- As colônias foram suspensas em 300 uL de água esterilizada em tubo de Eppendorf e agitadas em vortex;
- Foram adicionados 900 uL de etanol, agitados em vortex e centrifugados por 2 minutos a 12.200g; o etanol foi decantado e centrifugado novamente por 2 minutos e removido todo o excesso de etanol;
- 50 uL de ácido fórmico foram acrescentados e agitados em vortex ;
- 50 uL de acetonitrila foram adicionados e agitados em vortex;

- Realizada centrifugação por 02 minutos, e pipetado 1 uL do sobrenadante, em duplicata, e 1 uL do calibrante (protein calibration standard I, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA), em duplicata, em poços distintos, na placa de MALDI-TOF (Bruker Daltonics). Deixou-se secar à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foi pipetado 1 uL da matriz (75 mg/mL de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico-CHCA em etanol/água/acetonitrila 1:1:1 com 0,03% de ácido trifluoroacético- TFA) (Lima-Neto et al. 2014).
- O equipamento utilizado foi MALDI TOF Autoflex III Mass Spectrometer (Bruker Daltonics Inc., EUA / Alemanha). Os espectros para determinação do perfil proteico dos isolados foram identificados através do laser de 1064 nm. A variação de massa foi entre 2.000 a 20.000 Da e os espectros finais foram gerados por um total de 10.800 disparos de laser somados por espectro. A lista de picos foi exportada ao software MALDI Biotyper™ 3,0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) para identificação final.
- Os intervalos de valores para identificação proteica foram interpretados pelo fabricante, onde valores acima de 2.000 (> 2.0) indicaram identificação correta ao nível da espécie e intervalos entre 1.700 e 1.999, reconhecimento ao nível de gênero. Valores abaixo de 1.700 (< 1.7) não houve identificação (LIMA NETO et al, 2014; PULCRANO et al., 2013; TAJ-ALDEEN et al., 2013). A identificação da amostra testada correspondeu à espécie de referência em que melhor correspondeu na base de dados, quanto aos picos protéicos.

3.8 Avaliação *in vitro* da sensibilidade antifúngica para levedura

A avaliação da sensibilidade antifúngica foi realizada através do método de microdiluição em caldo que segue de acordo com as instruções descritas no documento em M27-A3 (CLSI, 2008 S4, 2012). O meio de cultura utilizado foi o RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, pH $7,0 \pm 0,1$, com ácido morfolino propano sulfônico (MOPS); $0,165 \text{ mol.L}^{-1}$; Sigma-Aldrich). O meio de cultura foi esterilizado em membrana de $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore, Darmstadt, Alemanha). Os agentes antifúngicos comerciais utilizados, na forma de sais, foram a anfotericina B (Bristol-Myers Squibb, Princeton, USA), equinocandinas: caspofungina (Cancidas Merck Sharp & Dhome Farmacêutica LTDA.), anidulafungina (Pfizer, Nova York,

EUA) e micafungina (Astellas Farma Brasil Importação e Distribuição de Medicamentos LTDA.) solubilizadas em DMSO (dimetilsulfóxido) e o fluconazol (Pfizer, Nova York, EUA), diluído em água destilada. Concentrações diferentes de tais antifúngicos foram preparadas e usadas nos intervalos de 0,03 a 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para anfotericina B e equinocandinas; 0,125 a 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para fluconazol.

As espécies de levedura foram mantidas em meio Sabouraud Dextrose Ágar (Difco, USA) e incubadas a 35°C por até 24 horas. As suspensões das amostras dos isolados, preparadas em solução salina, e sua densidade ajustada de acordo com a escala 0.5 de McFarland em 90% da transmitância utilizando um espectrofotômetro a 530 nm. O volume do inóculo foi ajustado para 5,0 mL de solução salina esterilizada e, posteriormente, diluído em meio RPMI 1640 para uma concentração de 2×10^3 céls./mL, de acordo com o protocolo M27-A3 e como controles foram utilizadas ATCC 90028 de *C.albicans* e ATCC 750 de *C. tropicalis*.

Nos testes de sensibilidade, foram utilizadas placas de microtitulação de fundo chato de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). O inóculo foi adicionado aos poços contendo os fármacos a serem testados, e as placas incubadas a 35°C durante 48 horas para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). As CIMs para anfotericina B foram determinadas para 100% e para equinocandinas e fluconazol foram determinadas para $\geq 50\%$ de inibição em relação aos poços controles, por leitura visual.

Para determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM) da anfotericina B, o conteúdo dos poços que mostrou 100% de inibição no crescimento foi cultivado em meio SDA (Sabouraud Dextrose Ágar) em placas de Petri. As placas foram incubadas a 35°C durante três dias para determinar a viabilidade fúngica. A CFM foi confirmada pela ausência total de crescimento fúngico através de leitura visual.

3.9 Definição das variáveis

As variáveis analisadas foram descritas através de uma ficha de dados pessoais e clínicos obtidos a partir de prontuários dos pacientes. O preenchimento foi realizado após a aplicação do TCLE. São as seguintes:

- Gênero e idade;
- Tipo de neoplasia hematológica;
- Tempo de quimioterapia;

- Medicamentos prescritos;
- Presença de neutropenia: identificada pelo hemograma;
- Presença de infecção: determinada pela hemocultura e pcr (proteína c reativa);
- Fatores de risco;
- Tempo de internamento.

3.10 Métodos estatísticos

A análise estatística descritiva foi realizada no programa GraphPad Prism 6 através dos testes exato de Fisher e cálculo do *Odds ratio* (intervalo de confiança de 95% para $p < 0,05$).

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente trabalho estão descritos no APÊNDICE C:
Artigo a ser submetido: “Candidemia em pacientes com neoplasia hematológica : diagnóstico por taxonomia polifásica e sensibilidade antifúngica”

Revista: Annals of Hematology

Fator de impacto: 2.634

Qualis capes: B1

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Os portadores de neoplasias hematológicas que realizam tratamento quimioterápico são susceptíveis às candidemias;
- As malignidades hematológicas que mais acometem os pacientes são o Linfoma não-Hodgkin e a Leucemia Mielóide Aguda;
- As técnicas de diagnóstico realizadas apresentam concordância de 100% em seus resultados;
- Candidemia é a infecção fúngica invasiva mais comum em pacientes que realizam tratamento quimioterápico;

- *Candida tropicalis* é a espécie de *Candida* não-*albicans* mais frequente nas malignidades hematológicas;
- A internação em UTI, como fator de risco, está associada estatisticamente à candidemia;
- O choque séptico é associado ao óbito em pacientes com neoplasia hematológica e candidemia;
- A incidência de óbitos é alta e associada estatisticamente a infecções invasivas por espécies de *Candida*;
- As espécies *C. albicans* e *C. tropicalis* são sensíveis aos antifúngicos anfotericina B, caspofungina, anidulafungina, micafungina e fluconazol.

Portanto, os dados do estudo mostram relevância para o manejo clínico diferenciado de pacientes com candidemias mostrando a necessidade de urgência e precisão no diagnóstico para sucesso terapêutico.

REFERÊNCIAS

ADHIKARY, R., JOSHI, S. Species distribution and anti-fungal susceptibility of Candidaemia at a multi super-specialty center in Southern India. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 29, n 3, p. 309-311, 2011.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>> Acesso em: 18 de janeiro de 2016.

AHMADI, A. et al. Invasive candidiasis in intensive care unit; consensus statement from an Iranian panel of experts, July 2013. **JRSM open**, v. 5, n. 3, p. 1-10, 2014.

ALMEIDA, R. S. et al. The hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 11, p. 1–17, 2008.

AL THAQAFI, A. H. O. et al. Predictors and outcomes of *Candida* bloodstream infection: Eight-year surveillance, Western Saudi Arabia. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 5–9, 2014.

ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 319–327, 2007.

BARNETT, J.A. 2000. Yeasts: Characteristics and Identification. Cambridge, Cambridge University Press. Barnett, J. A.; Payne, R. W.; Yarrow, D. (2000). Yeast: characteristics and identification. 3. ed. Cambridge: University press, 1139p.

BAILLY, S. et al. Impact of antifungal prescription on relative distribution and susceptibility of *Candida* spp. – Trends over 10 years. **Journal of Infection**, v. 72, n. 1, p. 103-11, 2016.

BASSETI, M. et al. Epidemiology, Species Distribution, Antifungal Susceptibility, and Outcome of Candidemia across Five Sites in Italy and Spain,. **Journal of Clinical Microbiology**. v.51, n.12, p. 4167-4172,2013

_____. A multicenter study of septic shock due to candidemia: outcomes and predictors of mortality. **Intensive Care Medicine**, v. 40, n. 6, p. 839-845, 2014.

BONHOMME, J.; D'ENFERT, C. *Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 398-403, 2013.

BIDART, TERESA. Rol de voriconazol y caspofungina en terapia antifúngica. **Revista Chilena de Infectología**, v. 21, n. Supl 1, p. 13-19, 2004.

CHANDER, J. et al. Epidemiology of *Candida* blood stream infections: Experience of a tertiary care centre in North India. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 7, n. 9, p. 670-675, 2013.

CHEN, C. Y. et al. Clinical characteristics of candidaemia in adults with haematological malignancy, and antimicrobial susceptibilities of the isolates at a medical centre in Taiwan, 2001-2010. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 6, p. 533-538, 2012.

COLEMAN, D.C. et al. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. **Medicine Mycology**. v.36, n.1, p.156-65, 1998.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n 5, p. 599-607, 2003.

_____. Epidemiology of candidemia in Brazil: A nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816-2823, 2006.

_____. Candidúria : uma abordagem clínica e terapêutica Candiduria : a clinical and therapeutic approach. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 332-337, 2007.

_____. 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. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283–312, 2013.

CORNELY, O. A et al. Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. **The New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 4, p. 348–359, 2007.

COSTA, I.C.; FELIPE, I.; GAZIRI, L.C.J. Resposta imune a *Candida albicans*. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 1, p. 27-40, 2008.

DE CASTRO, N. et al. Hepatosplenic candidiasis in the era of new antifungal drugs: A study in Paris 2000-2007. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 6, p. E185–E187, 2012.

DE LA SERNA, J. et al. Treatment of invasive fungal infections in high risk hematological patients. The outcome with liposomal amphotericin B is not negatively affected by prior administration of mold-active azoles. **Revista Española de Quimioterapia** v.26, n.1, p.64–9, 2013.

DE ROSSI, T. et al. Interações entre *Candida albicans* e hospedeiro. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 1, p. 15-28, 2011.

DEMITTO, F. D. O.; AMARAL, R. DO. Suscetibilidade a antifúngicos in vitro de *Candida* spp. em pacientes do Hospital Universitário Regional de Maringá-PR. **Jornal Brasileiro Patologia e Medicina**, v. 48, p. 315–321, 2012.

DEVIRIM, İ. et al. A 7-year study of the distribution of nosocomial candidemia in children with cancer. **The Turkish Journal of Pediatrics**, v 57, n. 3 p. 225–229, 2015.

DIOMEDI P.A. et al. Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas. **Revista Chilena de Infectología**, v. 21, n. 2, p. 89–101, 2004.

DOI, A. M. et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **Plos one**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2016.

FALAGAS, M. E.; ROUSSOS, N.; VARDAKAS, K. Z. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: A systematic review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 11, p. e954–e966, 2010.

FARMAKIOTIS, D. et al. Early initiation of appropriate treatment is associated with increased survival in cancer patients with *Candida glabrata* fungaemia: A potential benefit from infectious disease consultation. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 1, p. 79–86, 2015.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 167–194, 2006.

FREDRICKS, D. N.; FIEDLER, T. L.; MARRAZZO, J. M. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 18, p. 1899-1911, 2005.

GAMALETSOU, M. N. et al. A prospective, cohort, multicentre study of candidaemia in hospitalized adult patients with haematological malignancies. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 1, p. 50–7, 2014.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GONÇALVES, S. S. et al. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: Results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 7, p. 885–887, 2010.

HOFFBRAND, A.V., MOSS & J.E. PETTIT P.A.H. **Fundamentos em Hematologia** 5. ed. Porto Alegre: Artmed.2008;

HOOG, G.S., et al. **Atlas of Clinical Fungi** The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultuur. 2.ed. 2000

HORN, D. L. et al. Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 2019 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance Registry. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 12, p. 1695–1703, 2009.

HUGHES, W. T. et al. Guidelines for the Use of Antimicrobial Agents in Neutropenic Patients With Cancer. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 34, n. 6, p. 730–751, 2002.

Instituto Nacional do Câncer (INCA) Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>> Acesso em: 18 de janeiro de 2016.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J.**Biologia Celular e Molecular**. 8.ed.,Rio de Janeiro :Guanabara Koogan. 2005

KAHN, J. N. et al. Acquired echinocandin resistance in a *Candida krusei* isolate due to modification of glucan synthase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 5, p. 1876–1878, 2007.

KALANTAR, E. et al. *Candida non albicans* with a High Amphotericin B Resistance Pattern Causing Candidemia among Cancer Patients **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention** v. 15, n. 24, p. 10933-10935, 2014.

KANAFANI, Z. A; PERFECT, J. R. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 46, n. 1, p. 120–128, 2008.

KARKOWSKA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: Molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 2, p. 211–224, 2009.

KATHIRAVAN, M. K. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5678–5698, 2012.

KIM, S.-J. et al. Success rate and risk factors for failure of empirical antifungal therapy with itraconazole in patients with hematological malignancies: a multicenter, prospective, open-label, observational study in Korea. **Journal of Korean Medical Science**, v. 29,n.1, p. 61–8, 2014.

KOH, H. et al. Empirical voriconazole therapy for febrile neutropenic patients with hematological disorders: a prospective multicenter trial in Japan. **Journal of Infection and Chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy**, v. 19, n. 6, p. 1126–34, 2013.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed., São Paulo: Sarvier. 2002

LAI, Y.Y et al. *Candida* colonization and invasive fungal infection in hospitalized patients with hematological malignancies. **Europe PMC**, v. 89, n. 4, p. 239-42, 2009.

LI, Y. et al. Neutropenia and invasive fungal infection in patients with hematological malignancies treated with chemotherapy: a multicenter, prospective, non-interventional study in China. **Tumour Biology : the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 35, n. 6, p. 5869–76, 2014.

LIMA-NETO, R. et al . Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolates culture collection. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo , v. 45, n. 2, p. 515-522, June 2014

LIU, S. et al. Clinical analysis of invasive fungal infection in patients with hematologic malignancies. **Europe PMC**, v. 20, n. 2, p. 492-5, 2012.

LLAMAS, J.C.V.; RUIZ-CAMPS, I. Invasive fungal infection in haematology patients. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 30, n. 9, p. 572–9, 2012.

LIM, C. S.-Y. et al. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 21–31, 2012.

LUO, S. et al. Complement and innate immune evasion strategies of the human pathogenic fungus *Candida albicans*. **Molecular Immunology**, v. 56, n. 3, p. 161-169, 2013.

MACÊDO, D. P. C. **Etiologia da candidíase esofágica e avaliação do efeito antifúngico do extrato de própolis in vitro e in vivo**. 2011.117f. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Micologia Aplicada, 2011. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufpe.br>> Acesso em: 10 de dezembro de 2015.

MANNARELLI, B. M.; KURTZMAN, C. P. Rapid Identification of *Candida albicans* and Other Human Pathogenic Yeasts by Using Short Oligonucleotides in a PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 1634-1641, 1998.

MARTINEZ, Roberto. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p. 449-460, 2006.

MÍMICA, L. M. J. et al. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 1, p. 17–23, 2009.

NUCCI, M. et al. Early removal of central venous catheter in patients with candidemia does not improve outcome: analysis of 842 patients from 2 randomized clinical trials. **Clinical Infectious Diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 51, n. 3, p. 295–303, 2010.

Organização Mundial de Saúde (OMS), 2016 Disponível em : <<http://www.oms.gov.br>>; Acesso em: 18 de janeiro de 2016

PAPPAS, P. G. et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 5, p. 503–535, 2009.

PFALLER, M. A. et al. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 852–6, 2002.

_____. Variation in Susceptibility of Bloodstream Isolates of *Candida glabrata* to Fluconazole According to Patient Age and Geographic Location. **Journal of Clinical Microbiology**, v. May, n. 5, p. 2176–2179, 2003.

_____. Results from the artemis disk global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: A 10.5-year analysis of susceptibilities of candida species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1366–1377, 2010.

_____. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1, p. S3–S13, 2012.

QUINDÓS, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n. 1, p. 42–48, 2014.

RICARDO, E. et al. In vivo and in vitro acquisition of resistance to voriconazole by *Candida krusei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4604–4611, 2014.

RUHNKE, M. et al. Anidulafungin for the treatment of candidaemia/invasive candidiasis in selected critically ill patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 7, p. 680–687, 2012.

SARDI, J. C. O. et al. *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical**

Microbiology, v. 62, n. 1, p. 10–24, 2013.

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

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica a Luz de Autores Contemporâneos..1.** ed., São Paulo: Guanabara. 2004

SINGARAVELU, K.; GÁCSE, A.; NOSANCHUK, J. D. Genetic determinants of virulence - *Candida parapsilosis*. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 31, n. 1, p. 16–21, 2014.

SPANU, T. et al. “Direct MALDI-TOF Mass Spectrometry Assay of Blood Culture Broths for Rapid Identification of *Candida* Species Causing Bloodstream Infections: An Observational Study in Two Large Microbiology Laboratories.” **Journal of Clinical Microbiology** 50.1 (2012): 176–179. *PMC*. Web. 27 Apr. 2016.

TANG, H. J. et al. Epidemiology and prognostic factors of candidemia in cancer patients. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e99103, 2014.

TAJ-ALDEEN, S. J. et al. Epidemiology of candidemia in Qatar, the Middle East: Performance of MALDI-TOF MS for the identification of *Candida* species, species distribution, outcome, and susceptibility pattern. **Infection**, v. 42, n. 2, p. 393–404, 2014.

TAVANTI, A. et al. *Candida parapsilosis* Groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 284–292, 2005.

VANDEPUTTE, P. et al. Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in the ERG6 gene in a clinical isolate of *Candida glabrata* with pseudohyphal growth. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 982–990, 2007.

WALSH, T. J. et al. Caspofungin versus Liposomal Amphotericin B for Empirical Antifungal Therapy in Patients with Persistent Fever and Neutropenia **New England Journals of Medicine** v.351 n° 14 p.1391- 402, 2004;

WALSH, T. J.; GAMALETSSOU, M. N. Treatment of fungal disease in the setting of neutropenia. **Hematology**, v. 2013, n. 1, p. 423–427, 2013.

WON, E. J. et al. Antifungal susceptibilities of bloodstream isolates of *Candida* species from nine hospitals in Korea: Application of new antifungal breakpoints and relationship to antifungal usage. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–9, 2015.

ZABALZA, A. et al. Voriconazole and its clinical potential in the prophylaxis of systemic fungal infection in patients with hematologic malignancies: a perspective review. **Therapeutic Advances in Hematology**, v. 4, n. 3, p. 217–30, 2013.

ZHANG, L. et al. Reduced susceptibility of *Candida albicans* clinical isolates to azoles and detection of mutations in the ERG11 gene. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 77, n. 4, p. 327–9, 2013.

ZHAO, X. et al. ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. **Microbiology**, v. 150, n. 7, p. 2415-2428, 2004.

APÊNDICE A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

(Para maiores de 18 anos ou emancipados - Resolução 466/12)

Convidamos o(a) Sr.(a) para participar como voluntário(a) da pesquisa: Candidemias associadas a neoplasias hematológicas: perfil epidemiológico e sensibilidade antifúngica que está sob a responsabilidade da pesquisadora Madi Veiga Diniz, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Patologia, Av. Prof. Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, Recife - PE, madidiniz@oi.com.br fone: (81) 2126-8481 (81) 2126-3548 mestranda no programa de pós-graduação em Patologia - UFPE e está sob a orientação de: **Profª Drª REJANE PEREIRA NEVES**, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia, Av. Prof. Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, rejadel@yahoo.com.br, rejadel@ufpe.br, Fone: (81) 2126.8570, 21268481, Fax: (81) 2126.8480, Professor Associado, DE e Pesquisadora do CNPq. Além destes, participam da pesquisa Profº Drº Lucas André Cavalcanti Brandão, Departamento de Patologia-UFPE, Av. Prof. Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, Recife - PE, (81)2126-8546, Drº Paulo Sérgio Ramos de Araújo Rua Profº Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária-PE psergiora@gmail.com (81) 9972-6433, Reijane Alves de Assis, Av.Cruz Cabugá - Hospital de Câncer-PE reijaneassis@gmail.com (81) 3217-8025, Rodrigo Niskier Ferreira Barbosa Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia, Av. Prof. Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, rodrigoniskier@yahoo.com.br (81)9733-3883 .

Este Termo de Consentimento pode conter informações que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa que está lhe entrevistando para que o/a senhor/a seja bem esclarecido(a) sobre sua participação na pesquisa. Após esclarecimentos sobre as informações , caso aceite em fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o(a) senhor(a) não será prejudicado(a) de forma alguma. Além disso, garantimos que o(a) senhor(a) tenha o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem nenhum prejuízo.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Essa pesquisa tem como objetivo diagnosticar candidemias, descrever o perfil epidemiológico e sensibilidade antifúngica em pacientes acometidos por neoplasias hematológicas acompanhados no serviço de onco-hematologia do Hospital de Câncer de Pernambuco. O material biológico a ser utilizado na pesquisa será o sangue periférico, como amostra clínica, com a qual serão realizados o hemograma, a proteína C reativa e, através da hemocultura, o diagnóstico micológico e o teste de sensibilidade antifúngica. Estas serão encaminhadas ao Laboratório do Hospital Agamenon Magalhães – PE, Departamento de Micologia - UFPE e ao Centro de Técnicas Estratégicas do Nordeste-CETENE para diagnóstico laboratorial micológico.

Aos pacientes participantes, os prejuízos e riscos envolvidos na pesquisa são mínimos pois, a coleta de sangue será realizada por profissionais qualificados e essa não será de uso exclusivo da pesquisa sendo um procedimento de rotina para diagnóstico e tratamento dos pacientes. Os benefícios diretos aos participantes da pesquisa incluem, além dos resultados das culturas e identificação dos micro-organismos patogênicos, rapidez e precisão no diagnóstico de agentes infecciosos, nos quais, levam a uma melhor decisão clínica para um tratamento mais eficaz, melhorando, assim, a qualidade de vida dos pacientes com neoplasias hematológicas acometidos por candidemias.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa, ficarão armazenados em computadores e livros de registros pessoais, sob a responsabilidade da mestrande Madi Veiga Diniz e da Prof^a Dr^a Rejane Pereira Neves, nos endereços acima informados, pelo período de mínimo 5 anos.

O (A) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidos pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo “CANDIDEMIAS ASSOCIADAS A NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS: PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA”, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento).

Local e Data _____

Assinatura do Participante _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

APÊNDICE B

Ficha de dados clínicos e pessoais

Data: ____/____/____

Registro: _____

Caso: _____

Identificação do paciente:

Nome: _____

Sexo: _____ Idade: _____ anos

Escolaridade: _____

Profissão e/ou ocupação atual: _____

Endereço: _____

Cep.: _____ Fone: _____

Dados clínicos

Diagnóstico (Neoplasia): _____

Antibiótico e/ou antifúngico: _____

Tempo de uso: _____

Data de Internamento: ____/____/____.

É o 1º internamento ? () Sim () Não

Faz quimioterapia ? () Sim () Não Quanto tempo ? _____

Neutropenia: () presente () ausente

Febre: () presente () ausente Quanto tempo ? _____

Infecções fúngicas tratadas? _____ Qual antifúngico? _____

Antibioticoterapia (1º):

Qual antibiótico? _____

Início(data): _____

Troca/associação ao 3º antibiótico:

Qual antibiótico? _____

Início(data): _____

Responsável pela avaliação: _____

APÊNDICE C

CANDIDEMIA EM PACIENTES COM NEOPLASIA HEMATOLÓGICA: DIAGNÓSTICO POR TAXONOMIA POLIFÁSICA E SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA

Diniz., M.V. ¹; Brandão, L.A.C. ¹; Neto, R.G.L^{1 2 3}; Barbosa, R.N.F.²; Inácio, C.P.³; Filho, J.M.S.³; Couto, F.M.M.³; Assis, R.A.⁴; Gimino, N.M.R.⁴; Araújo, P.S.R.⁵; Barros, J.F.⁶; Campos, J.F.⁷; Neves, R.P.^{1 2 3}

Resumo

Pacientes acometidos por malignidades hematológicas têm grandes chances de desenvolver infecções fúngicas invasivas (IFI) devido à neutropenia febril, uso prévio de antimicrobianos, senilidade, tempo de internamento, permanência na Unidade de Terapia Intensa entre outros. Estas condições podem levar ao aumento da morbimortalidade. O objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência de candidemia em pacientes que utilizaram o serviço de onco-hematologia de um hospital público de Pernambuco-Brasil. Foram analisadas 105 amostras clínicas no Laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco. O diagnóstico micológico foi realizado através da automação (Bactec 9120/ Phoenix™-BD), identificação proteômica (MALDI-TOF MS) e molecular (PCR). O teste de sensibilidade antifúngica seguiu as recomendações M27-A3 do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (2008). A análise estatística descritiva foi realizada no programa GraphPad Prism6 através do teste exato de Fisher e cálculo do *Odds ratio* (intervalo de confiança de 95% para $p < 0,05$). Dentre as amostras estudadas, foram isoladas nove (8,57%) leveduras do gênero *Candida*, sendo seis (66,66%) *C. tropicalis* e três (33,34%) *C. albicans*. Os isolados mostraram-se sensíveis aos antifúngicos testados. O óbito ocorreu em 66,6% dos casos de candidemia. Houve associação estatística significativa entre candidemia e óbito ($p = 0,03$; *Odds Ratio* = 5,53), internação em UTI e candidemia ($p = 0,0008$ *Odds ratio* = 24,8) e entre choque séptico como fator de risco para óbito ($p = 0,0476$ *Odds ratio* = 25,67). Diante do exposto, conclui-se que o surgimento de candidemia requer uma atenção especial devido a sua relação com altas taxas de mortalidade causada por espécies de *Candida* não-*albicans*, como *C. tropicalis*.

Keywords: Câncer. Infecção fúngica invasiva. *Candida*. Susceptibilidade a antifúngicos

Rejane Pereira Neves

rejadel@yahoo.com.br

Tel.: (53-81) 999589247

¹ Programa de Pós-Graduação em Patologia-Universidade Federal de Pernambuco-Brasil;

² Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical - Universidade Federal de Pernambuco-Brasil;

³ Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos-Universidade Federal de Pernambuco-Brasil;

⁴ Serviço de Hematologia do Hospital de Câncer de Pernambuco-Brasil;

⁵ Departamento de Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital de Câncer de Pernambuco-Brasil;

⁶ Serviço de Microbiologia do Hospital Agamenon Magalhães, Recife – Pernambuco- Brasil.

⁷ CETENE- Centro de Técnicas Estratégicas do Nordeste- Universidade Federal de Pernambuco-Brasil

Introdução

As infecções fúngicas invasivas (IFI) são importantes causas de morte em pacientes com neutropenia que realizam quimioterapia para o tratamento do câncer [1]. Alguns fatores de risco como idade avançada, antibioticoterapia de amplo espectro e uso de cateter venoso central contribuem para o seu aparecimento [2-3].

O gênero *Candida* é citado como principal causa de infecção fúngica invasiva (IFI) sendo responsável por cerca de 80% das infecções fúngicas em pacientes críticos e a quarta (4ª) causa mais comum de infecções de corrente sanguínea [3-9]. A incidência de IFI por *Candida* é relatada em torno de 8% com mortalidade de 40 a 60% em pacientes hospitalizados [4,10]. Tal estimativa tem evidenciado a necessidade de diagnóstico precoce e tratamento adequado [10].

As espécies de *Candida* de maior interesse clínico compreendem *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C. guilliermondii* e *C.lusitaniae* [11] *C.albicans* permanece como a espécie mais frequente nos casos de candidíase invasiva [7,11-13]. Todavia, espécies emergentes de *Candida* não-*albicans* aparecem promovendo infecções devido ao aumento do uso profilático de antifúngicos em pacientes críticos [5,8,14]. Além disso, a elevada toxicidade destes fármacos e o crescente aparecimento de espécies resistentes dificultam o tratamento das candidemias [15].

A análise das diferenças geográficas das espécies de *Candida* e perfil de sensibilidade *in vitro* a agentes antifúngicos são importantes para avaliar mudanças na distribuição destas espécies e comportamento frente às novas drogas [12]. Assim, do ponto de vista terapêutico e epidemiológico, torna-se essencial a identificação das leveduras ao nível de espécie para monitorar taxas de infecção hospitalar e permitir o diagnóstico precoce de surtos de infecções por *Candida* [9].

Para tanto, vários estudos têm mostrado a utilização de técnicas rápidas e de baixo custo, como a espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) [16,17] e técnicas precisas como o teste molecular (PCR) [18]. Tal procedimento é fundamental para definir o esquema terapêutico, diminuir o tempo de internamento e custos hospitalares [9].

Esta pesquisa teve como objetivo diagnosticar infecções fúngicas através da automação Bactec 9120/ Phoenix™-BD (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), identificação proteômica (MALDI-TOF MS Bruker Daltonics Inc., USA/Germany) e teste molecular (PCR); descrever o perfil epidemiológico de candidemias e verificar *in vitro* a sensibilidade antifúngica através do método de microdiluição em caldo (CLSI, 2008 S4, 2012).

Metodologia

Desenho do estudo

O estudo experimental foi do tipo exploratório e prospectivo com análise de 105 amostras de hemocultura de 62 pacientes diagnosticados com neoplasias hematológicas, de ambos os gêneros, com idade a partir de 18 anos e internados no serviço de onco-hematologia de um hospital público de Pernambuco-Brasil. A análise foi realizada no período de janeiro de 2015 a setembro de 2015.

Amostras clínicas e processamento

Amostras de hemocultura, coletadas em frascos BD Bactec* Plus Aerobic/F, foram processadas e identificadas através do equipamento automatizado Bactec 9120/ Phoenix™-BD (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Em seguida, foram semeadas, em duplicata, em placas de Petri contendo meio Ágar Sabouraud (Difco, USA) adicionado de 50 mg/L de cloranfenicol mantidas à temperatura de 30°C e 37°C por até 15 dias. Após o

surgimento das colônias, estas foram purificadas e, no período máximo de 24 horas, submetidas à análise através da técnica *matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight* (MALDI-TOF MS-Bruker Daltonics Inc.,USA/Germany),teste molecular PCR(Manarelli & Kurtzman, 1998) e avaliação *in vitro* da sensibilidade antifúngica M27-A3 (CLSI,2008 S4,2012).

Identificação proteômica (MALDI-TOF MS)

A identificação das leveduras pelo MALDI-TOF MS foi realizada de acordo com o protocolo da Bruker Daltonics (Bremen, Germany). Para extração proteica, foram utilizadas colônias puras, cultivadas em DAS (Sabouraud Dextrose Ágar) por até 24 horas. Estas foram suspensas em 300 uL de água esterilizada em tubo de Eppendorf. Após agitação em vortex, 900 uL de etanol (EtOH) foram adicionados e,após centrifugação a 12.000g por 2 minutos, o sobrenadante foi decantado e acrescentado 50 uL de ácido fórmico 70% (FA). A solução foi agitada no vortex e acrescentados 50 uL de acetonitrila (ACN). Após nova centrifugação, pipetou-se 1 uL do sobrenadante e 1 uL do calibrante (protein calibration standard I, Bruker Daltonics,Billerica,MA,USA), em poços distintos, e, em duplicata, na placa de MALDI-TOF(Bruker Daltonics). A placa foi deixada à temperatura ambiente para secar por 5 minutos. Em seguida, pipetou-se 1uL da matriz (75 mg/mL de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico-CHCA em etanol/água/acetonitrila 1:1:1 com 0,03% de ácido trifluoroacético- TFA) na placa de MALDI-TOF [30].

Os espectros para determinação do perfil proteico dos isolados foram identificados através do laser de 1064 nm. A variação de massa ficou entre 2.000 a 20.000 Da e os espectros finais foram gerados por um total de 10.800 disparos de laser somados por espectro. A lista de picos foi exportada ao software MALDI Biotyper™ 3,0(Bruker Daltonics,Bremem,Germany) para identificação final.

Os intervalos de valores para identificação proteica foram interpretados pelo fabricante, onde valores acima de 2.000 (> 2.0) indicaram identificação correta ao nível da espécie e intervalos entre 1.700 e 1.999, reconhecimento ao nível de gênero. Valores abaixo de 1.700 (<1.7) não foram possíveis à identificação [13,17, 30].

Teste molecular (PCR-Reação em Cadeia da Polimerase)

Extração de DNA

Os isolados foram repicados em placas contendo Ágar Sabouraud adicionado de cloranfenicol e mantidos a 37°C por cinco dias. A massa celular obtida foi transferida para tubos de extração rosqueados contendo pérolas de vidro. O DNA foi extraído de acordo com a metodologia proposta por Fredricks, Smith; Meier (2005) [19].

Inicialmente, foi adicionado 700µL de tampão hexadecil trimetil amônio brometo-CTAB pré-aquecido aos tubos de extração contendo as pérolas de vidro e a massa celular, sendo então agitados Fast-Prep por 1 min a 5,5 m/s. e os tubos colocados em banho-maria por 1 hora a 65°C. Logo após foi realizada centrifugação a 13000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi transferido para tubos Eppendorf ao qual foi adicionado solução de clorofórmio-álcool-isoamílico. Em seguida, foi realizada outra centrifugação a 13000rpm por 10 min. O sobrenadante foi recuperado e transferido para outro Eppendorf e acrescentado isopropanol. As amostras foram mantidas a -20°C por 30 min e, em seguida, realizou-se a centrifugação nas mesmas condições supracitadas. Após esta etapa, observou-se a formação de “pellet”, o sobrenadante foi descartado e foram realizadas três (3) lavagens sucessivas com etanol a 70%. Os tubos de Eppendorf foram deixados em posição horizontal para completa secagem do “pellet”. Posteriormente foi adicionado 55µL de água ultra-pura ao DNA que foi mantido em geladeira para ressuspensão. O DNA extraído foi quantificado em fotômetro quantificador de DNA (Nanodrop 1000 Spectrophotometer).

Amplificação com primers espécie-específicos

A amplificação foi realizada de acordo com Manarelli & Kurtzman (1998) [20] utilizando como controles as ATCC 90028 de *C.albicans* e ATCC 750 de *C.tropicalis* e um par de primers espécie-específicos para *C.albicans*(senso: CAL5-TGTTGCTCTCTCGGGGCGGCCG e anti-senso: NL4CAL-AAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTAAA) e outro para *C.tropicalis* (senso: CTR22-TGGGCGGTAGGAGAATTGCGTTA e anti-senso: NL4CTR1-TAAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTATA) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C durante 5min, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30s, anelamento a 50°C durante 60s, e extensão a 72°C durante 90s, com uma extensão final a 72°C durante 10 min, sendo essas etapas realizadas em termociclador (Techne). Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% com 1 X tampão

TAE (Tris-acetato-EDTA) durante 40 min a 3V/cm. O gel foi corado com *GelRed*TM e fotografado sob luz ultravioleta.

Avaliação *in vitro* da sensibilidade antifúngica

Os isolados foram testados através do método de microdiluição em caldo (M27-A3) recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). Os antifúngicos comerciais utilizados, na forma de sais, foram a anfotericina B (Bristol-Myers Squibb, Princeton, USA), caspofungina (Cancidas Merck Sharp & Dhome Farmacêutica LTDA.), anidulafungina (Pfizer, Nova York, EUA) e micafungina (Astellas Farma Brasil Importação e Distribuição de Medicamentos LTDA.) solubilizadas em DMSO (dimetilsulfóxido) e o fluconazol (Pfizer, Nova York, EUA), diluído em água destilada. Concentrações diferentes de tais antifúngicos foram preparadas e usadas nos intervalos de 0,03 a 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para anfotericina B e equinocandinas; 0,125 a 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para fluconazol. As espécies de levedura foram mantidas em meio DAS (Difco, USA) e incubadas a 35°C por até 24 horas. As suspensões das amostras dos isolados, preparadas em solução salina, e sua densidade ajustada de acordo com a escala 0.5 de McFarland em 90% da transmitância utilizando um espectrofotômetro a 530 nm. O volume do inóculo foi ajustado para 5,0 mL de solução salina esterilizada e, posteriormente, diluído em meio RPMI 1640 para uma concentração de 2×10^3 céls./mL, de acordo com o protocolo M27-A3.

Nos testes de sensibilidade, foram utilizadas placas de microtitulação de fundo chato de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça) e, como controles, as ATCC 90028 de *C.albicans* e ATCC 750 de *C.tropicalis*. Os inóculos foram adicionados aos poços contendo os fármacos a serem testados, e as placas incubadas a 35°C durante 48 horas para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). As CIMs para anfotericina B foram determinadas para 100%; equinocandinas e fluconazol foram determinados para $\geq 50\%$ de inibição em relação aos poços controles, por leitura visual.

Análise estatística

A análise estatística descritiva foi realizada no programa GraphPad Prism 6 através dos testes exato de Fisher e cálculo do *Odds ratio* (intervalo de confiança de 95% para $p < 0,05$).

Resultados

Dentre as neoplasias hematológicas do estudo, as mais frequentes foram o Linfoma não-Hodgkin 22 (35,48%) e a Leucemia Mieloide Aguda 13 (20,97%). Das 105 amostras de hemocultura analisadas, foram isoladas nove (8,57%) do gênero *Candida* sendo seis (66,66%) *C. tropicalis* e três (33,34%) *C. albicans* (Tabela 1), não havendo discordância entre os métodos de diagnóstico. Em relação aos fatores de risco estudados, a internação em UTI mostrou associação estatística significativa à candidemia ($p = 0,0008$; *Odds ratio* = 24,8) (Tabela 2), mas não apresentou associação ao óbito (Tabela 4). Este, que ocorreu em 66,6% dos casos, demonstrou ter associação à candidemia ($p = 0,03$; *Odds ratio* = 5,53) (Tabela 3). Ademais, foi verificada associação entre o choque séptico como fator de risco para óbito em pacientes com candidemia ($p = 0,0476$; *Odds ratio* = 25,67) (Tabela 5). Ao teste de sensibilidade antifúngica, os isolados se apresentaram, em sua totalidade, sensíveis aos antifúngicos anfotericina B (CIM < 0,5 ug/ml), caspofungina (CIM < 0,25 ug/ml), anidulafungina (CIM < 0,06 ug/ml), micafungina (CIM < 0,06 ug/ml) e fluconazol (CIM < 1 ug/ml).

Tabela 1: Incidência de candidemia na população estudada

Espécies isoladas	Incidência n (%)
<i>Candida tropicalis</i>	06 (66,66%)
<i>Candida albicans</i>	03 (33,34%)
Total	09 (100%)

Tabela 2 : Avaliação dos fatores de risco em relação à incidência de candidemia entre os pacientes com neoplasia hematológica.

Variáveis	Candidemia n (%)	Ausência de candidemia n(%)	Valor de p*
Gênero			
Masculino	4 (44,44)	52 (54,73)	0,7295
Feminino	5 (55,56)	43 (45,27)	
Idade (anos)			
18 a 59	5 (55,56)	76 (84,44)	0,0545
Acima de 60	4 (44,44)	14 (15,56)	
Neutropenia			
Presença	6 (66,67)	59 (64,83)	1,0
Ausência	3 (33,33)	32 (35,17)	
Proteína C reativa			
>1,0 mg/dl	9 (100)	88 (94,62)	1,0
< 1,0 mg/dl	0 (0)	5 (5,38)	
Uso de antifúngico			
Sim	4 (44,44)	43 (44,79)	1,0
Não	5 (55,56)	53 (55,21)	
Internamentos na UTI			
Sim	4 (44,44)	3 (3,13)	0,0008**
Não	5 (55,56)	93 (96,87)	
Tempo de internamento			
>14 dias	5 (55,56)	34 (35,41)	0,2870
< 14 dias	4 (44,44)	62 (64,59)	

* Valor de p significativo < 0,05 ** Odds ratio = 24,8; Intervalo de confiança 95% = 4,3243 a 142,2277

Tabela 3: Avaliação da candidemia como fator de risco para óbito entre os pacientes com neoplasia hematológica.

Variável	Óbito n (%)	Sobrevida n (%)	Valor de p*	Odds ratio**
Candidemia	4 (25)	5 (5,68)	0,03	5,53
Ausência de candidemia	12(75)	84 (94,32)		

* Valor de p significativo < 0,05 **Intervalo de Confiança 95%: 1,3013 a 23,5294

Tabela 4: Avaliação do uso da UTI como fator de risco para óbito entre os pacientes com candidemia.

Variável	Óbito n (%)	Sobrevida n (%)	Valor de p*
Internamentos na UTI	3 (25)	1 (5,68)	0,2063
Sem internamentos na UTI	1 (75)	4 (94,32)	

* Valor de p significativo < 0,05

Tabela 5: Avaliação do choque séptico como fator de risco para óbito entre os pacientes com neoplasia hematológica e candidemia.

Variável	Óbito n (%)	Sobrevida	Valor de p*	Odds ratio**
Choque séptico	3 (75)	0 (0)	0,0476	25,67
Ausência de choque séptico	1 (25)	5 (100)		

* Valor de *p* significativa < 0,05 **Intervalo de Confiança 95%: 0,7987 a 824,7764

Discussão

Candidemias compreendem a micose oportunista mais importante no mundo com crescente morbimortalidade [5,7,8,21,22]. Seu padrão etiológico sofre variações geográficas relevantes documentadas em vários países [2,21].

A incidência de candidemia encontrada no presente trabalho foi mais elevada que alguns estudos que avaliaram pacientes com neoplasias hematológicas em regiões geográficas diferentes [5,23].

Al Tthaqafi e colaboradores (2014) avaliaram pacientes com neoplasia hematológica e candidemia encontrando *C. albicans* (34,1%) seguida por *C. tropicalis* (15,5%), *C. parapsilosis* (11,9%) e *C. glabrata* (9,1%). Destes, houve uma taxa de mortalidade de 57,8% para as espécies de *Candida* não-*albicans* [22].

Em Taiwan, Tang e colaboradores (2014) estudaram pacientes com câncer e, dentre as espécies de *Candida* encontradas nas neoplasias hematológicas, *C. albicans* foi a mais comum (63,0%) seguida por *C. tropicalis* (22,2%), *C. parapsilosis* (7,4%) e *C. glabrata* (7,4%). A elevada taxa de mortalidade (50,8%) foi associada à ausência de tratamento com antifúngicos [24].

Apesar de várias pesquisas mostrarem *C. tropicalis* como primeira ou segunda espécie mais incidente, entre as espécies de *Candida* não-*albicans*, o presente estudo obteve resultados semelhantes a trabalhos realizados no Norte e Sul da Índia e em Taiwan que identificaram *C. tropicalis* como a espécie mais frequente em pacientes com neoplasias hematológicas [5,21,23].

Em relação aos fatores de risco analisados, houve associação significativa entre a internação em UTI e candidemia [25]. Esta foi associada estatisticamente à elevada incidência de óbito, como apresentado em outros estudos [21,22,24,25].

A associação do choque séptico ao óbito encontrada em nosso trabalho, também foi evidenciada por Chen e colaboradores onde afirmaram que pacientes com choque e infecção têm piores prognósticos e maior risco de candidemia [5].

Quanto à sensibilidade antifúngica, os nossos resultados foram compatíveis com vários trabalhos que mostram isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* sensíveis à anfotericina B, fluconazol [14,21,26,27] e às equinocandinas [5,28,29].

Os dados do estudo são relevantes para o manejo clínico diferenciado de pacientes com candidemias e mostram a necessidade de urgência e precisão no diagnóstico, com identificação ao nível de espécie e obtenção do sucesso terapêutico.

Agradecimentos

Agradecemos à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

Referências

1. Walsh, T. J., Thomas J. Walsh, M.D., Hedy Teppler, M.D., Gerald R. Donowitz, M.D., Johan A. Maertens, M.D., Lindsey R. Baden, M.D., Anna Dmoszynska, M.D., Ph.D., Oliver A. Cornely, M.D., Michael R. Bourque, M.S., Robert J. Lupinacci, M.S., Carole A. Sable, M.D., and Ben E. dePauw, M.D., Ph.D. Caspofungin versus Liposomal Amphotericin B for Empirical Antifungal Therapy in Patients with Persistent Fever and Neutropenia **New England Journals of Medicine** v. 351 n. 14 p. 1391- 402, 2004.
2. Colombo, A.L., Nucci, M., Park, B.J., Noue´r, S.A., Arthington-Skaggs, B., Matta, D.A., Warnock, D. and Morgan, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: A nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816–2823, 2006.

3. Pappas, P. G., Kauffman, C.A., Andes, D., Benjamin, D.K., Calandra, F., Edwards, J.E., Jr. Scott G. Filler, John F. Fisher, Bart-Jan Kullberg, Luis Ostrosky-Zeichner, Annette C. Reboli, John H. Rex, Thomas J. Walsh, and Jack D. Sobel, Peter G. Pappas, Carol A. Kauffman, David Andes, Daniel K. Benjamin, Jr., Thierry F. Calandra, John E. Edwards, Jr., Scott G. Filler, John F. Fisher, Bart-Jan Kullberg, Luis Ostrosky-Zeichner, Annette C. Reboli, John H. Rex, Thomas J. Walsh, and Jack D. Sobe. Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 5, p. 503–535, 2009. VER NOMES
4. Colombo, A. L.; Guimarães, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599–607, 2003.
5. Chen, C. Y., Huanga, S.Y., Tsaya, W., Yaoa, M., Tanga, J.L., Koa, B.S., Choua, W.C., Tiena, F.H., Hsueha, P.R. Clinical characteristics of candidaemia in adults with haematological malignancy, and antimicrobial susceptibilities of the isolates at a medical centre in Taiwan, 2001-2010. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 6, p. 533–538, 2012.
6. Ruhnke, M., Paiva, J.A., Meersseman, W., Pahl, J., Grigoras, I., Sganga, G., Menichetti, F., Montravers, P., Auzinger, G., Dimopoulos, G., Sá, M.B., Miller, P.J., Marček, T. and Kantecki, M. Anidulafungin for the treatment of candidaemia/invasive candidiasis in selected critically ill patients. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, n. 7, p. 680–687, 2012
7. Ahmadi, A., Ardehali, S.H., Beigmohammadi, M.T., Hajiabdolbaghi, M., Hashemian, S.M.R., Kouček, M., Majidpour, A., Mokhtari, M., Moghaddam, O.M., Najafi, A., Nejat, R., Niakan, M., Lotfi, A.H., Amirsavadkouhi, A., Shirazian, F., Tabarsi, P., Taher, M.T. and Torabi-Nami, M. Invasive candidiasis in intensive care unit; consensus statement from an Iranian panel of experts, July 2013. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 5, n. 3, p. 1-10, 2014.
8. Bassetti, M., Merelli, M., Righi, A., Diaz-Martin, A., Rosello, E.V., Luzzati, R., Parra, A., Trecarichi, E.M., Sanguinetti, M., Posteraro, B., Garnacho-Montero, J., Sartor, A., Rello, J. and Tumbarello, M.. Epidemiology, Species Distribution, Antifungal Susceptibility, and Outcome

or Candidemia across Five Sites in Italy and Spain,. **Journal of Clinical Microbiology**. v.51, n.12, p. 4167-4172,2013

9. Quindós, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 31, n. 1, p. 42–48, 2014.

10. Bassetti, M., Righi, E., Ansaldi, F., Merelli, M., Cecilia, T., De Pascale, G., Diaz-Martin, A., Luzzati, R., Rosin, C., Lagunes, L., Trecarichi, E.M., Sanguinetti, M., Posteraro, B., Garnacho-Montero, J., Sartor, A., Rello, J., Rocca, G.D., Antonelli, M. and Tumbarello, M. A multicenter study of septic shock due to candidemia: outcomes and predictors of mortality. **Intensive Care Medicine**, v. 40, n. 6, p. 839-845, 2014.

11. Colombo, A. L., Guimarães, T., Camargo, L.F.A., Richtmann, R., Queiroz-Telles, F., Sallese, M.J.C., Cunha, C.A., Yasudag, 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. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283–312, 2013.

12. Mímica, L. M. J., Ueda, S.M.Y., Martino, M.D.V., Navarini, A., Martini, I.J. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 1, p. 17–23, 2009.

13. Taj-Aldeen, S. J., Kolečka, A., Boesten, R., Alolaqi, A., Almaslamani, M., Chandra, P., Meis, J.F., & Boekhout, T. Epidemiology of candidemia in Qatar, the Middle East: Performance of MALDI-TOF MS for the identification of *Candida* species, species distribution, outcome, and susceptibility pattern. **Infection**, v. 42, n. 2, p. 393–404, 2014.

14. Pfaller, M.A., Diekema, D. J., Jones, R.N., Messer, S.A., Hollis, R.J. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 3, p. 852–6, 2002.

15. Alves, I. A.; De Camargo, F. P.; Goulart, L. S. Identificação por PCR e sensibilidade a antifúngicos de isolados clínicos vaginais de *Candida* sp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 575–579, 2010.
16. Buchan, A.B., Blake W. Buchan, a,b Nathan A. Ledebroer,b. Advances in identification of clinical yeast isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1359–1366, 2013.
17. Spanu, T., Posteraro,B., Fiori,B., D’Inzeo,T., Campoli,S., Ruggeri, A., Tumbarello,M., Canu, G., Trecarichi,E.M., Parisi,G., Tronci,M., Sanguinetti, M. and Faddaa, G .Direct MALDI-TOF mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida* species causing bloodstream infections: An observational study in two large microbiology laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 176–179, 2012.
18. Teixeira, H., Magalhães JJ, Matias C, Lyra JM, Magalhães V, Lucena-Silva N, Melo HR, Jucá MB, Brito CA. Evaluation of multiplex PCR in first episodes of febrile neutropenia as a tool to improve early yeast diagnosis in leukemic/preleukemic patients. **Supportive Care in Cancer** , v. 22, n. 10, p. 2861-6, 2014
19. Fredricks, D. N.; Smith, C.; Meier, A. Comparison of Six DNA Extraction Methods for Recovery of Fungal DNA as Assessed by Quantitative PCR Comparison of Six DNA Extraction Methods for Recovery of Fungal DNA as Assessed by Quantitative PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 5122–5128, 2005.
20. Mannarelli, B. M.; Kurtzman, C. P. Rapid Identification of *Candida albicans* and Other Human Pathogenic Yeasts by Using Short Oligonucleotides in a PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 1634–1641, 1998.
21. Adhikary, R., Joshi, S. Species distribution and anti-fungal susceptibility of Candidaemia at a multi super-specialty center in Southern India. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 29, n 3, p. 309-311, 2011.

22. Al Tthaqafi, A.H.O. et al. Predictors and outcomes of *Candida* bloodstream infection: Eight-year surveillance, Western Saudi Arabia. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 5–9, 2014.
23. Chander, J., Singla, N., Sidhu, S.K., Gombar, S. Epidemiology of *Candida* blood stream infections: Experience of a tertiary care centre in North India. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 7, n. 9, p. 670–675, 2013.
24. Tang, H.J., Liu, W.L., Lin, H.L., Lai, C.C. Epidemiology and prognostic factors of candidemia in cancer patients. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e99103, 2014.
25. Li, C., Wang, H., Yin, M., Han, H., Yue, J.F., Zhang, F., Shan, T.C., Guo, H.P. and Wu, D.H. The Differences in the Epidemiology and Predictors of Death between Candidemia Acquired in Intensive Care Units and Other Hospital Settings. **Internal Medicine**, v. 54, n. 23, p. 3009–3016, 2015.
26. Bailly, S., Maubon, D., Fournier, P., Pelloux, H., Schwebel, C., Chapuis, C., Foroni, L., Cornet, M., Timsit, J.F. Impact of antifungal prescription on relative distribution and susceptibility of *Candida* spp. – Trends over 10 years. **Journal of Infection**, v. 72, n. 1, p. 103–11, 2016
27. Kim, S.J., Cheong, J.H., Min, Y.H., Choi, Y.J., Lee, D.G., Lee, J.H., Yang, D.H., S Lee, S.M., Kim, S.H., Kim, Y.S., Kwak, J.Y., Park, J., Kim, J.Y., Kim, H.G., Kim, S.B., Ryoo, H.M., Jang, J.H., Kim, M.K., Kang, H.J., Cho, I.S., Mun, Y.C., Jo, D.Y., Kim, H.Y., Park, B.B and Kim, J.S. Success rate and risk factors for failure of empirical antifungal therapy with itraconazole in patients with hematological malignancies: a multicenter, prospective, open-label, observational study in Korea. **Journal of Korean Medical Science**, v. 29, n. 1, p. 61–68, 2014.
28. Jeong, S.H., Kim, D.Y., Jang, J.H., Mun, Y.C., Choi, C.W., Kim, S.Y., Kim, J.S. and Park, J.S. Efficacy and safety of micafungin versus intravenous itraconazole as empirical antifungal therapy for febrile neutropenic patients with hematological malignancies: a randomized, controlled, prospective, multicenter study. **Annals of Hematology**, v. 95, p. 337–344, 2016.

29. Mousset, S., Buchheidt, D., Heinz, W., Ruhnke, M., Cornely, O.A., Egerer, G., Krüger, W., Link, H., Neumann, S., Ostermann, H., Panse, J., Penack, O., Rieger, C., Schmidt-Hieber, M., Silling, G., Südhoff, T., Ullmann, A.J. Wolf, H.H., Maschmeyer, G. and Böhme, A. Treatment of invasive fungal infections in cancer patients—updated recommendations of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). **Annals of Hematology**. V. 93, p. 13-32, 2014.

30. Lima-Neto, R., Santos C., Lima N., Sampaio P., Pais, C., Neves, R.P. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a Candida clinical isolates culture collection. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 515-522, June 2014

ANEXO A

Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS ASSOCIADAS A INFECÇÕES FÚNGICAS: PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

Pesquisador: Rejane Pereira Neves

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 36507614.0.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 877.913

Data da Relatoria: 20/11/2014

Apresentação do Projeto:

Indicado na relatoria inicial.

Objetivo da Pesquisa:

Indicado na relatoria inicial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Indicado na relatoria inicial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Indicado na relatoria inicial.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Indicado na relatoria inicial.

Recomendações:

s/recomendação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio da CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2125-8598

E-mail: cepccs@ufpe.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 877.913

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, na PLATAFORMA BRASIL, através de "Notificação" e, após apreciação, será emitido Parecer Consubstanciado.

RECIFE, 19 de Novembro de 2014

Assinado por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4. Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2125-8588

E-mail: ccscs@ufpe.br