



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

RODRIGO NISKIER FERREIRA BARBOSA

**CANDIDEMIA EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA: ESTUDO
EPIDEMIOLÓGICO MULTICÊNTRICO ASSOCIADO AO PERFIL FENOTÍPICO E
GENOTÍPICO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA**

Recife
2019

RODRIGO NISKIER FERREIRA BARBOSA

**CANDIDEMIA EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA: ESTUDO
EPIDEMIOLÓGICO MULTICÊNTRICO ASSOCIADO AO PERFIL FENOTÍPICO E
GENOTÍPICO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical.

Área de concentração: Medicina Tropical

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Pereira Neves

Coorientador: Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves Lima Neto

Recife
2019

B238c Barbosa, Rodrigo Niskier Ferreira.

Candidemia em unidade de terapia intensiva: estudo epidemiológico multicêntrico associado ao perfil fenotípico e genotípico dos fatores de virulência/ Rodrigo Niskier Ferreira Barbosa. – Recife: o autor, 2019.

100 f.; il.

Orientadora: Rejane Pereira Neves.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Medicina tropical.

Inclui referências e apêndices.

1. Candidemia. 2. Unidade de terapia intensiva. 3. Virulência. 4. Receptor Toll Like. I. Neves, Rejane Pereira (orientadora). II. Título.

616 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2019 - 141)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS (CCM)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RODRIGO NISKIER FERREIRA BARBOSA

**CANDIDEMIA EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA: ESTUDO
EPIDEMIOLÓGICO MULTICÊNTRICO ASSOCIADO AO PERFIL FENOTÍPICO E
GENOTÍPICO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical.

Aprovado em: 21/02/2019.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dr^ª. Rejane Pereira Neves (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^ª. Dr^ª. Neide Santos (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^ª. Dr^ª. Carolina Maria da Silva (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Guilherme Maranhão Chaves (Examinador Externo)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Prof^ª. Dr^ª. Maria Daniela Silva Buonafina (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

A Deus,
A quem agradeço por todos os aspectos da minha vida.

À minha mãe, Maria da Glória Ferreira Barbosa (*in memoriam*), por me ensinar o sentido eterno do amor e a importância dos estudos.

AGRADECIMENTOS

Neste momento da minha vida, tenho a agradecer:

A Deus, por se fazer sempre presente em todos os momentos da minha vida e a quem consagro as superações e vitórias alcançadas.

Àquela a quem devo a minha própria existência e que, carinhosa e pacientemente, assistiu-me dia após dia, amparando e perdoando todas as minhas falhas: minha mãe, Maria da Glória Ferreira Barbosa (*in memoriam*). Por essa razão, pedirei aos aqui não citados, que, igualmente, me perdoem por mencionar alguns poucos e caros amigos, dado a exiguidade do espaço.

Aos meus familiares, pelo suporte essencial à minha formação ética e conservadora.

À minha orientadora, professora Dra. Rejane Pereira Neves e ao meu coorientador, professor Dr. Reginaldo Gonçalves Lima-Neto, pelo exemplo de dedicação, comprometimento e ética, dignos dos méritos pela inspiração profissional despertada em mim.

A todos os meus mestres da formação fundamental, média, graduação e pós-graduações, pelos conhecimentos e exemplos que construíram minha base intelectual e profissional.

A todo departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, pela dedicação e exemplos essenciais à minha formação.

Aos colegas do Laboratório de Micologia Médica, em especial à Madi Diniz, Ana Paula e Michael por todo suporte e coleguismo, sem os quais este trabalho não teria sido possível.

A todos os profissionais dos hospitais e laboratórios envolvidos neste trabalho, direta ou indiretamente, pelo profissionalismo e dedicação.

Aos responsáveis e participantes deste trabalho, pelo valoroso consentimento em fazer parte desta pesquisa, viabilizando, assim, a sua realização.

Aos membros das bancas de qualificação e examinadora, pelas considerações mencionadas para melhoria significativa deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), pelo fomento concedido a esta pesquisa.

RESUMO

O desenvolvimento e a gravidade da candidemia observada em pacientes hospitalizados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) normalmente estão associados as condições clínicas dos pacientes e a virulência das espécies de *Candida*. Entretanto, alguns pacientes não desenvolvem tal infecção, mesmo com uma combinação de vários fatores de risco. Atribui-se papel importante para polimorfismos em genes com função imunológica, tais como o receptor *Toll Like-1 (TLR1)*. O objetivo deste trabalho foi verificar a distribuição das espécies de *Candida* como agentes etiológicos de infecções fúngicas na corrente sanguínea de pacientes em UTIs de hospitais públicos de Pernambuco e da Paraíba, entre os anos de 2015 e 2017, a capacidade de adesão celular *in vitro* e a possível associação da infecção com o polimorfismo rs5743611. As leveduras foram identificados por automação e pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O fenótipo de virulência foi verificado a partir de ensaio *in vitro* de adesão às células epiteliais. A distribuição do polimorfismo rs5743611 foi determinada a partir de PCR seguida de ensaios com enzima de restrição. Foram obtidas 74 amostras para espécies do gênero *Candida*. Informações clínicas de 80 pacientes com cultura não obtida constituíram o grupo controle. Foi evidenciada *Candida albicans* em 31 amostras (41,89%), *C. tropicalis* em 26 (35,14%), *C. parapsilosis* em 11 (14,86%) e *C. glabrata* em seis (8,11%). Houve diferença significativa em relação ao uso de imunossupressores ($p = 0,0008$), neutropenia ($p < 0,0001$), uso prévio de antibacteriano ($p < 0,0001$), tempo de permanência na UTI superior a 14 dias ($p = 0,001$), uso de cateter venoso central ($p < 0,0001$), nutrição parenteral ($p < 0,0001$) e ventilação mecânica ($p < 0,0001$). O maior percentual de isolados com forte capacidade de aderência foi verificado para *C. albicans*. Todos os isolados de *C. glabrata* foram caracterizados com fraca capacidade de aderência. A distribuição dos genótipos do polimorfismo rs5743611 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,3594$). Os dados encontrados mostram que espécies de *Candida* não-*albicans* apresentam-se como importantes agentes etiológicos de candidemia. A diferença na virulência das espécies isoladas não foi significativa nas amostras analisadas. Os resultados deste trabalho sugerem, ainda, um papel secundário do polimorfismo rs5743611 na susceptibilidade a candidemia.

PALAVRAS-CHAVE: Candidemia. Unidade De Terapia Intensiva. Virulência. Receptor Toll Like.

ABSTRACT

The development and severity of candidemia observed in patients hospitalized in Intensive Care Units (ICUs) are usually associated with the clinical conditions of the patients and the virulence of the *Candida* species. However, some patients do not develop such an infection, even with a combination of several risk factors. Important role for polymorphisms in genes with immunological function, such as the Toll Like-1 receptor (TLR1), is attributed. The objective of this work was to verify the distribution of *Candida* species as etiological agents of fungal infections in the blood of patients in ICUs of public hospitals of Pernambuco and Paraíba between 2015 and 2017, in vitro cell adhesion capacity and the possible association of the infection with the rs5743611 polymorphism. The yeasts were identified by automation and by the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. The virulence phenotype was verified from the in vitro assay of epithelial cell adhesion. The distribution of the rs5743611 polymorphism was determined from PCR followed by restriction enzyme assays. A total of 74 samples were obtained for species of the genus *Candida*. Clinical information of 80 patients with no culture was the control group. *Candida albicans* was found in 31 samples (41.89%), *C. tropicalis* in 26 (35.14%), *C. parapsilosis* in 11 (14.86%) and *C. glabrata* in six (8.11%). There was a significant difference in the use of immunosuppressants ($p = 0.0008$), neutropenia ($p < 0.0001$), previous antibacterial use ($p < 0.0001$), ICU stay longer than 14 days ($p = 0.001$), central venous catheter use ($p < 0.0001$), parenteral nutrition ($p < 0.0001$) and mechanical ventilation ($p < 0.0001$). The highest percentage of isolates with strong adhesion capacity was verified for *C. albicans*. All *C. glabrata* isolates were characterized with poor adherence. The distribution of rs5743611 polymorphism genotypes did not present a statistically significant difference between the groups ($p = 0.3594$). The data found show that *Candida* non-*albicans* species present as important etiological agents of candidemia. The difference in virulence of the isolated species was not significant in the analyzed samples. The results of this work also suggest a secondary role of the rs5743611 polymorphism in the susceptibility to candidemia.

KEY WORDS: Candidemia. Intensive Care Unit. Virulence. Receptor Toll Like.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão da Literatura

FIGURA 1 - Variação geográfica na distribuição das espécies de *Candida* não-albicans. Os dados referentes às notificações de *C. auris* foram obtidos a partir do Centro de Controle de Doenças e Prevenção, dos Estados Unidos (Centers for Disease Control and Prevention, CDC), acessado em 27 de Março de 2018.

Fonte: Adaptado de (PAPPAS et al., 2018). 18

FIGURA 2 - Origem da candidemia através de fonte endógena ou por uso de cateter intravascular e disseminação da infecção.

Fonte: Adaptado de (KULLBERG; ARENDRUP, 2015). 23

Material e Métodos

QUADRO 1 - Operacionalização e categorização das variáveis independentes. 32

QUADRO 2 - Operacionalização e categorização das variáveis dependentes. 33

LISTA DE TABELAS

Revisão da Literatura

TABELA 1 -	Taxas de incidência anual de casos de candidemia a partir de estudos multicêntricos ou populacionais.	17
TABELA 2 -	Distribuição proporcional das cinco espécies mais incidentes em casos de candidemia evidenciados em pacientes internados nas UTIs.	21

Material e Métodos

TABELA 3 -	Primers utilizados e tamanho dos produtos amplificados (amplicons).	36
------------	---	----

Artigo 1

TABELA 1 -	Primers utilizados e tamanho dos produtos amplificados (amplicons).	43
TABELA 2 -	Caracterização das variáveis independentes entre os pacientes com hemocultura positiva para espécies de <i>Candida</i> e para o grupo controle	46
TABELA 3 -	Distribuição das espécies de 74 isolados de <i>Candida</i> em pacientes internados nas UTIs, média de dias de internamento e percentual de óbitos.	47
TABELA 4 -	Capacidade de aderência verificada através de ensaio <i>in vitro</i> das espécies isoladas.	47
TABELA 5 -	Distribuição das espécies de <i>Candida</i> isoladas de pacientes internados em UTIs no Brasil.	49

Artigo 2

TABELA 1 -	Primers utilizados e tamanho dos produtos amplificados (amplicons).	58
TABELA 2 -	Distribuição dos genótipos para o polimorfismo rs5743611 no grupo de pacientes com candidemia e no grupo controle.	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BHI	Brain Heart Infusion
CLR	C type Lectin Receptor
CTAB	Brometo de Cetrimônio
CVC	Cateter Venoso Central
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FcγRs	Receptor para porção Fc de Imunoglobulinas G
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IC95%	Intervalo de confiança de 95%
ICAM	Molécula de Adesão Intercelular
IL	Interleucina
ITS4	Internal Transcribed Spacers 4
NETs	Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos
PAMP	Padrão Molecular Associado aos Patógenos
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PRR	Receptor de reconhecimento de patógenos
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Simples
TAE	Tris-Ácido bórico-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TLR	Toll-like receptor
USA	Estados Unidos da América
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	Candidemia em pacientes nas Unidades de Terapia Intensiva.....	15
2.2	Distribuição das espécies de <i>Candida</i> isoladas em UTIs	16
2.3	Fatores de risco para o desenvolvimento da candidemia em UTIs	22
2.4	Virulência das espécies isoladas em casos de candidemia nas UTIs	25
2.5	Resposta imunológica às infecções por <i>Candida</i> spp. na corrente sanguínea... 26	
2.6	Predisposição genética à candidemia e papel do receptor TLR1	28
3	OBJETIVOS.....	30
3.1	Objetivo Geral.....	30
3.2	Objetivos Específicos	30
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1	Desenho do estudo.....	31
4.2	População Alvo	31
4.3	Amostragem e critérios de inclusão e exclusão	31
4.4	Definição das Variáveis	32
4.5	Métodos de Coleta e Análise das Amostras.....	34
4.5.1	<i>Coleta das Amostras e Identificação Micológica</i>	<i>34</i>
4.5.2	<i>Avaliação in vitro da Capacidade de Aderência</i>	<i>34</i>
4.5.3	<i>Análise Molecular pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....</i>	<i>35</i>
4.5.4	<i>Metodologia de Análise de Dados</i>	<i>37</i>
5	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	38
6	RESULTADOS.....	39
6.1	Candidemia em unidades de terapia intensiva em dois hospitais terciários do nordeste do Brasil entre 2015 e 2017	40
6.2	Polimorfismo TLR1 R80T em pacientes com candidemia em unidades de terapia intensiva de hospitais públicos de Pernambuco e Paraíba nos anos 2015 a 2017	55
7	CONCLUSÕES DA TESE	64
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
	REFERÊNCIAS	66

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E	
ESCLARECIDO	72
APÊNDICE B – VERSÃO EM INGLÊS DO ARTIGO 1.....	75
APÊNDICE C – VERSÃO EM INGLÊS DO ARTIGO 2	91

1 INTRODUÇÃO

A infecção na corrente sanguínea por fungos do gênero *Candida* representa uma importante causa de complicações clínicas durante a permanência dos pacientes nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI). As razões para isso podem envolver características fenotípicas do patógeno associadas a fatores de susceptibilidade do hospedeiro. Porém, esta possível relação ainda é pouco abordada nos estudos sobre candidemia em pacientes nestas condições (COLOMBO et al., 2014; SILVA et al., 2015; DOI et al., 2016).

Em relação à distribuição das espécies, *Candida albicans* tem sido a mais frequentemente isolada, seguida de *C. glabrata* nos trabalhos europeus e norte-americanos (GUINEA, 2014; YAPAR, 2014). A maioria dos estudos brasileiros concentram-se no sul, centro-oeste e sudeste do país, sendo escassos no nordeste, e evidenciam, em contrapartida, *C. tropicalis* e o complexo *C. parapsilosis* como espécies de *Candida* não-*Candida albicans* mais incidentes, com variabilidade nas frequências encontradas (ARCHIMEDES et al., 2017; BREDÁ et al., 2017; MATTOS et al., 2017). Estas diferenças ainda não estão bem esclarecidas, o que justifica a necessidade de ampliar as investigações em diferentes regiões do Brasil.

A UTI representa um ambiente com características e dinâmica particulares no ambiente hospitalar. As infecções invasivas por *Candida* são 10-20 vezes maiores neste setor (EPELBAUM; CHASAN, 2017). Identificar o paciente sob risco de desenvolver candidemia é importante, uma vez que a resistência aos antifúngicos nos isolados típicos de *Candida* e o surgimento de novas espécies virulentas e multirresistentes, como *C. auris*, dificultam a decisão terapêutica (LOCKHART et al., 2017).

Além da virulência do patógeno, como a capacidade de adesão celular, e fatores de risco inerentes às condições clínicas dos pacientes, tais como o uso de cateter venoso central (CVC), ventilação mecânica, sonda vesical e nutrição parenteral, a predisposição genética relacionada a elementos imunológicos do hospedeiro podem contribuir para incidência e prognóstico da candidemia. Polimorfismos nos genes *Toll-Like Receptor 1*, *2* e *4* (*TLR1*, *TLR2* e *TLR4*) podem aumentar a suscetibilidade a este tipo de infecção (VAN DER GRAAF et al., 2006; TAGHAVI et al., 2017).

Esta evidência foi demonstrada em um estudo apenas nas variantes do gene *TLR1* em caucasianos norte-americanos (PLANTINGA et al., 2012). O polimorfismo rs5743611 (R80T, troca do aminoácido Arginina por Treonina na posição 80 da cadeia

polipeptídica codificada pelo gene *TLR1*) foi o mais significativo e apresentou uma *odds ratio* de 1,82 (IC de 95% 1,12-2,98) na associação com aumento da susceptibilidade a candidemia. Este tipo de abordagem no estudo da candidemia é escasso no Brasil, apesar de um trabalho ter revisado a importância dos genes *TLR* na susceptibilidade a diversos tipos de infecções (FRAZÃO; ERRANTE; CONDINO-NETO, 2013).

Neste estudo, foi verificada a distribuição das espécies de *Candida* como agentes etiológicos de infecções fúngicas na corrente sanguínea de pacientes em UTIs de hospitais públicos de Pernambuco e da Paraíba, entre os anos de 2015 e 2017, a capacidade de adesão celular *in vitro* e a contribuição do polimorfismo rs5743611 na suscetibilidade a esta infecção.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Candidemia em pacientes nas Unidades de Terapia Intensiva

Fungos do gênero *Candida* apresentam crescimento macroscópico em laboratório como colônias de cor creme-amareladas e microscopicamente como leveduras em brotamento. A espécie clinicamente mais incidente é *C. albicans*, um fungo pleomórfico capaz de sobreviver como levedura (blastocóneo) ou na forma micelial, dependendo de condições ambientais, tais como temperatura, umidade, aeração e substrato de desenvolvimento. Apresenta capacidade de formar hifas verdadeiras ou corpos alongados, chamados pseudohifas. As hifas originam-se a partir de projeções delgadas chamados tubos germinativos, característica distinta desta espécie (TREVIANO-CONTADOR; RUEDA; ZARAGOZA, 2016).

As manifestações clínicas de infecções fúngicas hospitalares podem se apresentar de várias formas: infecções da corrente sanguínea (fungemia), do trato urinário (ITU), de feridas cirúrgicas, abscessos de pele relacionadas à inserção do cateter, infecção do músculo cardíaco e outros (PLAYFORD et al., 2016).

A candidemia caracteriza-se pelo isolamento de *Candida* spp. na corrente sanguínea de pacientes sem evidências clínicas e laboratoriais de focos infecciosos nas vísceras. Na prática clínica, existem poucos casos para os quais há documentação do envolvimento de diferentes órgãos durante o episódio de candidemia. O padrão clínico mais frequente de apresentação de candidemia em adultos é a presença de febre que não responde à terapia com antibióticos. A febre pode ter um início insidioso, sem envolvimento significativo do quadro geral ou pode ser acompanhada por calafrios, mialgia, hipotensão e taquicardia. Eventualmente, alguns pacientes desenvolvem hipotermia e outras evidências de sepse (COLOMBO et al., 2013).

Apesar de ser considerada a quarta infecção de corrente sanguínea mais comum em unidades de terapia intensiva (UTIs), na maioria dos estudos populacionais a candidemia é relatada entre a sétima e décima infecção de corrente sanguínea mais comum. As taxas de incidência têm aumentado ou estão estáveis na maioria das regiões, embora taxas decrescentes tenham sido relatadas em áreas de alta incidência após a introdução de melhorias na higiene e no manejo da doença. O aumento no tempo de internação, a piora das condições clínicas e o eventual óbito associados a esta infecção

normalmente precedem o diagnóstico laboratorial positivo (MCCARTY; PAPPAS, 2016; EPELBAUM; CHASAN, 2017).

De acordo com um estudo de Prevalência Estendida em Terapia Intensiva (“Extended Prevalence of Infection in Intensive Care”, EPIC II), espécies do gênero *Candida* representam a terceira causa mais frequente de infecção em UTIs em todo o mundo, respondendo por 17% de todas as infecções em pacientes com hemocultura positiva (LAMOTH et al., 2018).

2.2 Distribuição das espécies de *Candida* isoladas em UTIs

A espécie *Candida albicans* é a mais comumente isolada na maioria dos estudos sobre candidemia em pacientes na UTI, apesar das proporções variarem geograficamente. Entretanto, em alguns casos, as espécies do complexo *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e do complexo *C. glabrata* revelam-se mais incidentes quando consideradas em conjunto (BREDA et al., 2017). A Tabela 1 apresenta as taxas de incidência anual de candidemia em estudos populacionais ou multicêntricos e a relação proporcional entre *C. albicans* e espécies de *Candida* não-*Candida albicans* (LAMOTH et al., 2018).

A distribuição de espécies tem mudado ao longo das últimas década, com uma diminuição na proporção de *C. albicans* e um aumento nos complexos de *C. glabrata* e de *C. parapsilosis*, principalmente. A distribuição geral das espécies depende da distribuição geográfica e características clínicas associadas aos pacientes. A mudança na epidemiologia das infecções por *Candida* em relação a espécies de *Candida* não-*Candida albicans* é clinicamente relevante por causa das altas taxas de resistência ao fluconazol entre os isolados do complexo *C. glabrata* e a resistência intrínseca ao fluconazol de *C. krusei* (LAMOTH et al., 2018). A Figura 1 apresenta um resumo da variação na distribuição das espécies de *Candida* não-*Candida albicans* em alguns estudos populacionais.

Um trabalho de âmbito global estimou a incidência das espécies de *Candida* isoladas a partir de infecções na corrente sanguínea em 1265 UTIs de 79 países (estudo EPIC II). Verificou-se uma frequência de 6,87 casos em cada 1000 pacientes internados nas UTIs. A espécie mais frequentemente isolada foi *C. albicans*, 70,7% considerando todos os continentes analisados. A maior incidência continental desta espécie foi

verificada na Europa (71,7%), enquanto a menor foi na América Latina (57,1%) (LAMOTH et al., 2018).

Tabela 1: Taxas de incidência anual de casos de candidemia a partir de estudos multicêntricos ou populacionais.

País	Período	Casos	incidência anual (casos/100 mil na população)	<i>Candida albicans</i> / <i>Candida não-Candida albicans</i> (%)
Estados Unidos	2013	515	9,5 – 14,4	35/65
Canadá	2003-2005	453	3,0	62/38
Noruega	2004-2012	1677	3,9	68/32
Finlândia	2004-2007	603	2,9	67/33
Islândia	2000-2011	208	5,7	56/44
Dinamarca	2004-2009	2649	8,6	58/42
Espanha	2010-2011	773	8,1	45/55
Escócia	2007	242	4,8	50/50
Austrália	2014-2015	527	2,4	44/56
Incidência anual (casos/1000 admissões)				
Bélgica	2013-2014	338	0,4	50/50
Peru	2013-2015	157	2,0	28/72
América latina*	2008-2010	672	0,3-2,0	38/62
Índia	2011-2012	1601	0,3-2,9	41/59

* Estudo realizado com amostras de 21 hospitais terciários da Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Equador, Honduras e Venezuela.

Fonte: Adaptado de (LAMOTH et al., 2018)

Nos Estados Unidos da América (EUA), um estudo realizado em 56 hospitais, entre 1998 e 2006, verificou 1218 episódios de infecções na corrente sanguínea por *Candida* spp. A espécie *C. albicans* foi a mais prevalente, identificada em 611 casos (50,7%), seguido pelo complexo *C. parapsilosis* (17,4%), complexo *C. glabrata* (16,7%) e *C. tropicalis* (10,2%). A proporção de espécies de *Candida não-Candida albicans* aumentou significativamente ($p < 0,001$) ao longo do tempo (WISPLINGHOFF et al., 2014).

Proporções aproximadas foram observadas em um estudo conduzido durante um período de oito anos e sete meses (2003-2011) no mesmo país. Verificaram-se 161 casos de candidemia em 158 pacientes na UTI de um total de 16.074 admitidos. Dos isolados, 50% eram *C. albicans*, 19% complexo *C. glabrata*, 14% complexo *C. parapsilosis* e 7% *C. tropicalis*. Em relação aos pacientes, 52% eram do sexo feminino, apresentaram idade média de 59 anos (variando de 18 a 98) e 74% apresentavam doença de base clínica, enquanto os demais eram do setor cirúrgico. Destes, apenas três não desenvolveram sepse, dos quais dois foram a óbito. Entretanto, 43 desenvolveram sepse (13 óbitos, 30%) , 50 sepse severa (22 óbitos, 44%) e 65 choque séptico (42 óbitos, 65%). A frequência geral de óbitos foi, portanto, 49,07% (NG et al., 2015).

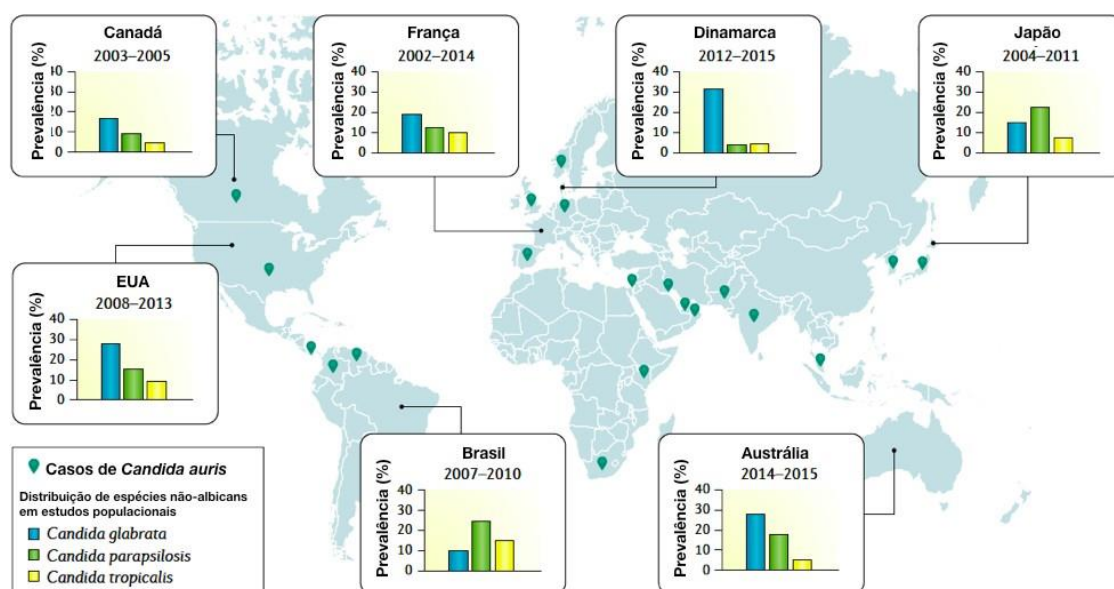


Figura 1: Variação geográfica na distribuição das espécies de *Candida* não-*Candida albicans*. Os dados referentes às notificações de *C. auris* foram obtidos a partir do Centro de Controle de Doenças e Prevenção, dos Estados Unidos (Centers for Disease Control and Prevention, CDC), acessado em 27 de Março de 2018. **Fonte:** Adaptado de (PAPPAS et al., 2018).

Em UTIs europeias e australianas o complexo *C. glabrata* é, geralmente, o isolado de *Candida* não-*Candida albicans* mais comum, sendo responsável por cerca de 20% das infecções. Apresenta-se menos virulenta que *C. albicans* e está associada ao aumento da idade e transplantes de órgãos sólidos. Isolados do complexo *C. tropicalis* equiparam-se com os de *C. albicans* em termos de virulência e é comparativamente bem menos frequente (aproximadamente 9%). Na América do Sul, por outro lado, essas proporções são inversas: *C. tropicalis* é o isolado *Candida* não-*Candida albicans* mais comum (aproximadamente 20%), enquanto o complexo *C. glabrata* é isolada em cerca

de 9% dos casos. Essas diferenças na distribuição das espécies podem ajudar a explicar as diferentes taxas de mortalidade associadas a candidemia relatadas na Europa (50%) e América do Sul (70%) (EPELBAUM; CHASAN, 2017).

Um estudo realizado entre 2009 e 2010 na África do Sul, envolvendo 11 hospitais públicos e 85 privados, evidenciou 1138 casos de candidemia, sendo 719 (63,2%) obtidos a partir de pacientes internados em UTIs. Entre os isolados dos hospitais públicos, *C. albicans* foi identificada em 46%, seguida do complexo *C. parapsilosis* (35%), complexo *C. glabrata* (7%), *C. krusei* (2%) e outras espécies (4%). Entretanto, nos hospitais privados o complexo *C. parapsilosis* foi a espécie mais prevalente, com uma proporção de 53%. Os dados referente as demais espécies não foram apresentados (GOVENDER et al., 2016).

Na Índia, um estudo realizado entre 2011 e 2012 investigou a incidência de candidemia em 27 UTIs médicas e cirúrgicas. Um total de 215.112 pacientes foram admitidos nas UTIs, dos quais 1.400 desenvolveram candidemia, resultando em uma incidência de 6,51 casos para cada 1.000 admissões (IC95% 6,18–6,86). Em relação aos isolados, *C. tropicalis* foi o mais prevalente (41,6%), seguido de *C. albicans* (20,9%) e o complexo *C. parapsilosis* (10,9%). Oito espécies causaram 92,8% dos casos, enquanto 7,2% foram infectados por 22 espécies menos comuns. Enquanto *C. tropicalis* foi a espécie *Candida* não-*Candida albicans* significativamente mais incidente em UTIs particulares (44,8% vs. 37,7%; $p = 0,035$), no setor público as mais comuns foram *C. auris* (8,2% vs. 3,9%; $p = 0,008$) e *C. rugosa* (5,6% vs. 1,5%; $p = 0,001$). A espécie emergente *C. auris* multirresistente foi isolado em 19 de 27 UTIs e compreendeu 5,2% de todos os isolados. Esta espécie foi significativamente mais comum em pacientes com cateterismo venoso central (6,8% vs. 2,9%; $p = 0,035$) (CHAKRABARTI et al., 2014).

Cinco grandes hospitais da China participaram de um estudo retrospectivo entre 2008 e 2010. Foi verificado que não houve diferença significativa na distribuição das espécies de *Candida* entre os pacientes das UTIs e outros setores dos hospitais. Entre os isolados das UTIs foi verificada uma incidência de 15,1 casos/1.000 internações. A espécie mais incidente foi *C. albicans* (40%), seguida de *C. tropicalis* (22,5%), complexo *C. parapsilosis* (15%), *C. krusei* (11,3%), complexo *C. glabrata* (10%) e *C. famata* (1,3%) (LI et al., 2015).

Na Rússia, foram analisados 322 isolados entre 2012 e 2014 em 37 setores clínicos (a maioria UTIs) das seis regiões federativas do país. Um total de 14 espécies foram identificadas: *C. albicans* (43.2%), complexo *C. parapsilosis* (20.2%), complexo

C. glabrata (11.5%), *C. tropicalis* (9.6%), *C. krusei* (6.2%), *C. guilliermondii* (5.3%), *C. lusitaniae* (1.3%), *C. pararugosa* (0.6%), *C. dubliniensis* (0.6%), *C. inconspicua* (0.3%), *C. bracarensis* (0.3%), *C. utilis*, *C. kefyr* (0.3%), e *C. lipolytica* (0.3%) (VASILYEVA et al., 2018).

No Brasil, um estudo denominado Vigilância e Controle Brasileiro de Patógenos de Importância Epidemiológica (“Brazilian Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance” - BrSCOPE), envolveu 16 hospitais públicos e privados participantes nas cinco regiões do Brasil. Dados clínicos e características microbiológicas foram coletadas e analisadas entre 2007 e 2010. Foram estudadas 2.563 episódios de infecções hospitalares com 2.688 microrganismos relatados pelos 16 centros participantes. Espécies do gênero *Candida* compreenderam o 7º agente mais prevalente, contabilizando 137 casos, dos quais 88 (64,2%) ocorreram em UTIs. A distribuição das espécies foi: *C. albicans* (34,3%), complexo *C. parapsilosis* (24,1%), *C. tropicalis* (15,3%), complexo *C. glabrata* (10,2%), *C. krusei* (1,5%), *C. pelliculosa* (1,5%), *C. lusitaniae* (0,7%), *C. famata* (0,7%), e *C. guilliermondii* (0,7%) (DOI et al., 2016).

A Tabela 2 apresenta a distribuição proporcional das cinco espécies mais incidentes em casos de candidemia evidenciados em pacientes internados nas UTIs em estudos no Brasil publicados recentemente.

Tabela 2: Distribuição proporcional das cinco espécies mais incidentes em casos de candidemia evidenciados em pacientes internados nas UTIs.

Local	Período	Nº Casos	<i>Candida albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	Outras	Referências
Campinas (SP)	2006-2010	53	43,4%	28,4%	7,5%	9,4%	3,8%	7,5%	(MORETTI et al., 2013)
São Paulo (SP)	2003-2012	647	44%	21,8%	9,9%	17,2%	2,5%	1,9%	(COLOMBO et al., 2014)
Londrina (PR)	2004-2011	108	28,7%	30,5%	8,3%	24,1%	1,8%	-	(DA COSTA et al., 2014)
Ribeirão Preto (SP)	2011-2012	18	36,8%	26,3%	15,7%	5,2%	5,2%	5,2%	(GASPAR et al., 2015)
Brasília (DF)	2011-2012	40	22,5%	2,5%	5%	70%	-	-	(PINHATI et al., 2016)
Campo Grande (MS)	2013-2014	221	35,3%	33,5%	15,8%	9,9%	3,2%	2,4%	(MATTOS et al., 2017)
Curitiba (PR)	2011-2016	149	45%	15,4%	14,1%	12,1%	6,7%	6,7%	(BREDA et al., 2017)

2.3 Fatores de risco para o desenvolvimento da candidemia em UTIs

A internação em UTIs é considerada um fator de risco isolado para o desenvolvimento de candidemia, devido a grande diversidade de procedimentos invasivos, existência de reservatórios ambientais e contaminação cruzada da assistência a que os pacientes são submetidos (YAPAR, 2014; MCCARTY; PAPPAS, 2016; LAMOTH et al., 2018). Inicialmente, os estudos sobre este tipo de infecção apontavam o potencial de transmissão nosocomial a partir de outros pacientes ou profissionais de saúde. No entanto, a autoinfecção é, em estudos mais recentes, considerada uma rota predominante para o desenvolvimento da fungemia. É necessária uma lesão no sistema tegumentar ou no revestimento intestinal concomitante ao crescimento excessivo da levedura para obter acesso à corrente sanguínea ou a outros locais. Os dados apontam o intestino como a fonte inicial de *Candida* spp endógena isolada em hemoculturas. Em estudos com modelos animais, evidenciou-se que a neutropenia com integridade intestinal preservada ou lesão intestinal sem neutropenia são condições insuficientes para o desenvolvimento de candidíase disseminada em um modelo murino. Em humanos, essa combinação de fatores se encontra na enterocolite neutropênica. (EPELBAUM; CHASAN, 2017).

Espécies de *Candida* que colonizam o intestino invadem por translocação ou por transposição anastomótica após laparotomia e causam infecção localizada profunda (por exemplo, peritonite) ou candidemia (Figura 2). Em pacientes com cateter intravascular a candidemia que se origina do intestino ou da pele leva à colonização do cateter e a formação de biofilme. As leveduras são posteriormente liberadas do biofilme causando candidemia persistente e podem se disseminar levando a infecções secundárias no pulmão, fígado, baço, rins, ossos ou olhos. Estas infecções podem permanecer localizadas ou levar à candidemia secundária. Durante a infecção, os fungos na corrente sanguínea podem predispor à candidúria. Menos frequentemente, a candidíase profunda pode ocorrer como resultado de pielonefrite ascendente e pode permanecer localizada ou levar à candidemia secundária (MCCARTY; PAPPAS, 2016; PAPPAS et al., 2018).

Outras situações que causam debilidade imunológica, como as advindas das condições clínicas de pacientes com diabetes, insuficiência renal e outras doenças crônicas, são apontados como importantes fatores de risco para candidemia em pacientes da UTI. A diferença pode estar na contribuição aditiva das intervenções,

particularmente a introdução de dispositivos mecânicos, incluindo CVC, equipamentos para hemodiálise, tubos endotraqueais, e cateteres urinários. (MONTAGNA et al., 2014; LI et al., 2015; MERMUTLUOGLU et al., 2017; LAMOTH et al., 2018).

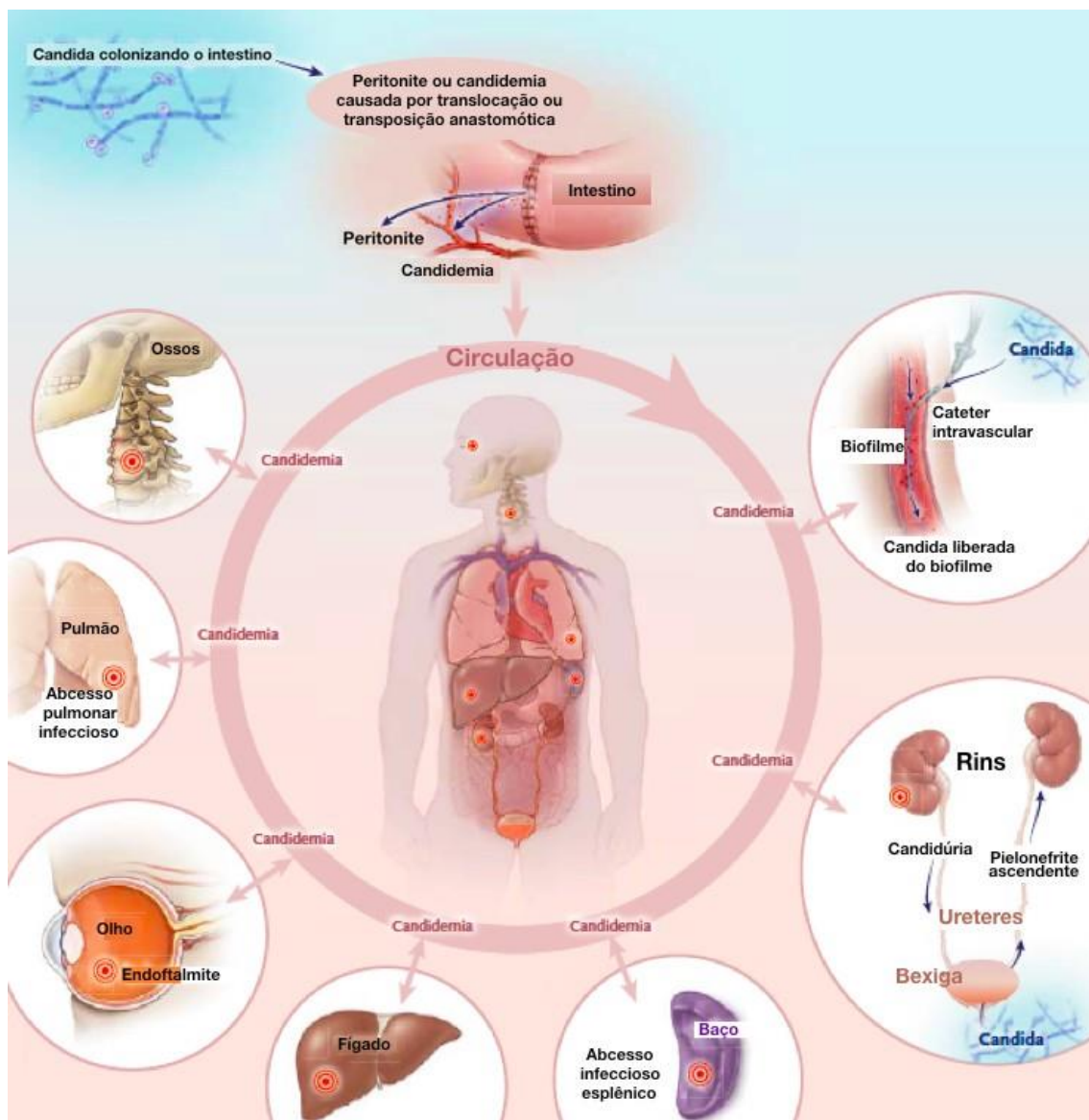


Figura 2: Origem da candidemia através de fonte endógena ou por uso de cateter intravascular e disseminação da infecção. **Fonte:** Adaptado de (MCCARTY; PAPPAS, 2016).

Além destes fatores, os casos de candidemia na UTI, quando comparados com os casos de outros setores, são caracterizadas por uma pré-exposição mais frequente ao fluconazol com subsequente tratamento com equinocandina, baixa incidência do complexo *C. parapsilosis* e maiores taxas de mortalidade bruta (COLOMBO et al., 2014). Em relação ao risco de óbito, alguns fatores independentes e associados à

candidemia na UTI podem incluir pacientes diabéticos, uso de ventilação mecânica, imunossupressão, febre, escore APACHE II alto, idade, uso de cateter arterial, infecção por *C. kefyr*, pré-exposição à caspofungina e falta de terapia antifúngica no momento dos resultados da hemocultura (LAMOTH et al., 2018).

Um estudo retrospectivo de âmbito global analisou a prevalência e fatores de risco associados à infecção por *Candida* spp na corrente sanguínea de pacientes internados em UTIs de 76 países. Um total de 14.414 pacientes foram incluídos no estudo. A prevalência de candidemia foi 6,9/1000 pacientes. Foi verificada coinfeção com bactérias em 38,4% dos casos. Nos casos de infecção apenas pela levedura, 59% eram do sexo masculino, com uma média de idade de 59 anos e estiveram internados por, em média, 14 dias na UTI. A condição de base mais comum foi câncer (24,6%), seguida de doença pulmonar obstrutiva crônica (13,1%). Em relação às intervenções clínicas, destacaram-se o uso de CVC (88,5%), ventilação mecânica (72,1%) e uso de cateter arterial (63,9%). A mortalidade foi observada em 42,6% destes pacientes (KETT et al., 2011).

Os estudos no Brasil apresentam resultados similares. Em um trabalho realizado em 16 hospitais das cinco regiões do país entre 2007 e 2010 foram identificados 137 pacientes com candidemia, dos quais 88 estavam em UTIs. A maioria dos pacientes era do sexo masculino (51,8%) e a média de idade foi 56 anos. A condição de base mais frequente foi câncer (32,1%), seguida de doença gastrointestinal (18,9%). Entre os principais fatores de risco foi observado o uso de CVC (88,3%) e ventilação mecânica (49,6%). A mortalidade foi observada em 85% dos pacientes internados na UTI que desenvolveram candidemia ($p < 0,01$) (DOI et al., 2016).

Em 2006, um grupo espanhol, usando o banco de dados do “Estudio de Prevalencia de Candidiasis”, identificou quatro preditores de infecção invasiva por *Candida* (LEÓN et al., 2006). Com base nesses preditores, uma pontuação denominada “Candida Score” foi construída. Em 2009, o mesmo grupo demonstrou uma significativa associação linear entre valores crescentes do “Candida Score” e a taxa de infecções invasivas por *Candida* (LEÓN et al., 2009). Tal pontuação pode ser útil para estratificar o risco comprovado de infecção por *Candida* e diferenciar pacientes que se beneficiariam do tratamento antifúngico precoce daqueles para quem a candidíase invasiva é altamente improvável.

Um estudo de coorte avaliou a performance do “Candida Score” em cinco UTIs na França. Verificou-se que dos 94 pacientes estudados, 44 tiveram uma pontuação = 2,

enquanto 29 tiveram uma pontuação = 3, outros 17 pacientes tiveram uma pontuação = 4, e apenas 4 pacientes tiveram uma pontuação = 5. Candidíase invasiva foi observada em cinco (5,3%) pacientes. Um paciente teve candidemia, três pacientes apresentaram peritonite e um paciente infecção pleural. As taxas de candidíase invasiva foi de 0% em pacientes com escore = 2 ou 3, 17,6% em pacientes com escore = 4 e 50% em pacientes com escore = 5 ($p < 0,0001$). Estes resultados confirmam que o “Candida score” é uma ferramenta interessante para diferenciar entre os pacientes da UTI que apresentam sepse grave adquirida no hospital ou choque séptico aqueles que se beneficiariam do tratamento antifúngico precoce (escore > 3) daqueles para quem a candidíase invasiva é improvável (escore ≤ 3) (LEROY et al., 2011).

2.4 Virulência das espécies isoladas em casos de candidemia nas UTIs

A razão pela qual alguns pacientes na UTI com fatores de risco conhecidos desenvolvem candidemia enquanto outros não, é provavelmente uma função da complexa interação dos fatores de risco, da virulência fúngica e das defesas do hospedeiro. A maioria dos estudos concentram-se em caracterizar os fatores de virulência associados à infecção por *C. albicans*, havendo um escassez de publicações sobre as outras espécies. Um dos motivos é o fato desta espécie ser um fungo pleomórfico, existindo como levedura, hifas ou pseudo-hifas. Experimentos com modelos animais têm demonstrado que restringir *C. albicans* a forma de levedura torna-a não virulenta, talvez pela redução da sua capacidade de resistir a fagocitose. Outro mecanismo de resistência ao sistema imunológico é a capacidade de formação de biofilme em superfícies naturais (mucosas) ou artificiais (cateteres) (EPELBAUM; CHASAN, 2017).

O significado da transição morfológica é evidenciado através de publicações que apresentam a forma filamentosa invariavelmente associada com alguma condição patológica, enquanto a forma de levedura pode ser encontrada no intestino e vagina de uma grande porcentagem da população sem causar sintomas. Os estímulos exógenos *in vitro* que levam a esta transição incluem a presença de soro a 37°C, N-acetilglucosamina, pH neutro, concentração de CO₂ em 5%, carência de nutrientes essenciais e microaerofilia (CASSONE, 2015).

A formação de hifas está associada a expressão de genes que codificam fatores de virulência, porém não são mandatórias para a formação e manutenção das mesmas. Estes incluem a proteína da parede da hifa Hwp1, a proteína de sequência semelhante à aglutinina Als3, as proteases aspárticas secretadas Sap4, Sap5 e Sap6 e proteínas associadas às hifas Ece1 e Hyr1. Estas proteínas contribuem para as propriedades especiais de hifas que são importantes para a virulência, contribuindo na adesão e invasão de células hospedeiras (OBATA, 2004; HÖFS; MOGAVERO; HUBE, 2016).

Assim, uma estimativa do perfil de virulência do fungo pode ser verificada através de ensaios *in vitro* avaliando a capacidade de aderência em células epiteliais ou contra superfícies de materiais sintéticos, tais como plásticos e metais (MISTRO et al., 2012). Por exemplo, em um estudo realizado com pacientes acometidos por infecção na corrente sanguínea por *C. tropicalis*, foi demonstrado que o aumento da capacidade de aderência, avaliada *in vitro*, estava associado com maior potencial para formação de biofilme e, conseqüentemente, maior virulência em pacientes submetidos a radioterapia (DA SILVA et al., 2017).

Forte capacidade de aderência *in vitro* foi evidenciada em 60% dos isolados de *C. albicans* e em 25% do complexo *C. parapsilosis* obtidos a partir da coleta de amostras em vários tecidos (LIMA-NETO et al., 2011). Considerando isolados apenas da corrente sanguínea, o perfil de aderência *in vitro* de *C. albicans* foi avaliado em um estudo onde se demonstrou que 30% apresentou forte capacidade quando comparados a uma cepa controle (ATCC 18804) (MANDELBLAT et al., 2017).

2.5 Resposta imunológica às infecções por *Candida* spp. na corrente sanguínea

Fungos do gênero *Candida* são colonizadores da pele humana e das mucosas nos tratos gastrointestinal e genitourinário em 30 a 50% dos indivíduos saudáveis. Em condições normais a defesa do hospedeiro humano impede este fungo comensal de se tornar um patógeno. Perda funcional da pele ou de barreiras mucosas, desequilíbrios do microbioma ou defeitos nos mecanismos de defesa imunológica podem levar a uma maior suscetibilidade a candidíase mucocutânea ou invasiva (DAVIDSON; NETEA; KULLBERG, 2018).

A resposta imunológica contra um patógeno, a exemplo dos fungos, inicia-se pelo reconhecimento de moléculas do agente infectante através de suas assinaturas químicas

conservadas, chamadas padrões moleculares associados a patógenos (“pathogen-associated molecular patterns” - PAMPs). Estes PAMPs são identificados por receptores de reconhecimento de patógenos (“pathogen recognition receptors” - PRRs). As populações celulares envolvidas no reconhecimento de *C. albicans* são monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (NETEA et al., 2015).

Os PAMPs encontrados em fungos do gênero *Candida* estão presentes na parede celular, que consiste de uma camada interna de polissacarídeos (quitina, 1,3- β -glucanas e 1,6- β -glucanas) e uma camada externa de proteínas glicosiladas com manana. Os principais PRRs envolvidos no reconhecimento são membros de uma família de receptores semelhantes a Toll (“Toll-Like Receptors” - TLRs) e os receptores de lectina do tipo C (“C type Lectin Receptors” - CLRs). O TLR2 forma um heterodímero funcional com TLR-1 que reconhece fosfolipomananas, o TLR4 reconhece mananas O-ligadas, o CLR dectina-1 reconhece β -glucanas. Os receptores CLRs de manose em macrófagos e os receptores não integrina captadores da molécula de adesão intercelular 3 e específicos de células dendríticas (“Dendritic Cell Specific-ICAM3-Grabbing Non-integrin” - DC-sign) reconhecem mananas N-ligadas (QIN et al., 2016).

A associação entre receptores TLR2-TLR1 ou TLR4 com os PAMPs de *Candida* spp. é bem caracterizada e induz a ativação da resposta imune inata, levando a síntese e liberação de citocinas, quimiocinas próinflamatórias e ativação do inflamossomo NLRP3, que converte as interleucinas IL-1 β e IL-18 para as formas ativas. Ocorre a subsequente ativação da inflamação e da resposta imune adaptativa. Concomitantemente, ocorrem fagocitose e morte do fungo, predominantemente por neutrófilos (DAVIDSON; NETEA; KULLBERG, 2018).

Apesar dos linfócitos CD₈ terem um papel na inibição do crescimento de *C. albicans* em estudos *in vitro*, o principal mecanismo da resposta imunológica adaptativa ocorre após fagocitose e processamento do fungo por células dendríticas que apresentam os antígenos gerados via moléculas de HLA classe II às células CD₄ *naive*, resultando em uma resposta com padrão T-helper (T_h) (RICHARDSON; MOYES, 2015). A proliferação destas células na presença de citocinas inflamatórias leva a diferenciação em subpopulações T_h1 e T_h17. As células T_h1 são induzidas por IL-18 e produzem IFN- γ , um importante potencializador da atividade fungicida de neutrófilos e macrófagos. Células T_h17 são induzidas por IL-1 β e produzem IL-17 e IL-22, que promovem o recrutamento e ativação de neutrófilos, bem como a liberação de β -defensinas antifúngicas por células epiteliais (NETEA et al., 2015).

Após a fagocitose, os neutrófilos utilizam mecanismos oxidativos e não oxidativos para eliminar o fungo. A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é mediada por um complexo proteico chamado nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase. A enzima mieloperoxidase catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio em ácido hipocloroso, o que amplifica a toxicidade das EROs. Neste contexto, a atividade fungicida depende da toxicidade das EROs e da liberação de proteases antifúngicas. Este mecanismo é essencial para depuração (*clearance*) da levedura opsonizada e depende da ligação aos receptores FcγRs e ativação da proteína quinase C. A morte não oxidativa leva a produção de fatores antimicrobianos tais como lisozima, lactoferrina, elastase, β-defensinas, gelatinases e catepsina G. Além de eliminar por fagocitose, os neutrófilos podem liberar fibras de cromatina formando armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). Estas NETs são capazes de eliminar leveduras, bem como hifas, ligando estas estruturas e liberando um peptídeo antifúngico chamado calprotectina (QIN et al., 2016).

2.6 Predisposição genética à candidemia e papel do receptor TLR1

Mesmo entre pacientes com uma combinação de vários fatores de risco para candidíase invasiva, a doença ocorre apenas em uma minoria de pacientes. Isto sugere um papel para variações genéticas subjacentes, que, em combinação com vários fatores de risco, possivelmente regulam a susceptibilidade do paciente em desenvolver candidemia. Vários polimorfismos em genes de regulação imunológica foram recentemente investigados quanto ao potencial de aumento ou diminuição da capacidade em adquirir ou eliminar a infecção. O diagnóstico desta predisposição subjacente ajudaria a determinar quais pacientes poderiam se beneficiar de tratamento antifúngico profilático ou imunoterapia adjuvante (MCCARTY; PAPPAS, 2016).

Estudos populacionais têm demonstrado um aumento na susceptibilidade a candidíase invasiva em indivíduos que apresentam variantes genéticas específicas envolvendo *IL10*, *IL12B*, *TNF*, *CXCR1*, *CX3CR1*, *STAT1*, *PSMB8*, *SP110*, *CCL8*, *TLR1*, *CD58*, *TAGAP* e *LCE4A-C1orf68*. Entre estes destacam-se os polimorfismo no gene *TLR1* (PAPPAS et al., 2018).

Os TLRs pertencem a uma superfamília de receptores de interleucinas, constituindo uma das categorias de PRRs. Em seres humanos existem 10 TLRs

funcionais identificadas (TLR1 – TLR10). Todos são receptores transmembranares do tipo 1, alguns expressos na superfície celular e outros nas membranas de vesículas ou organelas. O receptor TLR1 atua na membrana plasmática de neutrófilos, macrófagos e células dendríticas formando um heterodímero com TLR2 durante a sua ligação aos PAMPs. Essa interação promove a ativação da fagocitose e produção de citocinas inflamatórias, tais como IL-8, IL-6 e IL-1 β (NOREEN; ARSHAD, 2015).

Em um estudo prospectivo envolvendo pacientes de UTIs com candidemia e um grupo controle com a mesma doença subjacente, mas sem candidemia, três de polimorfismos de nucleotídeo único (“Single Nucleotide Polymorphism” - SNP) no gene *TLR1* (localização cromossômica 4p14 - banda quatro da região um no braço curto do cromossomo quatro) foram associados com suscetibilidade à candidemia entre os indivíduos caucasianos (R80T, S248N e I602S). Destes, o polimorfismo R80T (rs5743611) resulta na troca de arginina por treonina no códon 80 do gene, foi o que apresentou maior *Odds ratio* (OR = 1,82 com intervalo de confiança de 95% variando entre 1,12 e 2,98) com $p = 0,02$ (PLANTINGA et al., 2012).

O alelo variante do polimorfismo rs5743611 promove uma modificação na porção central extracelular do TLR1, levando a sensibilidade diminuída deste receptor pelos componentes da parede celular microbiana, em modelos *in vitro*. Além da candidemia, foi associado, em estudos anteriores, com retocolite ulcerativa (OR = 2,84; $p = 0,045$) e susceptibilidade aumentada para aspergilose invasiva em pacientes submetidos a transplante de células tronco hematopoéticas (OR = 1,3; $p < 0,01$) (KESH et al., 2005; PIERIK et al., 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Verificar se há associação entre o polimorfismo rs5743611 (R80T) do gene *Toll-Like Receptor-1* com a infecção na corrente sanguínea por espécies de *Candida* caracterizadas quanto a capacidade de aderência celular a partir de amostras sanguíneas de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva de hospitais públicos de Pernambuco e Paraíba nos anos 2015 a 2017.

3.2 Objetivos Específicos:

- Diagnosticar as espécies de *Candida* presentes nas amostras sanguíneas dos pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva nos referidos hospitais;
- Determinar a frequência alélica e genotípica do polimorfismo rs5743611 (R80T) do gene *Toll-Like Receptor 1*;
- Verificar a capacidade de adesão celular *in vitro* das espécies isoladas;
- Avaliar a influência dos fatores de risco para infecção na corrente sanguínea por *Candida* (fatores demográficos, de internamento na UTI, do histórico de doenças, do histórico de terapia medicamentosa e do status imunológico).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Estudo observacional, transversal, do tipo caso-controle com abordagem genética sobre a susceptibilidade dos pacientes à candidemia.

4.2 População Alvo

Os participantes desta pesquisa foram pacientes internados nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) do Hospital Agamenon Magalhães da Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco, localizado em Recife, e Hospital de Emergência e Trauma Senador Humberto Lucena, localizado em João Pessoa, Paraíba. Foram organizados em dois grupos:

1. Grupo de casos: Pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva, maiores de 18 anos e que possuíam solicitação médica para diagnóstico microbiológico, através de cultura a partir de amostra sanguínea, com resultado positivo para candidemia;
2. Grupo controle: Pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva, maiores de 18 anos e que possuíam solicitação médica para diagnóstico microbiológico, através de cultura a partir de amostra sanguínea, com resultado negativo para qualquer levedura. Os participantes do grupo controle não infectados foram hospitalizados sem histórico ou evidência de candidemia ou qualquer infecção fúngica invasiva.

4.3 Amostragem e critérios de inclusão e exclusão

As amostras foram obtidas pela demanda espontânea de pacientes que aceitaram participar do estudo mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A). Apenas as informações acerca dos aspectos clínicos dos

pacientes foram consultadas através dos prontuários e registradas em formulário específico.

Participantes do grupo controle que, ao longo da pesquisa, apresentaram episódios devidamente diagnosticados de candidemia, foram excluídos deste grupo (passando a fazer parte do grupo de casos). Foram excluídos também aqueles cujos dados eram insuficientes para análise estatística ou que apresentaram resultados inconclusivos no diagnóstico micológico.

4.4 Definição das Variáveis

A definição e categorização das variáveis independentes estão apresentadas no Quadro 1, enquanto das variáveis dependentes estão no Quadro 2.

Quadro 1: Operacionalização e categorização das variáveis independentes.

Variáveis Independentes	Definição	Categorização
Idade	Anos completos de vida no dia da coleta de sangue, de acordo com a data de nascimento.	Adulto (>18 anos e < 60 anos) Idoso (> 60 anos)
Gênero	Referente ao sexo biológico	Masculino Feminino
Uso de corticosteroides/ Imunossuppressores	Administração de medicação corticosteroide ou imunossupressora ao paciente durante o período de internação, verificada através de registro no prontuário até o dia da coleta de sangue.	Sim Não
Neutropenia	Diminuição no número de Neutrófilos, com contagem de leucócitos inferior a 500 células/mm ³ , verificada através da realização do hemograma a partir da coleta de sangue.	Sim Não
Infecção pelo HIV	Diagnóstico da infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana, verificado através da realização do exame sorológico a partir da coleta de sangue ou registro no prontuário.	Sim Não
Tratamento prévio com antibióticos	Paciente fez uso de antibióticos durante o período de internação, verificado através de registro no prontuário até o dia da coleta de sangue.	Sim Não
Quimioterapia nos últimos três meses	Paciente fez uso de medicamento quimioterápico nos últimos três meses até a data de coleta do sangue, verificado através de	Sim Não

	relato do próprio paciente ou do responsável.	
Tempo de permanência na UTI	Período de tempo registrado a partir da entrada do paciente na UTI, verificado através de registro no prontuário até o dia da coleta sanguínea.	<14 dias >14 dias
Intervenção cirúrgica	Paciente sofreu alguma intervenção cirúrgica durante o período de internação na UTI, verificado através de registro no prontuário até o dia da coleta de sangue.	Sim Não
Nutrição parenteral	Paciente fez uso de nutrição parenteral durante o período de internação na UTI, verificado através de registro no prontuário até o dia da coleta de sangue.	Sim Não
Uso de cateter venoso central	Paciente fez uso de cateter venoso central durante o período de internação na UTI, verificado através de registro no prontuário até o dia da coleta de sangue.	Sim Não
Uso de cateter urinário	Paciente fez uso de cateter urinário durante o período de internação na UTI, verificado através de registro no prontuário até o dia da coleta de sangue.	Sim Não
Uso de ventilação mecânica	Paciente fez uso de ventilação mecânica durante o período de internação na UTI, verificado através de registro no prontuário até o dia da coleta de sangue.	Sim Não
Doença de base	Enfermidade diagnosticada no paciente quando da sua internação hospitalar.	Clínica Cirúrgica
Polimorfismo rs5743611	Identificação, pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a partir da amostra sanguínea do paciente, do genótipo referente a substituição do aminoácido arginina (R) pela Treonina (T) na posição 80 do polipeptídeo codificado pelo gene <i>Toll-Like Receptor 1</i>	GG CC GC

Quadro 2: Operacionalização e categorização das variáveis dependentes.

Variáveis Dependentes	Definição	Categorização
Candidemia	Presença de levedura do gênero <i>Candida</i> na corrente sanguínea, a partir da amostra coletada, identificada através de automação e técnicas de biologia molecular.	<i>Candida albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. krusei</i> Outras
Capacidade de Aderência	Adesão das células de <i>Candida</i> à superfície de células epiteliais da mucosa oral em ensaio <i>in vitro</i> , observado no microscópio óptico.	Forte Frac Ausente

4.5 Métodos de Coleta e Análise das Amostras

4.5.1 Coleta das Amostras e Identificação Micológica

Até três amostras de sangue venoso foram coletadas assepticamente em dias consecutivos de cada participante da pesquisa por punção venosa em tubos Vacutainer® com EDTA e, posteriormente, acondicionadas em tubos contendo meio *Brain Heart Infusion* (BHI) para diagnóstico laboratorial micológico.

As hemoculturas foram testadas utilizando o sistema de cultura automatizado Bactec 9120/Phoenix™ BD-Becton Dickinson's (Sistemas de diagnóstico BD, Franklin Lakes, NJ, EUA).

4.5.2 Avaliação *in vitro* da Capacidade de Aderência

Os testes de aderência foram baseados em estudo previamente publicado (KEARNS; DAVIES; SMITH, 1983). Em todas as etapas relacionadas aos testes de aderência foi utilizado o tampão Phosphate Buffered Saline - PBS (NaCl 8g/L; KCl 0,2g/L; Na₂HPO₃ 1,44g/L, KH₂PO₄ 0,24 g/L, pH 7,2) esterilizado.

As células das leveduras isoladas foram cultivadas em ágar Malte (DIFCO, USA) por 36 horas a 37 °C e ressuspensas em 2mL de PBS a 0,1M, pH 6,8 e 4°C. Foram lavadas duas vezes em 2mL de PBS sob centrifugação (2.500 rpm, cinco minutos cada) e, por fim, ressuspensas novamente em PBS a uma concentração de 2×10^7 célula.mL⁻¹, determinada em câmara de Neubauer.

As células epiteliais foram coletadas de um voluntário adulto saudável, através de suave escarificação da mucosa oral com Swabs esterilizados. As células foram suspensas e lavadas duas vezes em 5mL de PBS por centrifugação (2.500 rpm por cinco minutos cada). As células foram ressuspensas em PBS para uma concentração de 4×10^4 células.mL⁻¹, determinada em câmara de Neubauer.

Os ensaios de aderência foram realizados incubando a 25°C uma mistura de 1mL de cada suspensão em um tubo de ensaio, sob suave agitação por duas horas. Em seguida, realizou-se a coloração com azul de metileno, com posterior observação em microscópio óptico. Em cada lâmina foram observadas 100 células epiteliais com relação ao percentual de sua área superficial na qual as leveduras aderiram.

Os resultados foram expressos como: forte aderência, para adesão em 50% a 100% da área superficial, fraca aderência, para adesão em até 50%, ou sem aderência visível (LIMA-NETO et al., 2011).

4.5.3 Análise Molecular pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA das leveduras isoladas foi extraído de acordo com uma metodologia previamente padronizada (FREDRICKS; SMITH; MEIER, 2005). Cada massa celular obtida foi transferida para tubos de extração rosqueados contendo pérolas de vidro. Foram pipetados 700 µL de tampão hexadecil trimetil amônio brometo-CTAB, pré-aquecido a 60°C por 30 segundos, nos tubos de extração contendo pérolas de vidro e a massa celular, sendo, então, agitados no FastPrep por 1 minuto a 5,5 m/s, seguido por incubação em banho-maria por 1 hora a 65°C.

Realizou-se centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos e cada sobrenadante foi transferido para tubos de 2,0 mL aos quais foi adicionada solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Foi, então, realizada outra centrifugação, nas mesmas condições anteriores. Cada sobrenadante foi recuperado e transferido para outro tubo, no qual se adicionou o mesmo volume de isopropanol. As amostras foram mantidas a -20°C por 30 minutos e, em seguida, realizou-se centrifugação nas mesmas condições. Após esta etapa, observou-se a formação do precipitado.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi submetido a três lavagens sucessivas com etanol 70%. Os tubos foram mantidos em posição horizontal à 37°C para completa evaporação espontânea do etanol. Posteriormente, foram adicionados 55µL de água ultra-pura ao DNA, mantido em geladeira para ressuspensão. O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria de luz ultravioleta a 260-280 nm (Nanodrop 1000 Spectrophotometer) e as concentrações foram ajustadas para 200ng/µL.

A identificação espécie-específica pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada a partir de protocolo previamente descrito (LI et al., 2003). O volume final por reação foi de 25µL, constituído por 20 ng de DNA, Taq Buffer 10x, dNTPs 10 mM, 0,8µL de cada primer (20pmol/µL) e Taq DNA polimerase 1,25 U. As condições para as amplificações realizadas em termociclador (THERM-1000, MAXYGENE, New York, USA) foram, desnaturação inicial a 92°C por dois minutos, seguida de 35 ciclos de

desnaturação a 95°C por um minuto, anelamento a 50°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto. Após os 35 ciclos seguiu-se a extensão final a 72°C por 10 minutos. Os primers utilizados neste trabalho estão na Tabela 3.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) durante 40 min a 3V/cm. O gel foi corado com *GelRed*TM e analisados sob luz ultravioleta, utilizando com referência os pesos moleculares previamente descritos (LI et al., 2003).

Tabela 3: Primers utilizados e tamanho dos produtos amplificados (amplicons).

Identificação	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho dos amplicons
<i>Candida albicans</i>	5'-TCAACTTGTCACAGATTATT-3'	402pb
<i>C. glabrata</i>	5'-CACGACTCGACACTTTCTAATT-3'	632pb
<i>C. tropicalis</i>	5'-AAGAATTTAACGTGGAACTTA-3'	149pb
<i>C. parapsilosis</i>	5'-GGCGGAGTATAAACTAATGGATAG-3'	126pb
ITS4*	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	-

* O ITS4 foi o *primer reverse*, enquanto os demais foram os *primers forwards* para cada amplicon gerado

Para investigação do polimorfismo rs5743611 foram extraídas amostras de DNA a partir do sangue dos participantes utilizando metodologia previamente padronizada (WAKAMIYA; SUZUKI, 2001). O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria de luz ultravioleta a 260-280 nm (Nanodrop 1000 Spectrophotometer) e as concentrações foram ajustadas para 200ng/μL.

A amplificação por PCR seguiu um protocolo previamente descrito (KIM et al., 2012). O volume final por reação foi de 25μL, constituído por 20 ng de DNA, Taq Buffer 10x, dNTPs 10 mM, *primers* 10pmol/μL (Forward 5'-AGGGTGGCAAGAAATCTTCA-3'; Reverse 5'-TCTGAGCTTTGGACTTCTGACA-3') e Taq DNA polimerase 1,5 U. As condições para as amplificações realizadas em termociclador (THERM-1000, MAXYGENE, New York, USA) foram, desnaturação inicial a 92°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 53°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Após os 35 ciclos seguiu-se a extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos da amplificação (165pb) foram evidenciados por eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) durante 20 min a 3V/cm. Após a confirmação, os produtos de PCR foram submetidos a digestão enzimática por 16 horas (*overnight*) a 37°C com a enzima de restrição *Hinf*I. Os fragmentos obtidos (Alelo G = 165pb, Alelo C = 94pb + 71pb) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 3% por 40 minutos. Em ambos os casos os géis foram corados com *GelRed*TM e analisados sob luz ultravioleta.

4.5.4 Metodologia de Análise de Dados

Para avaliar a associação da candidemia com as condições clínicas e com a capacidade de aderência dos isolados foram realizados o teste do qui-quadrado, teste Exato de Fisher e Análise Multivariada com Regressão Logística. Os teste foram realizados no programa GraphPad Prism 7 (San Diego, CA, USA).

O equilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo rs5743611 foi verificado pelo teste do qui-quadrado (χ^2) separadamente no grupo controle e pacientes com candidemia, utilizando o programa estatístico PLINK 1.9. Utilizou-se um modelo dominante de regressão logística (considerando o homozigoto para o alelo de menor frequência e o heterozigoto como genótipos em risco).

Em todos os casos foi estabelecido intervalo de confiança de 95% e o valor de “*p*” igual ou menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

A realização deste trabalho foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco sob o registro CAAE 40428414.0.0000.5208. As coletas foram realizadas mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo participante ou pelo seu responsável (APÊNDICE A). Foram respeitados e cumpridos os preceitos constantes na resolução 466/2012 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) CNS/MS, salvaguardando os direitos e a dignidade dos participantes de pesquisa.

6 RESULTADOS

Os resultados deste estudo estão apresentados na forma de dois artigos científicos:

ARTIGO 1: CANDIDEMIA EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA EM DOIS HOSPITAIS TERCIÁRIOS DO NORDESTE DO BRASIL ENTRE 2015 E 2017

ARTIGO 2: POLIMORFISMO rs5476311 EM PACIENTES COM CANDIDEMIA EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA DE HOSPITAIS PÚBLICOS DE PERNAMBUCO E PARAÍBA NOS ANOS 2015 A 2017.

SUBMETIDOS AO PERIÓDICO:

MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ISSN: 1678-8060

ÁREA DE AVALIAÇÃO: MEDICINA II

AVALIAÇÃO QUALIS: B2

6.1 Candidemia em unidades de terapia intensiva em dois hospitais terciários do nordeste do Brasil entre 2015 e 2017

INTRODUÇÃO

Segundo o estudo de Prevalência Estendida em Terapia Intensiva (“Extended Prevalence of Infection in Intensive Care”, EPIC II), espécies do gênero *Candida* representam a terceira causa mais frequente de infecção em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) em todo o mundo, respondendo por 17% de todas as infecções em pacientes com hemocultura positiva. A candidemia nesse grupo de pacientes terá como consequências a piora do quadro clínico, aumento no tempo de internação, dificuldade no tratamento e óbito (LAMOTH et al., 2018).

No Brasil, um estudo denominado Vigilância e Controle Brasileiro de Patógenos de Importância Epidemiológica (“Brazilian Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance” - BrSCOPE), envolveu 16 hospitais públicos e privados participantes nas cinco regiões do Brasil. Espécies do gênero *Candida* compreenderam o 7º agente mais prevalente, representando 137 casos, dos quais 88 (64,2%) ocorreram em UTIs. A distribuição das espécies foi: *C. albicans* (34,3%), complexo *C. parapsilosis* (24,1%), *C. tropicalis* (15,3%), complexo *C. glabrata* (10,2%), *C. krusei* (1,5%), *C. pelliculosa* (1,5%), *C. lusitaniae* (0,7%), *C. famata* (0,7%), e *C. guilliermondii* (0,7%). Estes dados divergem dos estudos europeus e norte-americanos, que apontam o complexo *C. glabrata* como a espécie *Candida* não-*Candida albicans* mais incidente (DOI et al., 2016).

Apesar dos dados populacionais estabelecerem importantes parâmetros clínicos sobre este tipo de infecção, os protocolos desenvolvidos a partir dos resultados de estudos amplos não podem ser diretamente extrapolados para aplicação de protocolos empíricos em grupos específicos pertencentes a esta população, pois podem haver divergências significativas nas distribuições e características dos isolados entre regiões (GOVENDER et al., 2016). Estas diferenças ainda não estão bem esclarecidas, o que justifica a necessidade de ampliar as investigações em populações específicas do Brasil, principalmente no Norte e Nordeste onde os estudos são mais escassos.

Devido a grande diversidade de condições clínicas às quais os pacientes são submetidos, a internação em UTIs é considerada um fator de risco isolado para o desenvolvimento de candidemia. Isso se deve a condição clínica do paciente (idade,

status imunológico e doença de base) e aos procedimentos aos quais é submetido neste setor (uso de cateter venoso central, equipamentos para hemodiálise, tubos endotraqueais, e cateteres urinários) (YAPAR, 2014; MCCARTY; PAPPAS, 2016; LAMOTH et al., 2018).

A variação na virulência das espécies de *Candida* é um dos fatores que pode influenciar no desenvolvimento e gravidade da infecção. Uma estimativa do perfil de virulência do fungo pode ser verificada através de ensaios *in vitro* avaliando a capacidade de aderência em células epiteliais ou contra superfícies de materiais sintéticos, tais como plásticos e metais. A maioria dos estudos, entretanto, concentram-se em caracterizar os fatores associados à infecção por *C. albicans*, havendo um escassez de publicações sobre as outras espécies (MISTRO et al., 2012).

Identificar o paciente sob risco de desenvolver tais infecções na UTI é um dos maiores desafios dos profissionais, uma vez que a resistência aos antifúngicos nos isolados típicos de *Candida* e o surgimento de novas espécies virulentas e multirresistentes, como *Candida auris*, dificultam a decisão terapêutica. Neste contexto, os estudos epidemiológicos representam uma importante fonte de informação para elaborações de protocolos que podem ser aplicados para início de tratamentos empíricos (LOCKHART et al., 2017)

O objetivo deste trabalho foi caracterizar os fatores de risco para os pacientes e virulência dos isolados em casos de candidemia a partir das UTIs de dois hospitais públicos do Nordeste do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho do Estudo e População Alvo

Trata-se de um estudo observacional, transversal, do tipo caso-controle. Os participantes desta pesquisa foram pacientes internados nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) do Hospital Agamenon Magalhães (Recife, PE) que possui 447 leitos sendo 59 de UTI e do Hospital de Emergência e Trauma Senador Humberto Lucena (João Pessoa, PB) que possui 330 leitos sendo 48 de UTI. O grupo de casos foi composto por pacientes internados em UTIs, maiores de 18 anos e que possuíam solicitação médica para diagnóstico microbiológico, através de hemocultura, com

resultado positivo para levedura. O grupo controle foi composto por pacientes adultos hospitalizados em UTIs sem histórico ou evidência de candidemia ou qualquer infecção fúngica invasiva ou que apresentaram resultado negativo para levedura após hemocultura.

Métodos de Coleta e Análise das Amostras

Até três amostras de sangue venoso foram coletadas assepticamente em dias consecutivos de cada participante da pesquisa por punção venosa em tubos Vacutainer® com EDTA por profissionais capacitados e, posteriormente, acondicionadas em tubos contendo meio *Brain Heart Infusion* (BHI, KASVI, Brasil) para diagnóstico laboratorial.

As hemoculturas foram testadas utilizando o sistema de cultura automatizado Bactec 9120/Phoenix™ BD-Becton Dickinson's (Sistemas de diagnóstico BD, Franklin Lakes, NJ, EUA).

As informações sobre as variáveis relacionadas aos participantes foram coletadas através de consultas aos respectivos prontuários. A realização deste trabalho foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco sob o registro CAAE 40428414.0.0000.5208.

Análise molecular por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA das leveduras isoladas foi extraído de acordo com uma metodologia previamente proposta (FREDRICKS; SMITH; MEIER, 2005). Cada massa celular obtida foi transferida para tubos de extração rosqueados contendo pérolas de vidro. Foram pipetados 700 µL de tampão hexadecil trimetil amônio brometo-CTAB, pré-aquecido a 60°C por 30 segundos, nos tubos de extração contendo pérolas de vidro e a massa celular, sendo, então, agitados no FastPrep por 1 minuto a 5,5 m/s, seguido por incubação em banho-maria por 1 hora a 65°C.

Foi realizada centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos e cada sobrenadante foi transferido para tubos de 2,0 mL aos quais foi adicionada solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Foi, então, realizada outra centrifugação, nas mesmas condições anteriores. Cada sobrenadante foi recuperado e transferido para outro tubo, no qual se

adicionou o mesmo volume de isopropanol. As amostras foram mantidas a -20°C por 30 minutos e, em seguida, realizou-se centrifugação nas mesmas condições. Após esta etapa, observou-se a formação do precipitado.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi submetido a três lavagens sucessivas com etanol 70%. Os tubos foram mantidos em posição horizontal à 37°C para completa evaporação espontânea do etanol. Posteriormente, foram adicionados 55µL de água ultra-pura ao DNA, mantido em geladeira para ressuspensão. O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria de luz ultravioleta a 260-280 nm (Nanodrop 1000 Spectrophotometer) e as concentrações foram ajustadas para 200ng/µL.

A identificação espécie-específica pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada a partir de protocolo previamente descrito (LI et al., 2003). O volume final por reação foi de 25µL, constituído por 20 ng de DNA, *Taq* Buffer 10x, dNTPs 10 mM, 0,8µL de cada primer (20pmol/µL) e *Taq* DNA polimerase 1,25 U. As condições para as amplificações realizadas em termociclador (THERM-1000, MAXYGENE, New York, USA) foram, desnaturação inicial a 92°C por dois minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por um minuto, anelamento a 50°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto. Após os 35 ciclos seguiu-se a extensão final a 72°C por 10 minutos. Os primers utilizados neste trabalho estão na Tabela 1.

Tabela 1: Primers utilizados e tamanho dos produtos amplificados (amplicons).

Identificação	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho dos amplicons
<i>Candida albicans</i>	5'-TCAACTTGTCACAGATTATT-3'	402pb
<i>C. glabrata</i>	5'-CACGACTCGACACTTTCTAATT-3'	632pb
<i>C. tropicalis</i>	5'-AAGAATTTAACGTGGAAACTTA-3'	149pb
<i>C. parapsilosis</i>	5'-GGCGGAGTATAAACTAATGGATAG-3'	126pb
ITS4*	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	-

* O ITS4 foi o *primer reverse*, enquanto os demais foram os *primers forwards* para cada amplicon gerado

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) durante 40 min a 3V/cm. O gel foi

corado com *GelRed*TM e analisados sob luz ultravioleta, utilizando com referência os pesos moleculares previamente descritos (LI et al., 2003).

Capacidade de Aderência *in vitro*

Os testes de aderência foram baseados em um estudo previamente publicado (KEARNS; DAVIES; SMITH, 1983). Em todas as etapas relacionadas aos testes de aderência foi utilizado o tampão Phosphate Buffered Saline - PBS (NaCl 8g/L; KCl 0,2g/L; Na₂HPO₃ 1,44g/L, KH₂PO₄ 0,24 g/L, pH 7,2) esterilizado.

As células das leveduras isoladas foram cultivadas em ágar Malte (DIFCO, USA) por 36 horas a 37 °C e ressuspensas em 2mL de PBS a 0,1M, pH 6,8 e 4°C. Foram lavadas duas vezes em 2mL de PBS sob centrifugação (2.500 rpm, cinco minutos cada) e, por fim, ressuspensas novamente em PBS a uma concentração de 2×10^7 célula.mL⁻¹, determinada em câmara de Neubauer.

As células epiteliais foram coletadas de um voluntário adulto saudável, através de suave escarificação da mucosa oral com Swabs esterilizados. As células foram suspensas e lavadas duas vezes em 5mL de PBS por centrifugação (2.500 rpm por cinco minutos cada). As células foram ressuspensas em PBS para uma concentração de 4×10^4 células.mL⁻¹, determinada em câmara de Neubauer.

Os ensaios de aderência foram realizados incubando a 25°C uma mistura de 1mL de cada suspensão em um tubo de ensaio, sob suave agitação por duas horas. Em seguida, realizou-se a coloração com azul de metileno, com posterior observação em microscópio óptico. Em cada lâmina foram observadas 100 células epiteliais com relação ao percentual de sua área superficial na qual as leveduras aderiram.

Os resultados foram expressos como: forte aderência, para adesão em 50% a 100% da área superficial, fraca aderência, para adesão em até 50%, ou sem aderência visível.

Análise de Dados

Para avaliar a associação da candidemia com as condições clínicas e com a capacidade de aderência dos isolados foram realizados o teste do qui-quadrado, teste Exato de Fisher e Análise Multivariada com Regressão Logística. Valor de “p” igual ou

menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Os teste foram realizados no programa GraphPad Prism 7 (San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

Entre Maio de 2015 e Abril de 2017 Foram obtidas amostras positivas de 74 pacientes para espécies do gênero *Candida* (33 em Pernambuco e 41 em João Pessoa). Informações clínicas de 80 pacientes com cultura negativa foram coletadas para caracterizar o grupo controle. Considerando o total de internações nas UTIs neste período, 2.623 no Hospital Agamenom Magalhães (PE) e 2.826 no HETSHL (PB), verificou-se uma incidência de 12,6 e 14,5 casos de candidemia a cada 1000 internações nas respectivas UTIs. A caracterização das variáveis estão apresentadas na Tabela 2.

A distribuição das espécies isoladas, confirmadas por PCR, está na Tabela 3. A espécie *C. albicans* foi a mais frequentemente isolada (41,89%). A média de dias de internação na UTI foi de 29,62 (desvio padrão: 20,47) para os pacientes com hemocultura positiva para *C. albicans*, 31,15 (desvio padrão: 26,26) para *C. tropicalis*, 25,1 (desvio padrão: 21,55) para o complexo *C. parapsilosis* e 28 (desvio padrão: 19,63) para o complexo *C. glabrata*. Não houve diferença estatística significativa ($p = 0,9096$). Foi verificado óbito em 33 pacientes (44,6%) e em 42 participantes do grupo controle (52,5%).

Quanto aos fatores de risco para o desenvolvimento de candidemia, foi possível observar diferença estatisticamente significativa em relação ao uso de imunossupressores ($p = 0,0008$), neutropenia ($p < 0,0001$), uso prévio de antibacteriano ($p < 0,0001$), tempo de permanência na UTI superior a 14 dias ($p = 0,001$), uso de cateter venoso central ($p < 0,0001$), nutrição parenteral ($p < 0,0001$) e ventilação mecânica ($p < 0,0001$).

A caracterização fenotípica da virulência dos isolados foi determinada pelo teste da capacidade de aderência *in vitro* das espécies isoladas. O maior percentual de isolados com forte capacidade de aderência foi verificado para *C. albicans*, enquanto todos os isolados do complexo *C. glabrata* foram caracterizados com fraca capacidade de aderência (Tabela 4).

Tabela 2: Caracterização das variáveis independentes entre os pacientes com hemocultura positiva para espécies de *Candida* e para o grupo controle

Variáveis	Pacientes	Controles	Valor p^*	Odds ratio (IC 95%)
Demográficas				
Média de idade (desvio padrão)	49,5 (17,57)	46,52 (17,34)	0,2952	
Sexo (%)			0,7829	
Masculino	40 (54,05)	50 (62,5)		
Feminino	34 (45,95)	30 (37,5)		
Status imunológico				
Uso de corticosteroides/imunossupressor (%)	34 (45,95)	16 (20)	0,0008	3,4 (1,6657-6,9402)
Neutropenia [Leucócitos <500 cél/mm ³] (%)	41 (55,41)	10 (12,5)	< 0,0001	8,7 (3,8856-19,4661)
Infecção pelo HIV (%)	4 (5,41)	1 (1,25)	0,1956	4,5 (0,4928- 41,3505)
Histórico de terapia medicamentosa				
Tratamento prévio com antibacteriano (%)	49 (66,22)	28 (35)	< 0,0001	3,6 (1,8707-7,0828)
Internamento na UTI				
Causa da internação (%)			0,5485	1,3 (0,6727-2,4608)
Doença crônica	47 (63,51)	46 (57,5)		
Cirúrgica	27 (36,49)	34 (42,5)		
Tempo de permanência na UTI > 14 dias (%)	53 (71,62)	36 (45)	0,001	3,1 (1,5778-6,0306)
Uso de cateter venoso central	65 (87,9)	45 (56,3)	< 0,0001	5,6 (2,4610-12,8215)
Uso de ventilação mecânica	65 (87,9)	46 (57,5)	< 0,0001	5,3 (2,3368-12,1945)
Nutrição parenteral	61 (82,43)	36 (45)	< 0,0001	5,7 (2,7272-12,0601)
Dependência de diálise	40 (54,05)	38 (47,5)	0,5169	1,3 (0,69-2,4506)

Tabela 3: Distribuição das espécies de 74 isolados de *Candida* em pacientes internados nas UTIs, média de dias de internamento e percentual de óbitos.

Espécies isoladas (n=74)	Isolados (%)	Média de dias na UTI (desvio padrão)	Óbitos (%)
<i>Candida albicans</i>	31 (41,89)	29,6151 (20,47)	12 (38,71)
<i>Candida tropicalis</i>	26 (35,14)	31,1538 (26,26)	14 (53,85)
<i>Candida parapsilosis</i>	11 (14,86)	25,1 (21,55)	4 (36,36)
<i>Candida glabrata</i>	6 (8,11)	28 (19,63)	3 (50%)

Tabela 4: Capacidade de aderência verificada através de ensaio *in vitro* das espécies isoladas.

Espécies isoladas (n=74)	Capacidade de Aderência <i>in vitro</i>	
	Forte (%)	Fraca (%)
<i>Candida albicans</i>	21 (67,7)	10 (32,3)
<i>Candida tropicalis</i>	9 (34,6)	17 (65,4)
<i>Candida parapsilosis</i>	3 (27,3)	8 (72,7)
<i>Candida glabrata</i>	0 (0)	6 (100)

DISCUSSÃO

Este é o primeiro trabalho que caracteriza a incidência de candidemia em pacientes de UTIs de um hospital público do estado da Paraíba. Em Pernambuco, três trabalhos foram publicados, dois foram relatos de casos em pacientes recém-nascidos, um com isolados de *C. pelliculosa* (DA SILVA et al., 2013) e outro de *C. haemulonii* (SILVA et al., 2015). A incidência de 3,9 casos para 1000 admissões foi evidenciada em um hospital privado de Pernambuco no período de Setembro de 2003 a Março de 2004 (HINRICHSSEN et al., 2008). Dos 21 isolados descritos, 15 eram de UTIs.

Evidenciou-se neste trabalho que *C. albicans* foi a espécie mais incidente (41,89%), apesar das espécies de *Candida* não-*Candida albicans*, em conjunto, serem responsáveis por 58,11% dos casos. No estudo realizado em Pernambuco (HINRICHSSEN et al., 2008), considerando apenas os isolados das UTIs, 80% eram de espécies de *Candida* não-*Candida albicans*. A distribuição geral das espécies depende da distribuição geográfica e características clínicas associadas aos pacientes. A mudança na epidemiologia das infecções por *Candida* em relação a espécies de

Candida não-*Candida albicans* é clinicamente relevante por causa das altas taxas de resistência ao fluconazol entre os isolados do complexo *C. glabrata* e a resistência intrínseca de *C. krusei* ao fluconazol (BREDA et al., 2017; LAMOTH et al., 2018).

Nos Estados Unidos da América (EUA), um estudo realizado em 56 hospitais, entre 1998 e 2006, verificou 1218 episódios de infecções na corrente sanguínea por *Candida* spp. A espécie *C. albicans* foi a mais prevalente, identificada em 611 casos (50,7%), seguido pelo complexo *C. parapsilosis* (17,4%), complexo *C. glabrata* (16,7%) e *C. tropicalis* (10,2%). A proporção de espécies de *Candida* não-*Candida albicans* aumentou significativamente ($p < 0,001$) (WISPLINGHOFF et al., 2014).

Em UTIs europeias e australianas o complexo *C. glabrata* é, geralmente, o isolado de *Candida* não-*Candida albicans* mais comum, sendo responsável por cerca de 20% das infecções. Apresenta-se menos virulenta que *C. albicans* e está associada ao aumento da idade e transplantes de órgãos sólidos. Isolados de *C. tropicalis* equiparam-se com os de *C. albicans* em termos de virulência e é comparativamente bem menos frequente (aproximadamente 9%) (EPELBAUM; CHASAN, 2017).

Na América do Sul *C. tropicalis* é o isolado de *Candida* não-*Candida albicans* mais comum (aproximadamente 20%), enquanto o complexo *C. glabrata* é isolada em cerca de 9% dos casos. Essas diferenças na distribuição das espécies podem ajudar a explicar as diferentes taxas de mortalidade associadas a candidemia relatadas na Europa (50%) e América do Sul (70%), por exemplo (EPELBAUM; CHASAN, 2017).

A relação entre *C. albicans* e espécies de *Candida* não-*Candida albicans* encontrada no presente trabalho está de acordo com a maioria das publicações, cujas evidências sugerem uma mudança nas últimas décadas em relação às proporções estimadas. Percebe-se uma diminuição na proporção de *C. albicans* e um aumento nos complexos *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, principalmente em trabalhos nos EUA e Europa. Os resultados apresentados aqui e de trabalhos realizados em outros estados do Brasil (Tabela 5), na Rússia (VASILYEVA et al., 2018), China (LI et al., 2015) e Índia (CHAKRABARTI et al., 2014) refletem, entretanto, uma proporção maior de *C. tropicalis* em relação aos complexos *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e outras espécies.

Tabela 5: Distribuição das espécies de *Candida* isoladas de pacientes internados em UTIs no Brasil.

Local	Período	Nº Casos	<i>Candida albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	Outras	Referências
Recife(PE)									
João Pessoa (PB)	2015-2017	74	41,89%	35,14%	8,11%	14,86%	-	-	Este trabalho
Campinas (SP)	2006-2010	53	43,4%	28,4%	7,5%	9,4%	3,8%	7,5%	(MORETTI et al., 2013)
São Paulo (SP)	2003-2012	647	44%	21,8%	9,9%	17,2%	2,5%	1,9%	(COLOMBO et al., 2014)
Londrina (PR)	2004-2011	108	28,7%	30,5%	8,3%	24,1%	1,8%	-	(DA COSTA et al., 2014)
Ribeirão Preto (SP)	2011-2012	18	36,8%	26,3%	15,7%	5,2%	5,2%	5,2%	(GASPAR et al., 2015)
Brasília (DF)	2011-2012	40	22,5%	2,5%	5%	70%	-	-	(PINHATI et al., 2016)
Campo Grande (MS)	2013-2014	221	35,3%	33,5%	15,8%	9,9%	3,2%	2,4%	(MATTOS et al., 2017)
Curitiba (PR)	2011-2016	149	45%	15,4%	14,1%	12,1%	6,7%	6,7%	(BREDA et al., 2017)

Em relação às variáveis independentes, os resultados encontrados em estudos no Brasil apresentam dados similares aos que foram relatados no presente trabalho. Um estudo realizado em 16 hospitais das cinco regiões do país entre 2007 e 2010 identificou 137 pacientes com candidemia, dos quais 88 estavam em UTIs. A maioria dos pacientes era do sexo masculino (51,8%) e a média de idade foi 56 anos. A condição de base mais frequente foi câncer (32,1%), seguida de doença gastrointestinal (18,9%). Entre os principais fatores de risco foi observado o uso de CVC (88,3%) e ventilação mecânica (49,6%). Entretanto, a mortalidade observada foi de 85% dos pacientes internados na UTI que desenvolveram candidemia ($p < 0,01$), enquanto no presente estudo foi de 44,6% ($p = 0,3384$) (DOI et al., 2016).

Um estudo retrospectivo realizado a partir de amostras de 14.414 pacientes internados em UTIs de 76 países verificou uma prevalência de candidemia de 6,9/1000 pacientes. Em relação ao sexo, 59% eram masculinos, com uma média de idade de 59 anos e estiveram internados por, em média, 14 dias na UTI. A condição de base mais comum foi câncer (24,6%), seguida de doença pulmonar obstrutiva crônica (13,1%). Em relação às intervenções clínicas, destacaram-se o uso de CVC (88,5%), ventilação mecânica (72,1%) e uso de cateter arterial (63,9%). A mortalidade foi observada em 42,6% destes pacientes (KETT et al., 2011).

A internação em UTIs é considerada um fator de risco isolado para o desenvolvimento de candidemia, devido a grande diversidade de procedimentos invasivos, existência de reservatórios ambientais e contaminação cruzada da assistência a que os pacientes são submetidos (YAPAR, 2014; MCCARTY; PAPPAS, 2016; LAMOTH et al., 2018)..

Os dados apontam o intestino como a fonte inicial de *Candida* spp endógena isolada em hemoculturas. Em estudos com modelos animais, evidenciou-se que a neutropenia com integridade intestinal preservada ou lesão intestinal sem neutropenia são condições insuficientes para o desenvolvimento de candidíase disseminada em um modelo murino. Em humanos, essa combinação de fatores se encontra na enterocolite neutropênica. (EPELBAUM; CHASAN, 2017). Menos frequentemente, a candidíase profunda pode ocorrer como resultado de pielonefrite ascendente e pode permanecer localizada ou levar à candidemia secundária (MCCARTY; PAPPAS, 2016; PAPPAS et al., 2018).

Outras situações que causam debilidade imunológica, como as advindas das condições clínicas dos pacientes com diabetes, insuficiência renal e outras doenças

crônicas, são apontados como importantes fatores de risco para candidemia em pacientes da UTI. A diferença pode estar na contribuição aditiva das intervenções, particularmente a introdução de dispositivos mecânicos, incluindo CVC, equipamentos para hemodiálise, tubos endotraqueais, e cateteres urinários. (MONTAGNA et al., 2014; LI et al., 2015; MERMUTLUOGLU et al., 2017; LAMOTH et al., 2018). Além destes fatores, os casos de candidemia na UTI, quando comparados com os casos de outros setores, são caracterizadas por uma pré-exposição mais frequente ao fluconazol com subsequente tratamento com equinocandina, baixa incidência do complexo *C. parapsilosis* e maiores taxas de mortalidade bruta (COLOMBO et al., 2014).

Em relação ao risco de óbito, alguns fatores independentes e associados à candidemia na UTI podem incluir pacientes diabéticos, uso de ventilação mecânica, imunossupressão, febre, idade, uso de cateter arterial, infecção por *C. kefyr*, pré-exposição à caspofungina e falta de terapia antifúngica no momento dos resultados da hemocultura (LAMOTH et al., 2018).

No presente estudo foi estimado um perfil de virulência dos isolados de *Candida* através de ensaio *in vitro* avaliando a capacidade de aderência em células epiteliais. Verificou-se que 44,6% dos isolados apresentaram perfil de forte capacidade de aderência *in vitro*. As proporções estratificadas por espécie (Tabela 3) foram similares ao de um outro estudo onde 60% dos isolados de *C. albicans* e em 25% do complexo *C. parapsilosis*, obtidos a partir da coleta de amostras em vários tecidos, apresentaram forte capacidade de aderência *in vitro* (LIMA-NETO et al., 2011). Um outro estudo, entretanto, considerando isolados apenas da corrente sanguínea, mostrou que o perfil forte de aderência *in vitro* de *C. albicans* esteve presente em 30% dos isolados (MANDELBLAT et al., 2017).

Entre as espécies de *Candida* não-*Candida albicans*, o perfil de forte capacidade de aderência foi mais frequente em *C. tropicalis*. Em um estudo realizado com pacientes acometidos por infecção na corrente sanguínea por *C. tropicalis*, foi demonstrado que o aumento da capacidade de aderência, avaliada *in vitro*, estava associado com maior potencial para formação de biofilme e, conseqüentemente, maior virulência (DA SILVA et al., 2017).

Como conclusão, este estudo evidenciou a distribuição das espécies de *Candida* isoladas a partir da corrente sanguínea de pacientes internados nas UTIs de hospitais públicos de Pernambuco e Paraíba. Os dados encontrados estão de acordo com outros trabalhos que mostram um aumento na incidência de espécies de *Candida* não-*Candida*

albicans. A avaliação dos fatores de risco confirmou que o status imunológico dos pacientes, uso prévio de antimicrobianos e submissão a processos invasivos estão associados significativamente com a infecção. Apesar de ser um fator de risco importante para o desenvolvimento da candidemia, a diferença na virulência das espécies isoladas, estimada pela capacidade de aderência *in vitro*, não foi estatisticamente significativa.

REFERÊNCIAS

BREDA, G. L. et al. Breakthrough candidemia after the introduction of broad spectrum antifungal agents: A 5-year retrospective study. **Medical Mycology**, n. January, p. 1–10, 2017. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mmy/advance-article/doi/10.1093/mmy/myx077/4372444>>.

CHAKRABARTI, A. et al. Incidence, characteristics and outcome of ICU-acquired candidemia in India. **Intensive Care Medicine**, v. 41, n. 2, p. 285–295, 2014.

COLOMBO, A. L. et al. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. **Intensive Care Medicine**, v. 40, n. 10, p. 1489–1498, 2014.

DA COSTA, V. G. et al. Nosocomial Bloodstream Candida Infections in a Tertiary-Care Hospital in South Brazil: A 4-Year Survey. **Mycopathologia**, v. 178, n. 3–4, p. 243–250, 2014.

DA SILVA, C. M. et al. Fungemia by Candida Pelliculosa (Pichia Anomala) in a Neonatal Intensive Care Unit: A Possible Clonal Origin. **Mycopathologia**, v. 175, n. 1–2, p. 175–179, fev. 2013.

DA SILVA, E. M. et al. Radiation used for head and neck cancer increases virulence in Candida tropicalis isolated from a cancer patient. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2017.

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. e0146909, 2016.

EPELBAUM, O.; CHASAN, R. Candidemia in the Intensive Care Unit. **Clinics in Chest Medicine**, v. 38, n. 3, p. 493–509, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccm.2017.04.010>>.

FREDRICKS, D. N.; SMITH, C.; MEIER, A. 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.

- GASPAR, G. G. et al. Evaluation of the predictive indices for candidemia in an adult intensive care unit. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 77–82, 2015.
- GOVENDER, N. P. et al. Emergence of azole-resistant *Candida parapsilosis* causing bloodstream infection: Results from laboratory-based sentinel surveillance in South Africa. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 7, p. 1994–2004, 2016.
- HINRICHSEN, S. L. et al. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 394–398, 2008.
- KEARNS, M. J.; DAVIES, P.; SMITH, H. Variability of the Adherence of *Candida albicans* Strains to Human Buccal Epithelial Cells: Inconsistency of Differences between Strains Related to Virulence. **Sabouraudia**, v. 21, n. 2, p. 93–8, jun. 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6348979>>.
- KETT, D. H. et al. *Candida* bloodstream infections in intensive care units: Analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. **Critical Care Medicine**, v. 39, n. 4, p. 665–670, 2011. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003246-201104000-00008>>.
- LAMOTH, F. et al. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. April, p. i4–i13, 2018.
- LI, C. et al. 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. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/54/23/54_54.3744/_article>.
- LI, Y. L. et al. Rapid Identification of Yeasts Commonly Found in Positive Blood Cultures by Amplification of the Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 22, n. 11, p. 693–696, 2003.
- LIMA-NETO, R. G. et al. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. **Mycoses**, v. 54, n. 1, p. 23–29, 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0507.2009.01757.x>><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19735440>>.
- LOCKHART, S. R. et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 2, p. 134–140, 2017.
- MANDELBLAT, M. et al. Phenotypic and genotypic characteristics of *Candida albicans* isolates from bloodstream and mucosal infections. **Mycoses**, v. 60, n. 8, p. 534–545, 2017.

- MATTOS, K. et al. Variability in the clinical distributions of *Candida* species and the emergence of azole-resistant Non-*Candida albicans* species in public hospitals in the midwest region of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 6, p. 843–847, 2017.
- MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P. G. Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 103–124, 2016. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1315399>>.
- MERMUTLUOGLU, C. et al. Antifungal Susceptibility and Risk Factors in Patients with Candidemia. **The Eurasian Journal of Medicine**, v. 48, n. 3, p. 199–203, 2017. Disponível em: <<http://www.eajm.org/sayilar/203/buyuk/199-2033.pdf>>.
- MISTRO, S. et al. Does lipid emulsion reduce amphotericin B nephrotoxicity? A systematic review and meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 12, p. 1774–1777, 2012.
- MONTAGNA, M. T. et al. Candidemia in Intensive Care Unit: A nationwide prospective observational survey (GISIA-3 study) and review of the European literature from 2000 through 2013. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 18, n. 5, p. 661–674, 2014.
- MORETTI, M. L. et al. Is the incidence of candidemia caused by *Candida glabrata* increasing in Brazil? Five-year surveillance of *Candida* bloodstream infection in a university reference hospital in southeast Brazil. **Medical Mycology**, v. 51, n. 3, p. 225–230, 2013.
- PAPPAS, P. G. et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. May, p. 1445–1456, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29749387>%0A<http://www.nature.com/articles/nrdp201826>>.
- PINHATI, H. M. S. et al. Outbreak of candidemia caused by fluconazole resistant *Candida parapsilosis* strains in an intensive care unit. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 4–9, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12879-016-1767-9>>.
- SILVA, C. M. et al. Neonatal Candidemia Caused by *Candida haemulonii*: Case Report and Review of Literature. **Mycopathologia**, v. 180, n. 1–2, p. 69–73, 2015.
- VASILYEVA, N. V. et al. Etiology of invasive candidosis agents in Russia: a multicenter epidemiological survey. **Frontiers of Medicine**, v. 12, n. 1, p. 84–91, 2018.
- WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial bloodstream infections due to *Candida* spp. in the USA: Species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 1, p. 78–81, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.09.005>>.
- YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, n. 1, p. 95–105, 2014.

6.2 Polimorfismo TLR1 R80T em pacientes com candidemia em unidades de terapia intensiva de hospitais públicos de Pernambuco e Paraíba nos anos 2015 a 2017.

INTRODUÇÃO

A infecção na corrente sanguínea por fungos do gênero *Candida* representa uma importante causa de complicações clínicas durante a permanência dos pacientes nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (LAMOTH et al., 2018). Entretanto, alguns pacientes não desenvolvem candidemia, mesmo com uma combinação de vários fatores de risco, tais como neutropenia, injúria em mucosas, transplante de tecidos sólidos ou de células tronco hematopoéticas, terapia imunossupressora, uso de antimicrobianos de largo espectro, permanência prolongada na UTI e uso de cateter venoso central (PLANTINGA et al., 2012).

É atribuído, entre as principais linhas de investigação, um papel importante às variações genéticas subjacentes, que, em combinação com os demais fatores de risco, possivelmente regulam a susceptibilidade do paciente. Assim, destacam-se os polimorfismos nos genes da superfamília *Toll Like Receptors* (TLR1 a TLR10), que codificam receptores para reconhecimento dos patógenos presentes em monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (KULLBERG; ARENDRUP, 2015).

A associação entre receptores TLR1, TLR2 ou TLR4 com os padrões moleculares de *Candida* spp. é bem caracterizada e induz a ativação da resposta imune inata, levando a síntese e liberação de citocinas, quimiocinas próinflamatórias e ativação do inflamossomo NLRP3, que converte as interleucinas IL-1 β e IL-18 para as formas ativas. Então, ocorre a subsequente ativação da inflamação e da resposta imune adaptativa e concomitantemente, ocorrem fagocitose e morte do fungo, predominantemente por neutrófilos (DAVIDSON; NETEA; KULLBERG, 2018).

Em um estudo prospectivo conduzido nos Estados Unidos com pacientes norte-americanos e holandeses, três polimorfismos SNP no gene *TLR1* foram associados com suscetibilidade à candidemia entre os indivíduos caucasianos. O SNP rs5743611, que resulta na troca do aminoácido arginina por treonina no códon 80 do gene (R80T), foi o que apresentou maior *Odds ratio* = 1,82 (intervalo de confiança de 95% variando entre 1,12 e 2,98) com $p = 0,02$ (PLANTINGA et al., 2012).

A modificação na proteína resultante do alelo variante deste polimorfismo promove uma alteração na porção central extracelular do TLR1, levando a sensibilidade diminuída deste receptor pelos componentes da parede celular microbiana, em modelos *in vitro*. Além da candidemia, ele foi associado com retocolite ulcerativa (*Odds ratio* = 2,84; $p = 0,045$) e susceptibilidade aumentada para aspergilose invasiva em pacientes submetidos a transplante de células tronco hematopoéticas (*Odds ratio* = 1,3; $p < 0,01$) (KESH et al., 2005; PIERIK et al., 2006).

No Brasil há poucos estudos sobre a susceptibilidade genética à candidemia e diagnóstico desta predisposição, a qual certamente ajudaria a determinar quais pacientes poderiam se beneficiar de tratamento antifúngico profilático ou imunoterapia adjuvante. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a possível associação entre o polimorfismo rs5743611 e o aumento na susceptibilidade à candidemia em pacientes nas UTIs de hospitais públicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho e População Alvo

Trata-se de um estudo observacional, transversal, do tipo caso-controle. Os participantes desta pesquisa foram pacientes internados nas UTIs de hospitais públicos de Pernambuco e Paraíba, estados do Nordeste do Brasil, entre os anos 2015 e 2017. O grupo de casos foi composto por pacientes internados em UTIs, maiores de 18 anos e que possuíam solicitação médica para diagnóstico microbiológico, através de hemocultura, com resultado positivo para levedura. O grupo controle foi composto por pacientes adultos hospitalizados em UTIs sem histórico ou evidência de candidemia ou qualquer infecção fúngica invasiva ou que apresentaram resultado negativo para levedura após hemocultura.

Métodos de Coleta e Análise das Amostras

Até três amostras de sangue venoso foram coletadas assepticamente em dias consecutivos de cada participante da pesquisa por punção venosa em tubos Vacutainer® com EDTA por profissionais capacitados e, posteriormente, acondicionadas em tubos contendo meio *Brain Heart Infusion* (BHI, KASVI, Brasil) para diagnóstico laboratorial.

As hemoculturas foram testadas utilizando o sistema de cultura automatizado Bactec 9120/Phoenix™ BD-Becton Dickinson's (Sistemas de diagnóstico BD, Franklin Lakes, NJ, EUA).

As informações sobre as variáveis relacionadas aos participantes foram coletadas através de consultas aos prontuários. A realização deste trabalho foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco sob o registro CAAE 40428414.0.0000.5208.

Análise molecular por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA das leveduras isoladas foi extraído de acordo com metodologia proposta previamente (FREDRICKS; SMITH; MEIER, 2005). Cada massa celular obtida foi transferida para tubos de extração rosqueados contendo pérolas de vidro. Foram pipetados 700 µL de tampão hexadecil trimetil amônio brometo-CTAB, pré-aquecido a 60°C por 30 segundos, nos tubos de extração contendo pérolas de vidro e a massa celular, sendo, então, agitados no FastPrep por 1 minuto a 5,5 m/s, seguido por incubação em banho-maria por 1 hora a 65°C.

Foi realizada centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos e cada sobrenadante foi transferido para tubos de 2,0 mL aos quais foi adicionada solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Foi, então, realizada outra centrifugação, nas mesmas condições anteriores. Cada sobrenadante foi recuperado e transferido para outro tubo, no qual se adicionou o mesmo volume de isopropanol. As amostras foram mantidas a -20°C por 30 minutos e, em seguida, realizou-se centrifugação nas mesmas condições. Após esta etapa, observou-se a formação do precipitado.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi submetido a três lavagens sucessivas com etanol 70%. Os tubos foram mantidos em posição horizontal à 37°C para completa evaporação espontânea do etanol. Posteriormente, foram adicionados 55µL de água ultra-pura ao DNA, mantido em geladeira para ressuspensão. O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria de luz ultravioleta a 260-280 nm (Nanodrop 1000 Spectrophotometer) e as concentrações foram ajustadas para 200ng/µL.

A identificação espécie-específica pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada a partir de protocolo previamente descrito (LI et al., 2003). O volume final por reação foi de 25µL, constituído por 20 ng de DNA, Taq Buffer 10x, dNTPs 10 mM,

0,8µL de cada primer (20pmol/µL) e Taq DNA polimerase 1,25 U. As condições para as amplificações realizadas em termociclador (THERM-1000, MAXYGENE, New York, USA) foram, desnaturação inicial a 92°C por dois minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por um minuto, anelamento a 50°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto. Após os 35 ciclos seguiu-se a extensão final a 72°C por 10 minutos. Os primers utilizados neste trabalho estão na Tabela 1.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) durante 40 min a 3V/cm. O gel foi corado com *GelRed*TM e analisados sob luz ultravioleta, utilizando com referência os pesos moleculares previamente descritos (LI et al., 2003).

Tabela 1: Primers utilizados e tamanho dos produtos amplificados (amplicons).

Identificação	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho dos amplicons
<i>Candida albicans</i>	5'-TCAACTTGTCACAGATTATT-3'	402pb
<i>C. glabrata</i>	5'-CACGACTCGACACTTTCTAATT-3'	632pb
<i>C. tropicalis</i>	5'-AAGAATTTAACGTGGAACTTA-3'	149pb
<i>C. parapsilosis</i>	5'-GGCGGAGTATAAACTAATGGATAG-3'	126pb
ITS4*	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	-

* O ITS4 foi o *primer reverse*, enquanto os demais foram os *primers forwards* para cada amplicon gerado

Para investigação do polimorfismo rs5743611 foram extraídas amostras de DNA a partir do sangue dos participantes utilizando metodologia previamente padronizada (GREEN; SAMBROOK, 2012). O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria de luz ultravioleta a 260-280 nm (Nanodrop 1000 Spectrophotometer) e as concentrações foram ajustadas para 200ng/µL.

A amplificação por PCR seguiu um protocolo previamente descrito (KIM et al., 2012). O volume final por reação foi de 25µL, constituído por 20 ng de DNA, Taq Buffer 10x, dNTPs 10 mM, *primers* 10pmol/µL (Forward 5'-AGGGTGGCAAGAAATCTTCA-3'; Reverse 5'-TCTGAGCTTTGGACTTCTGACA-3') e Taq DNA polimerase 1,5 U. As condições para as amplificações realizadas em termociclador (THERM-1000, MAXYGENE, New York, USA) foram, desnaturação inicial a 92°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos

de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 53°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Após os 35 ciclos seguiu-se a extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos da amplificação (165pb) foram evidenciados por eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) durante 20 min a 3V/cm. Após a confirmação, os produtos de PCR foram submetidos a digestão enzimática por 16 horas (*overnight*) a 37°C com a enzima de restrição *Hinf*I. Os fragmentos obtidos (Alelo G = 165pb, Alelo C = 94pb + 71pb) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 3% por 40 minutos. Em ambos os casos os géis foram corados com *GelRed*TM e analisados sob luz ultravioleta.

Análise de Dados

O equilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo rs5743611 foi verificado pelo teste do qui-quadrado (χ^2) separadamente no grupo controle e dos pacientes com candidemia, utilizando o programa estatístico PLINK 1.9. Os testes de associação e de análise das variáveis demográficas e clínicas foram realizados no programa SAS 9.2 (SAS Corporation). Utilizou-se um modelo dominante de regressão logística (considerando o homozigoto para o alelo de menor frequência e o heterozigoto como genótipos em risco).

Em todos os casos foi estabelecido intervalo de confiança de 95% e o valor de “*p*” igual ou menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Foram obtidas 74 amostras para espécies do gênero *Candida*, como agentes de candidemia. Informações clínicas de 80 pacientes com cultura não obtida foram coletadas para caracterizar o grupo controle. A média de idade foi 49,5 anos no grupo de pacientes com candidemia (desvio padrão = +/- 17,57) e de 46,5 no grupo controle (desvio padrão = +/- 17,34). Houve um percentual maior de homens tanto no grupo de pacientes com candidemia (54,05%) quanto no grupo controle (62,5%).

Em relação às espécies isoladas, *C. albicans* foi evidenciada em 31 amostras (41,89%), *C. tropicalis* em 26 (35,14%), *C. parapsilosis* em 11 (14,86%) e *C. glabrata* em seis (8,11%).

A distribuição dos genótipos em relação ao polimorfismo rs5743611 no grupo de pacientes com candidemia e no grupo controle está apresentada na Tabela 2. As frequências alélicas encontradas no grupo de pacientes com candidemia foi $p(G) = 0,8378$ e $q(C) = 0,1622$. No grupo controle a frequência foi de $p = 0,7375$ e $q = 0,2625$. Ambos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Grupo de pacientes com candidemia: $\chi^2 = 6,83$, $p < 0,01$; Grupo controle: $\chi^2 = 30,02$, $p < 0,001$). Assumindo um modelo dominante para o cálculo de regressão logística verificou-se que a distribuição do polimorfismo investigado não apresentou diferença estatisticamente significativa no grupo de pacientes com candidemia em relação ao grupo controle ($p = 0,3594$, *Odds ratio* = 0,6781 com IC95% = 0,3375 - 1,3624).

Tabela 2: Distribuição dos genótipos para o polimorfismo rs5743611 no grupo de pacientes com candidemia e no grupo controle.

GRUPOS	GENÓTIPOS			<i>p value</i>	<i>Odds ratio</i> (IC95%)
	GG	GC	CC		
Pacientes com candidemia (%)	55 (74,32)	14 (18,92)	5 (6,76)	0,3594	0,6781 (0,3375 - 1,3624)
Grupo controle (%)	53 (66,25)	12 (15)	15 (18,75)		
Frequências alélicas no grupo de pacientes	G = 0,8378			C= 0,1622	
Frequências alélicas no grupo controle	G = 0,7375			C = 0,2625	

DISCUSSÃO

Evidenciou-se neste trabalho que *C. albicans* foi a espécie mais incidente (41,89%), apesar das espécies de *Candida* não-*Candida albicans*, em conjunto, serem responsáveis por 58,11% dos casos. É considerado que a distribuição geral das espécies depende da distribuição geográfica e características clínicas associadas aos pacientes. A mudança na epidemiologia das infecções por *Candida* em relação a espécies de *Candida* não-*Candida albicans* é clinicamente relevante por causa das altas taxas de

resistência ao fluconazol entre os isolados de *C. glabrata* e a resistência intrínseca de *C. krusei* ao fluconazol (BREDA et al., 2017; LAMOTH et al., 2018).

A relação entre *C. albicans* e espécies de *Candida* não-*Candida albicans* encontrada no presente trabalho também foram verificadas em outros estudos, cujos dados mostram uma mudança nas últimas décadas em relação às proporções estimadas. Por exemplo, percebe-se uma diminuição na proporção de *C. albicans* e um aumento em *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, principalmente nos EUA e Europa. Os resultados apresentados aqui e de trabalhos realizados em outros estados do Brasil, na Rússia (VASILYEVA et al., 2018), China (LI et al., 2015) e Índia (CHAKRABARTI et al., 2014) refletem, entretanto, uma proporção maior de *C. tropicalis* em relação a *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e outras espécies.

Não foi possível evidenciar neste estudo o aumento na susceptibilidade à candidemia em relação ao polimorfismo rs5743611. É possível que na população estudada o efeito desta alteração tenha um impacto menor em relação ao papel de outros receptores TLRs, uma vez que TLR1 forma um heterodímero funcional com TLR2 (TAKEUCHI et al., 2002; GIL et al., 2016). Essa associação promove a ativação da fagocitose e produção de citocinas inflamatórias, tais como IL-8, IL-6 e IL-1 β (NOREEN; ARSHAD, 2015). Um estudo com camundongos mostrou que a deficiência de TLR1 e TLR2 interfere na homeostase epitelial, aumenta a reação inflamatória intestinal e o crescimento das colônias de *C. albicans* em um modelo de colite aguda induzida (CHOTEAU et al., 2017).

A contribuição de TLR2 na função do TLR1 pode estar associada a distribuição das variantes polimórficas em populações distintas, o que pode resultar em diferenças significativas (BARREIRO et al., 2009). Por exemplo, não foi verificada associação da candidemia com SNPs dos genes *TLR2*, *TLR4*, *TLR6* e *TLR9* em um estudo com indivíduos caucasianos e afro-americanos nos EUA. Entretanto, foi demonstrada associação com os polimorfismos rs4833095 (S248N), rs5743618 (I602S) e rs5743611 (R80T) do *TLR1* apenas nos pacientes caucasianos (PLANTINGA et al., 2012).

No Brasil, um trabalho verificou a influência da miscigenação na distribuição de 24 polimorfismos em genes *TLRs* em 195 indivíduos do sudeste do país (GUIMARÃES et al., 2018). Os autores demonstraram uma ancestralidade principalmente europeia (63%) seguida da africana (22%). Além disso, o alelo variante de rs5743611 ocorre em haplótipos com outras variantes de SNPs em elevada frequência na Europa, com

moderada frequência no Oriente Médio, e com baixa frequência nas demais populações (HEFFELFINGER et al., 2014)

Evidenciou-se que a composição genética herdada de africanos durante a miscigenação das populações analisadas neste estudo pode ter contribuído de forma significativa para distribuição relativamente baixa do alelo variante do SNP rs5476311, associado a susceptibilidade à candidemia em estudos com caucasianos. Além disso, polimorfismos em outros genes, como *TLR2*, podem influenciar no papel do *TLR1* nesta infecção. Estudos futuros com maior número de amostras e outros polimorfismos no Brasil podem contribuir para elucidar o papel destes receptores na susceptibilidade a candidemia.

REFERÊNCIAS

- BARREIRO, L. B. et al. Evolutionary dynamics of human toll-like receptors and their different contributions to host defense. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 7, 2009.
- BREDA, G. L. et al. Breakthrough candidemia after the introduction of broad spectrum antifungal agents: A 5-year retrospective study. **Medical Mycology**, n. January, p. 1–10, 2017. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mmy/advance-article/doi/10.1093/mmy/myx077/4372444>>.
- CHAKRABARTI, A. et al. Incidence, characteristics and outcome of ICU-acquired candidemia in India. **Intensive Care Medicine**, v. 41, n. 2, p. 285–295, 2014.
- CHOTEAU, L. et al. Role of TLR1, TLR2 and TLR6 in the modulation of intestinal inflammation and *Candida albicans* elimination. **Gut Pathogens**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2017.
- DAVIDSON, L.; NETEA, M. G.; KULLBERG, B. J. Patient Susceptibility to Candidiasis—A Potential for Adjunctive Immunotherapy. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 1, p. 9, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2309-608X/4/1/9>>.
- FREDRICKS, D. N.; SMITH, C.; MEIER, A. 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.
- GIL, M. L. et al. Role of Toll-like receptors in systemic *Candida albicans* infections Burjassot , Spain , 3 Board of Governors Regenerative Medicine Institute and Research Division of. p. 278–302, 2016.
- GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning a Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
- GUIMARÃES, L. O. et al. Genetic ancestry effects on the distribution of toll-like receptors (TLRs) gene polymorphisms in a population of the Atlantic Forest, São Paulo,

- Brazil. **Human immunology**, v. 79, n. 2, p. 101–108, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2017.11.007>>.
- HEFFELFINGER, C. et al. Haplotype structure and positive selection at TLR1. **European Journal of Human Genetics**, v. 22, n. 4, p. 551–557, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2013.194>>.
- KESH, S. et al. TLR1 and TLR6 polymorphisms are associated with susceptibility to invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1062, p. 95–103, 2005.
- LAMOTH, F. et al. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. April, p. i4–i13, 2018.
- LI, C. et al. 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. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/54/23/54_54.3744/_article>.
- LI, Y. L. et al. Rapid Identification of Yeasts Commonly Found in Positive Blood Cultures by Amplification of the Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 22, n. 11, p. 693–696, 2003.
- MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P. G. Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 103–124, 2016. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1315399>>.
- NOREEN, M.; ARSHAD, M. Association of TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, and TIRAP polymorphisms with disease susceptibility. **Immunologic Research**, v. 62, n. 2, p. 234–252, 2015.
- PAPPAS, P. G. et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. May, p. 1445–1456, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29749387>> <<http://www.nature.com/articles/nrdp201826>>.
- PIERIK, M. et al. Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 12, n. 1, p. 1–8, 2006.
- PLANTINGA, T. S. et al. Toll-like receptor 1 polymorphisms increase susceptibility to candidemia. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 6, p. 934–943, 2012.
- TAKEUCHI, O. et al. Cutting Edge: Role of Toll-Like Receptor 1 in Mediating Immune Response to Microbial Lipoproteins. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 1, p. 10–14, 2002. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.169.1.10>>.
- VASILYEVA, N. V. et al. Etiology of invasive candidosis agents in Russia: a multicenter epidemiological survey. **Frontiers of Medicine**, v. 12, n. 1, p. 84–91, 2018.

7 CONCLUSÕES DA TESE

- Verificou-se uma incidência de 12,6 e 14,5 casos de candidemia a cada 1000 internações nas UTIs de Pernambuco e Paraíba, respectivamente;
- Os dados encontrados mostram uma incidência de espécies de *Candida* não-*Candida albicans* de 58,11%;
- A avaliação dos fatores de risco confirmou que o status imunológico dos pacientes, uso prévio de antimicrobianos e submissão a processos invasivos estão associados significativamente com a infecção;
- A maior proporção de isolados com forte capacidade de aderência *in vitro* foi de *Candida albicans* (67,7%), seguida de *C. tropicalis* (34,6%) e *C. parapsilosis* (27,3%). O perfil com fraca capacidade foi verificado em todos os isolados de *C. glabrata*;
- Apesar de ser um fator de risco importante para o desenvolvimento da candidemia, a diferença na virulência das espécies isoladas, estimada pela capacidade de aderência *in vitro*, não foi estatisticamente significativa;
- Foram determinadas as frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo rs5746311 em populações do Nordeste do Brasil;
- A diferença na distribuição do polimorfismo rs5743611 entre pacientes com candidemia e grupo controle não foi estatisticamente significativa.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Pacientes internados em UTIs devem ser monitorados quanto aos fatores de risco para o desenvolvimento de candidemia, principalmente o status imunológico, uso prévio de antimicrobianos e submissão a processos invasivos;
- A distribuição epidemiológica e caracterização fenotípica da virulência das espécies de *Candida* podem contribuir para uma melhor compreensão da evolução clínica dos pacientes internados nas UTIs;
- Estudos posteriores com um número maior de indivíduos pode contribuir no papel de polimorfismos genéticos associados a susceptibilidade do hospedeiro à candidemia.

REFERÊNCIAS

- ARCHIMEDES, D. et al. Revisiting Species Distribution and Antifungal Susceptibility of *Candida* Bloodstream Isolates from Latin American Medical Centers. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, p. 24, 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2309-608X/3/2/24>>.
- BARREIRO, L. B. et al. Evolutionary dynamics of human toll-like receptors and their different contributions to host defense. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 7, 2009.
- BREDA, G. L. et al. Breakthrough candidemia after the introduction of broad spectrum antifungal agents: A 5-year retrospective study. **Medical Mycology**, n. January, p. 1–10, 2017. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mmy/advance-article/doi/10.1093/mmy/myx077/4372444>>.
- CASSONE, A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: Pathogenesis, immunity and vaccine prospects. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 122, n. 6, p. 785–794, 2015.
- CHAKRABARTI, A. et al. Incidence, characteristics and outcome of ICU-acquired candidemia in India. **Intensive Care Medicine**, v. 41, n. 2, p. 285–295, 2014.
- CHOTEAU, L. et al. Role of TLR1, TLR2 and TLR6 in the modulation of intestinal inflammation and *Candida albicans* elimination. **Gut Pathogens**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2017.
- COLOMBO, A. L. et al. 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2013.02.001>>.
- COLOMBO, A. L. et al. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. **Intensive Care Medicine**, v. 40, n. 10, p. 1489–1498, 2014.
- DA COSTA, V. G. et al. Nosocomial Bloodstream *Candida* Infections in a Tertiary-Care Hospital in South Brazil: A 4-Year Survey. **Mycopathologia**, v. 178, n. 3–4, p. 243–250, 2014.
- DA SILVA, C. M. et al. Fungemia by *Candida Pelliculosa* (*Pichia Anomala*) in a Neonatal Intensive Care Unit: A Possible Clonal Origin. **Mycopathologia**, v. 175, n. 1–2, p. 175–179, fev. 2013.
- DA SILVA, E. M. et al. Radiation used for head and neck cancer increases virulence in *Candida tropicalis* isolated from a cancer patient. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2017.

DAVIDSON, L.; NETEA, M. G.; KULLBERG, B. J. Patient Susceptibility to Candidiasis—A Potential for Adjunctive Immunotherapy. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 1, p. 9, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2309-608X/4/1/9>>.

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. e0146909, 2016.

EPELBAUM, O.; CHASAN, R. Candidemia in the Intensive Care Unit. **Clinics in Chest Medicine**, v. 38, n. 3, p. 493–509, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccm.2017.04.010>>.

FRAZÃO, J. B.; ERRANTE, P. R.; CONDINO-NETO, A. Toll-like receptors' pathway disturbances are associated with increased susceptibility to infections in humans. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 61, n. 6, p. 427–443, 2013.

FREDRICKS, D. N.; SMITH, C.; MEIER, A. 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.

GASPAR, G. G. et al. Evaluation of the predictive indices for candidemia in an adult intensive care unit. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 77–82, 2015.

GIL, M. L. et al. Role of Toll-like receptors in systemic *Candida albicans* infections Burjassot , Spain , 3 Board of Governors Regenerative Medicine Institute and Research Division of. p. 278–302, 2016.

GOVENDER, N. P. et al. Emergence of azole-resistant *Candida parapsilosis* causing bloodstream infection: Results from laboratory-based sentinel surveillance in South Africa. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 7, p. 1994–2004, 2016.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning a Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

GUIMARÃES, L. O. et al. Genetic ancestry effects on the distribution of toll-like receptors (TLRs) gene polymorphisms in a population of the Atlantic Forest, São Paulo, Brazil. **Human immunology**, v. 79, n. 2, p. 101–108, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2017.11.007>>.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 6, p. 5–10, 2014.

HEFFELFINGER, C. et al. Haplotype structure and positive selection at TLR1. **European Journal of Human Genetics**, v. 22, n. 4, p. 551–557, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2013.194>>.

HINRICHSEN, S. L. et al. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 394–398, 2008.

HÖFS, S.; MOGAVERO, S.; HUBE, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 149–169, 2016.

KEARNS, M. J.; DAVIES, P.; SMITH, H. Variability of the Adherence of *Candida albicans* Strains to Human Buccal Epithelial Cells: Inconsistency of Differences between Strains Related to Virulence. **Sabouraudia**, v. 21, n. 2, p. 93–8, jun. 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6348979>>.

KESH, S. et al. TLR1 and TLR6 polymorphisms are associated with susceptibility to invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1062, p. 95–103, 2005.

KETT, D. H. et al. Candida bloodstream infections in intensive care units: Analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. **Critical Care Medicine**, v. 39, n. 4, p. 665–670, 2011. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003246-201104000-00008>>.

KIM, E. J. et al. Association between toll-like receptors/cd14 gene polymorphisms and inflammatory bowel disease in Korean population. **Journal of Korean Medical Science**, v. 27, n. 1, p. 72–77, 2012.

LAMOTH, F. et al. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. April, p. i4–i13, 2018.

LEÓN, C. et al. A bedside scoring system (“Candida score”) for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with Candida colonization. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 3, p. 730–737, 2006.

LEÓN, C. et al. Usefulness of the “candida score” for discriminating between Candida colonization and invasive candidiasis in non-neutropenic critically ill patients: A prospective multicenter study. **Critical Care Medicine**, v. 37, n. 5, p. 1624–1633, 2009.

LEROY, G. et al. Evaluation of “Candida score” in critically ill patients: a prospective, multicenter, observational, cohort study. **Annals of Intensive Care**, v. 1, n. 1, p. 50, 2011. Disponível em: <<http://annalsofintensivecare.springeropen.com/articles/10.1186/2110-5820-1-50>>.

LI, C. et al. 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. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/54/23/54_54.3744/_article>.

LI, Y. L. et al. Rapid Identification of Yeasts Commonly Found in Positive Blood Cultures by Amplification of the Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 22, n. 11, p. 693–696, 2003.

LIMA-NETO, R. G. et al. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. **Mycoses**, v. 54, n. 1, p. 23–29, 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0507.2009.01757.x>><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19735440>>.

LOCKHART, S. R. et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant candida auris on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 2, p. 134–140, 2017.

MANDELBLAT, M. et al. Phenotypic and genotypic characteristics of *Candida albicans* isolates from bloodstream and mucosal infections. **Mycoses**, v. 60, n. 8, p. 534–545, 2017.

MATTOS, K. et al. Variability in the clinical distributions of *Candida* species and the emergence of azole-resistant Non-*Candida albicans* species in public hospitals in the midwest region of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 6, p. 843–847, 2017.

MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P. G. Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 103–124, 2016. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1315399>>.

MERMUTLUOGLU, C. et al. Antifungal Susceptibility and Risk Factors in Patients with Candidemia. **The Eurasian Journal of Medicine**, v. 48, n. 3, p. 199–203, 2017. Disponível em: <<http://www.eajm.org/sayilar/203/buyuk/199-2033.pdf>>.

MISTRO, S. et al. Does lipid emulsion reduce amphotericin B nephrotoxicity? A systematic review and meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 12, p. 1774–1777, 2012.

MONTAGNA, M. T. et al. Candidemia in Intensive Care Unit: A nationwide prospective observational survey (GISIA-3 study) and review of the European literature from 2000 through 2013. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 18, n. 5, p. 661–674, 2014.

MORETTI, M. L. et al. Is the incidence of candidemia caused by *Candida glabrata* increasing in Brazil? Five-year surveillance of *Candida* bloodstream infection in a university reference hospital in southeast Brazil. **Medical Mycology**, v. 51, n. 3, p. 225–230, 2013.

NETEA, M. G. et al. Immune defence against *Candida* fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 10, p. 630–642, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri3897>>.

NG, K. et al. Incidence and mortality of sepsis, severe sepsis, and septic shock in intensive care unit patients with candidemia. **Infectious Diseases**, v. 47, n. 8, p. 584–587, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3109/23744235.2015.1028100>>.

NOREEN, M.; ARSHAD, M. Association of TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, and TIRAP polymorphisms with disease susceptibility. **Immunologic Research**, v. 62, n. 2, p. 234–252, 2015.

OBATA, M. Compositional Continuity and Discontinuity in the Horoman Peridotite, Japan, and its Implication for Melt Extraction Processes in Partially Molten Upper Mantle. **Journal of Petrology**, v. 45, n. 2, p. 223–234, 2004. Disponível em: <<https://academic.oup.com/petrology/article-lookup/doi/10.1093/petrology/egg106>>.

PAPPAS, P. G. et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. May, p. 1445–1456, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29749387>>0Ahttp://www.nature.com/articles/nrdp201826>.

PIERIK, M. et al. Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 12, n. 1, p. 1–8, 2006.

PINHATI, H. M. S. et al. Outbreak of candidemia caused by fluconazole resistant *Candida parapsilosis* strains in an intensive care unit. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 4–9, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12879-016-1767-9>>.

PLANTINGA, T. S. et al. Toll-like receptor 1 polymorphisms increase susceptibility to candidemia. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 6, p. 934–943, 2012.

PLAYFORD, E. G. et al. Problematic dichotomization of risk for Intensive Care Unit (ICU)-acquired invasive candidiasis: Results using a risk-predictive model to categorize 3 levels of risk from a multicenter prospective cohort of Australian ICU patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 11, p. 1463–1469, 2016.

QIN, Y. et al. Innate immune cell response upon *Candida albicans* infection. **Virulence**, v. 7, n. 5, p. 512–526, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2016.1138201>>.

RICHARDSON, J. P.; MOYES, D. L. Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection. **Virulence**, v. 6, n. 4, p. 327–337, 2015.

SILVA, C. M. et al. Neonatal Candidemia Caused by *Candida haemulonii*: Case Report and Review of Literature. **Mycopathologia**, v. 180, n. 1–2, p. 69–73, 2015.

TAGHAVI, M. et al. Role of pathogen-associated molecular patterns (PAMPS) in immune responses to fungal infections. **European Journal of Pharmacology**, v. 808, n. October, p. 8–13, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.11.013>>.

TAKEUCHI, O. et al. Cutting Edge: Role of Toll-Like Receptor 1 in Mediating Immune Response to Microbial Lipoproteins. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 1, p. 10–14, 2002. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.169.1.10>>.

TREVIJANO-CONTADOR, N.; RUEDA, C.; ZARAGOZA, O. Fungal morphogenetic changes inside the mammalian host. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 57, p. 100–109, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.04.008>>.

VAN DER GRAAF, C. A. A. et al. Toll-like receptor 4 Asp299Gly/Thr399Ile polymorphisms are a risk factor for Candida bloodstream infection. **European Cytokine Network**, v. 17, n. 1, p. 29–34, 2006. Disponível em: <http://www.jle.com/fr/revues/ecn/e-docs/toll_like_receptor_4_asp299gly_thr399ile_polymorphisms_are_a_risk_factor_for_candida_bloodstream_infection_268300/article.phtml>.

VASILYEVA, N. V. et al. Etiology of invasive candidosis agents in Russia: a multicenter epidemiological survey. **Frontiers of Medicine**, v. 12, n. 1, p. 84–91, 2018.

WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial bloodstream infections due to Candida spp. in the USA: Species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 1, p. 78–81, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.09.005>>.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, n. 1, p. 95–105, 2014.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Convidamos o(a) Sr.(a) para participar, como voluntário(a), da pesquisa CANDIDEMIA EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA (UTI): ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO MULTICÊNTRICO ASSOCIADO AO PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Rejane Pereira Neves com endereço Rua Prof. Nelson Chaves, S/N – Cidade Universitária, UFPE, Recife-PE, Telefone para contato: 81-2126-8481, e-mail: rejadel@yahoo.com.br. Também participam desta pesquisa: Msc Rodrigo Niskier Ferreira Barbosa, telefone 81-97333883 e-mail: rodrigniskier@yahoo.com.br e Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, Telefone: 81-2126-8481, e-mail: gonalves_reginaldo@hotmail.com.

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 esteja bem esclarecido (a) sobre sua participação na pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar 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 penalizado (a) de forma alguma. O (a) Senhor (a) tem o direito de desistir da participação na pesquisa em qualquer tempo, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Esta pesquisa tem como objetivo verificar a ocorrência de infecção no sangue por um fungo chamado genericamente de Candida, em pacientes internados nas UTIs de hospitais públicos de João Pessoa (PB) e Recife (PE) e determinar se estes fungos apresentam características que aumentam o risco de infecção. Vamos pesquisar também se os participantes estão sob risco genético e hospitalar para o desenvolvimento desta infecção.

Trabalharemos com dois grupos de participantes maiores de 18 anos. Um dos grupos (controle) será formado por no mínimo 100 pacientes hospitalizados nas UTIs de hospitais públicos terciários de Recife (PE) e João Pessoa (PB) sem histórico ou evidência de infecção fúngica invasiva, que não estejam em terapia ou profilaxia com antibióticos e com resultado negativo para o exame de cultura microbiológica a partir do sangue (solicitado pelo medico). O grupo “casos” será formado por pacientes internados em UTIs de hospitais públicos terciários de Recife (PE) e João Pessoa (PB) com sinais e sintomas sugestivos de infecção fúngica e com resultado positivo para o exame de cultura, após indicação médica. A pesquisa iniciará em Novembro de 2014 e terminará em Fevereiro de 2018, e cada participante só precisará fornecer amostra em um único momento da pesquisa, ou a pedido do médico que o acompanha.

Caso você aceite a participação nesta pesquisa, vamos precisar que você (ou o paciente sob sua responsabilidade) forneça três amostras de sangue, cada uma com

5mL (aproximadamente o equivalente a uma colher de sopa) que serão coletadas na veia do braço por um profissional experiente e cuidadoso. Cada coleta será realizada em dias diferentes e consecutivos. Esta coleta será feita apenas por requisição médica, ou seja, independente da execução deste projeto.

As amostras de sangue serão armazenadas no laboratório do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob a minha responsabilidade. Nós vamos, então, realizar o diagnóstico laboratorial para pesquisar a presença do fungo no sangue. Além disso, vamos analisar também o DNA da amostra de sangue de todos os participantes para verificar se existe um risco genético específico para adquirir este tipo de infecção.

Após a realização do trabalho, você poderá ter acesso aos resultados entrando em contato comigo. Caso haja interesse de realizarmos futuras pesquisas entraremos em contato com você e, somente com sua autorização e a aprovação dos novos projetos no Comitê de Ética em Pesquisa, realizaremos os estudos.

RISCOS DIRETOS: O risco de formação de hematomas durante a coleta sanguínea será mínimo uma vez que serão utilizadas apenas amostras coletadas sob requerimento médico para investigação microbiológica própria dos pacientes internados, independente da execução do projeto, e esta será realizada cuidadosamente por profissional capacitado vinculado ao serviço do hospital.

BENEFÍCIOS DIRETOS E INDIRETOS AO PARTICIPANTE: Os benefícios diretos aos participantes da pesquisa incluem o diagnóstico mais rápido e preciso da candidemia, o que norteará uma melhor decisão clínica para o tratamento e, possivelmente, convergindo para uma recuperação mais rápida e eficaz.

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 participação dos voluntários. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em arquivos no computador do departamento de micologia da UFPE, sob a minha responsabilidade, na Rua Prof. Nelson Chaves, S/N – Cidade Universitária, UFPE, Recife-PE, pelo período mínimo de 5 anos.

O/A voluntário/a não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a participação serão assumidas ou ressarcidas pelos pesquisadores. Fica também garantida a 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, ou pelo meu representante legal, após a escuta da leitura deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e esclarecer as minhas dúvidas com o pesquisador responsável concordo em participar do estudo CANDIDEMIA EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA (UTI): ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO MULTICÊNTRICO ASSOCIADO AO PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA, 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 meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento).

A rogo de _____, que está internado na UTI do hospital _____, eu assino o presente documento que autoriza a sua participação neste estudo.

Assinatura: _____ Local e data: _____

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 – VERSÃO EM INGLÊS DO ARTIGO 1

CANDIDEMIA IN INTENSIVE CARE UNITS FROM TWO TERTIARY HOSPITALS IN NORTHEAST OF BRAZIL BETWEEN 2015 AND 2017

Rodrigo Niskier Ferreira Barbosa¹, Reginaldo Gonçalves Lima-Neto², Madi Veiga Diniz³, Cícero Pinheiro Inácio⁴, Ana Paula Santiago Rocha⁴, Michellângelo Nunes Silva⁴, Rejane Pereira Neves⁴

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, ²Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, ³Hospital Agamenom Magalhães, ⁴Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco

Hospitalization in Intensive Care Units (ICUs) is considered an isolated risk factor for the development of candidemia. Susceptibility to this infection may increase in conditions such as neutropenia, mucosal injury, solid tissue or hematopoietic stem cell transplantation, immunosuppressive therapy, use of broad spectrum antimicrobials, prolonged stay, and use of a central venous catheter. In addition, the variation in virulence of *Candida* species may influence the development and severity of the infection. The objective of this work was to verify the distribution and in vitro cell adhesion capacity of *Candida* species as etiological agents of fungal infections in the bloodstream of patients in ICUs of public hospitals of Pernambuco and Paraíba between the years of 2015 and 2017. Hemoculture isolates were identified by automation and the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. The phenotype of yeast virulence was verified from the in vitro assay of epithelial cell adhesion. A total of 74 samples were obtained for species of the genus *Candida*, as candidemia agents. Clinical information of 80 patients with no culture was collected to characterize the control group. *Candida albicans* was found in 31 samples (41.89%), *C. tropicalis* in 26 (35.14%), *C. parapsilosis* in 11 (14.86%) and *C. glabrata* in 6 (8.11%). A statistically significant difference was observed in the use of immunosuppressants ($p = 0.0008$), neutropenia ($p < 0.0001$), previous use of antibacterial drugs ($p < 0.0001$), ICU stay longer than 14 days ($p < 0.001$), central venous catheter use ($p < 0.0001$), parenteral nutrition ($p < 0.0001$) and mechanical ventilation ($p < 0.0001$). The highest percentage of isolates with strong adhesion capacity was found for *C. albicans*, while all *C. glabrata* isolates were characterized with poor adherence capacity. As a conclusion, the data found show that *Candida non-albicans* species present as important etiological agents of candidemia, associated with patients' immunological status, previous use of antimicrobial agents and

submission to invasive procedures as risk factors. Despite being an important risk factor for the development of candidemia, the difference in virulence of the isolated species, estimated by *in vitro* adherence capacity, was not statistically significant in the samples analyzed.

KEY WORDS: CANDIDEMIA. INTENSIVE CARE UNIT. VIRULENCE.

INTRODUCTION

According to the Extended Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC II), *Candida* species represent the third most frequent cause of infection in Intensive Care Units (ICUs) worldwide, responding for 17% of all infections in patients with positive blood culture. Candidemia in this group of patients will result in worsening of the clinical picture, increase in length of stay, difficulty in treatment and death (1) .

In Brazil, a study called Brazilian Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance (BRSCOPE), involved 16 public and private hospitals participating in the five regions of Brazil. Species of the genus *Candida* comprised the 7th most prevalent agent, representing 137 cases, of which 88 (64.2%) occurred in ICUs. The species distribution was: *albicans* (34.3%) *C. C. parapsilosis*(24.1%), *C. tropicalis* (15.3%), *C. glabrata* (10.2%), *C. krusei* (1.5%), *C. pelliculosa* (1.5%), *C. lusitaniae* (0.7%), *C. famata* (0.7%), and *C. guilliermondii* (0.7%). These data diverge from the European and North American studies, which point out *C. glabrata* as the most incident non-*albicans Candida* species (2) .

Although population data establish important clinical parameters for this type of infection, the protocols developed from the results of large studies can not be directly extrapolated for the application of empirical protocols in specific groups belonging to this population, as there may be significant divergences in the distributions and characteristics of the isolates between regions (3) . These differences are still not well understood, which justifies the need to expand research in specific populations in Brazil, especially in the North and Northeast, where studies are scarcer.

Due to the great diversity of clinical conditions to which patients are submitted,

ICU admission is considered an isolated risk factor for the development of candidemia. This is due to the clinical condition of the patient (age, immune status and underlying disease) and procedures, which is submitted in this sector (central venous catheter use, hemodialysis equipment, endotracheal tubes and urinary catheters) (1,4, 5).

The variation in virulence of *Candida* species is one of the factors that can influence the development and severity of the infection. An estimate of the virulence profile of the fungus can be verified by *in vitro* assays assessing the ability of adhesion

in epithelial cells or against surfaces of synthetic materials such as plastics and metals. Most studies, however, focus on characterizing the factors associated with *C. albicans* infection, with a shortage of publications on other species (6).

Identifying the patient at risk of developing such infections in the ICU is one of the greatest challenges for professionals, since resistance to antifungals in the typical *Candida* isolates and the emergence of virulent and multiresistant species such as *Candida auris* hinder the therapeutic decision. In this context, epidemiological studies represent an important source of information for the elaboration of protocols that can be applied to initiate empirical treatments (7)

The objective of this study was to characterize the risk factors for the patients and the virulence of the isolates in cases of candidemia from the ICUs of two public hospitals in the Northeast of Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Study Design and Target Population - It was an observational, transversal, case-control study. The participants of this study were patients admitted to the Intensive Care Units (ICUs) of the Agamenon Magalhães Hospital (Recife, PE), which has 447 beds, 59 of which are ICUs, and the Senator Humberto Lucena Emergency and Trauma Hospital (João Pessoa, PB). 330 beds, 48 of which are ICUs. The case group consisted of patients admitted to ICUs who were over 18 years of age and who had a medical request for microbiological diagnosis, through blood culture, with a positive result for yeast. The control group consisted of adult patients hospitalized in ICUs with no history or evidence of candidemia or any invasive fungal infection or who had a negative result for yeast after blood culture.

Methods of Sample Collection and Analysis - Up to three venous blood samples were collected aseptically on consecutive days of each participant from the venous puncture test in Vacutainer® EDTA tubes by trained professionals and subsequently packed in tubes containing *Brain Heart Infusion medium* (BHI, KASVI, Brazil) for diagnosis laboratory.

Blood cultures were tested using the Bactec 9120 / Phoenix TM automated culture system BD-Becton Dickinson's (BD Diagnostic Systems, Franklin Lakes, NJ, USA).

Information on variables related to the participants was collected through consultations with the respective medical records. The accomplishment of this work was approved by the research ethics committee of the Health Sciences Center of the Federal University of Pernambuco under registration CAAE 40428414.0.0000.5208.

Molecular Analysis by Polymerase Chain Reaction (PCR) - The yeast DNA isolated was extracted according to a previously proposed methodology (8). Each cell mass obtained was transferred to threaded extraction tubes containing glass beads. 700 μL of hexadecyl trimethyl ammonium bromide-CTAB buffer, preheated at 60 ° C for 30 seconds, was pipetted into the extraction tubes containing glass beads and the cell mass, and then stirred in the FastPrep for 1 minute at 5.5 m / s, followed by incubation in a water bath for 1 hour at 65 ° C.

Centrifugation was performed at 13000 rpm for 10 minutes and each supernatant was transferred to 2.0 ml tubes to which chloroform-isoamyl alcohol solution (24: 1) was added. Another centrifugation was then performed under the same conditions as before. Each supernatant was recovered and transferred to another tube, in which the same volume of isopropanol was added. Samples were maintained at -20 ° C for 30 minutes, and then centrifugation was performed under the same conditions. After this step, the formation of the precipitate was observed.

The supernatant was discarded and the precipitate was subjected to three successive washes with 70% ethanol. The tubes were held horizontally at 37 ° C for complete spontaneous ethanol evaporation. Subsequently, 55 μL of ultra pure water was added to the DNA, kept in a refrigerator for resuspension. The extracted DNA was quantified by ultraviolet light spectrophotometry at 260-280 nm (Nanodrop 1000 Spectrophotometer) and the concentrations were adjusted to 200ng/ μL .

Species-specific identification by Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed from a previously described protocol (9). The final volume per reaction was 25 μL , consisting of 20 ng of DNA, 10nM Taq Buffer, 10 mM dNTPs, 0.8 μL of each primer (20 pmol / μL) and Taq DNA polymerase 1.25 U. Thermocycler conditions were, initial denaturation at 92 ° C for two minutes, followed by 35 cycles of denaturation at 95 ° C for one minute, annealing at 50 ° C per one minute and extension at 72 ° C for one minute. After the 35 cycles the final extension was followed at 72 ° C for 10 minutes (THERM-1000, MAXYGENE, New York, USA). The primers used in this work are in Table 1.

The amplification products were separated by 1% agarose gel electrophoresis with 1X TAE buffer (Tris-Acetate-EDTA) for 40 min at 3V / cm. The gel was stained with *GelRed* [™] and analyzed under UV light using with reference to the molecular weights previously described (9).

TABLE 1
Primers used and size of amplified products (amplicons).

Identification	Sequence of primers	Size of amplicons
<i>Candida albicans</i>	5'-TCAACTTGTCACAGATTATT-3 '	402bp
<i>C. glabrata</i>	5'-CACGACTCGACACTTTCTAATT-3 '	632bp
<i>C. tropicalis</i>	5'-AAGAATTTAACGTGGAACTTA-3 '	149bp
<i>C. parapsilosis</i>	5'-GGCGGAGTATAAACTAATGGATAG-3 '	126bp
ITS4*	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3 '	-

*The ITS4 was the reverse primer, while the others were the forward primers for each generated amplicon.

In vitro Adhesion Assay to Epithelial Cells - Adherence tests were based on a previously published study (10). Phosphate Buffered Saline - PBS (NaCl 8g/L, KCl 0.2g/L, Na₂HPO₃ 1.44g/L, KH₂PO₄ 0.24g/L, pH 7.2 was used in all steps related to the adhesion tests.) sterilized.

Yeast cells isolated were grown on Malte agar (DIFCO, USA) for 36 hours at 37°C and resuspended in 2mL of 0.1M PBS, pH 6.8 and 4 ° C. They were washed twice in 2mL of PBS under centrifugation (2500 rpm, five minutes each) and finally resuspended again in PBS at a concentration of 2×10^7 cell.mL⁻¹, determined in Neubauer's chamber.

Epithelial cells were collected from a healthy adult volunteer by gentle scarification of the oral mucosa with sterile Swabs. Cells were suspended and washed twice in 5mL PBS by centrifugation (2500 rpm for five minutes each). Cells were resuspended in PBS at a concentration of 4×10^4 cells.mL⁻¹, determined in Neubauer's chamber.

Adherence assays were enhanced by incubating at 25°C a 1mL mixture of each suspension in a test tube under gentle agitation for two hours. Subsequently, the staining was performed with methylene blue, with subsequent observation under an optical microscope. In each slide 100 epithelial cells were observed in relation to the percentage of their surface area in which the yeasts adhered.

The results were expressed as: strong adhesion, for adhesion in 50% to 100% of the surface area, poor adhesion, for adhesion up to 50%, or without visible adherence.

Data analysis - The chi-square test, Fisher's exact test and Multivariate Analysis with Logistic Regression were performed to evaluate the association of candidemia with clinical conditions and with the adherence capacity of the isolates. A " p " value equal to or less than 0.05 was considered statistically significant. The tests were performed in the GraphPad Prism 7 program (San Diego, CA, USA).

RESULTS

Between May 2015 and April 2017, 74 positive samples were obtained for *Candida* species (33 in Pernambuco and 41 in Joao Pessoa). Clinical information of 80 patients with negative culture was collected to characterize the control group. Considering the total number of ICU admissions in this period, 2,623 at the Agamenom Magalhães Hospital (PE) and 2,826 at the HETSHL (PB), there was an incidence of 12.6 and 14.5 cases of candidemia per 1000 admissions in the respective ICUs. The characterization of the variables is presented in Table 2.

The distribution of the isolated species, confirmed by PCR, is in Table 3. The *C. albicans* species was the most frequently isolated (41.89%). The mean number of days of ICU stay was 29.62 (standard deviation: 20.47) for patients with *C. albicans* positive blood culture, 31,15 (standard deviation: 26.26) for *C. tropicalis*, 25, 1 (standard deviation: 21.55) for *C. parapsilosis* and 28 (standard deviation: 19.63) for *C. glabrata*. There was no statistically significant difference ($p = 0.9096$). It was verified death in 33 patients (44.6%) and in 42 participants of the control group (52.5%).

Regarding the risk factors for the development of candidemia, it was possible to observe a statistically significant difference in relation to the use of immunosuppressant ($p = 0.0008$), neutropenia ($p < 0.0001$), previous antibacterial use ($p < 0.0001$), residence time in the ICU greater than 14 days ($p = 0.001$), central venous catheter ($p < 0.0001$), parenteral nutrition ($p < 0.0001$) and mechanical ventilation ($p < 0.0001$).

The phenotypic characterization of the virulence of the isolates was determined by the *in vitro* adherence test of the isolated species. The highest percentage of isolates with strong adhesion capacity were found for *C. albicans*, while all *C. glabrata* isolates were characterized with poor adhesion capacity (Table 4).

Table 2: Characterization of the independent variables among patients with positive blood culture for *Candida* species and for the control group

Variables	Patients	Controls	Value <i>p</i> *	Odds ratio (95% CI)
Demographic				
Mean age (SD)	49.5 (17.57)	46.52 (17.34)	0.2952	
Sex (%)				
Male	40 (54.05)	50 (62.5)	0.7829	
Female	34 (45.95)	30 (37.5)		
Immune status				
Use of corticosteroids / immunosuppressants (%)	34 (45.95)	16 (20)	0.0008	3.4 (1.6657-6.9402)
Neutropenia [Leukocytes <500 cells / mm ³] (%)	41 (55.41)	10 (12.5)	<0.0001	8.7 (3.8856-19.4661)
HIV infection (%)	4 (5.41)	1 (1.25)	0.196	4.5 (0.4928- 41,3505)
History of drug therapy				
Antibacterial pretreatment (%)	49 (66.22)	28 (35)	<0.0001	3.6 (1.8707-7.0828)
ICU admission				
Cause of hospitalization (%)				
Chronic disease	47 (63.51)	46 (57.5)	0.5485	1.3 (0.6727-2.4608)
Surgical	27 (36.49)	34 (42.5)		
Length of stay in the ICU> 14 days (%)	53 (71.62)	36 (45)	0.001	3.1 (1.5778-6.0306)
Use of central venous catheter	65 (87.9)	45 (56.3)	<0.0001	5.6 (2.4610-12.8215)
Use of mechanical ventilation	65 (87.9)	46 (57.5)	<0.0001	5.3 (2.3368-12.1945)
Parenteral nutrition	61 (82.43)	36 (45)	<0.0001	5.7 (2.7272-12.0601)
Dialysis dependence	40 (54.05)	38 (47.5)	0.5169	1.3 (0.69-2.4506)

TABLE 3

Distribution of species of 74 *Candida* isolates in ICU patients, average days of hospitalization and percentage of deaths.

Isolated species (n = 74)	Isolated (%)	Average ICU days (standard deviation)	Deaths (%)
<i>Candida albicans</i>	31 (41.89)	29.6151 (20.47)	12 (38.71)
<i>Candida tropicalis</i>	26 (35.14)	31.1538 (26.26)	14 (53.85)
<i>Candida parapsilosis</i>	11 (14.86)	25.1 (21.55)	4 (36.36)
<i>Candida glabrata</i>	6 (8.11)	28 (19.63)	3 (50%)

TABLE 4

Adherence capacity verified by *in vitro* assay of isolated species.

Isolated species (n = 74)	<i>In vitro</i> Adhesion Capacity	
	Strong (%)	Weak (%)
<i>Candida albicans</i>	21 (67.7)	10 (32.3)
<i>Candida tropicalis</i>	9 (34.6)	17 (65.4)
<i>Candida parapsilosis</i>	3 (27.3)	8 (72.7)
<i>Candida glabrata</i>	0 (0)	6 (100)

DISCUSSION

This is the first study that characterizes the incidence of candidemia in ICU patients at a public hospital in the state of Paraíba. In Pernambuco, three papers were published, two were case reports in newborn patients, one with *C. pelliculosa* isolates (11) and another of *C. haemulonii* (12). The incidence of 3.9 cases for 1000 admissions was evidenced in a private hospital in Pernambuco from September 2003 to March 2004 (13). Of the 21 isolates described, 15 were from ICUs.

It was evidenced in this work that *C. albicans* was the most incident species (41.89%), although the species of *Candida non- albicans*, together, were responsible for 58.11% of the cases. In the study carried out in Pernambuco (13), considering only the ICU isolates, 80% were *Candida non- albicans* species. The general distribution of species depends on the geographical distribution and clinical characteristics associated with the patients. The changing epidemiology of *Candida* infections in connection with *Candida* species not *-albicans* is clinically

relevant because of high rates of fluconazole resistance among isolates of *C. glabrata* and *C. krusei* intrinsic resistance to fluconazole (1.14) .

In the United States of America, a study conducted in 56 hospitals between 1998 and 2006 found 1218 episodes of infections in the bloodstream by *Candida* spp. The *C. albicans* species was the most prevalent, identified in 611 cases (50.7%), followed by *C. parapsilosis* (17.4%), *C. glabrata* (16.7%) and *C. tropicalis* (10.2 %). The proportion of *Candida* non- *albicans* species increased significantly ($p < 0.001$) (15).

In European and Australian ICUs *C. glabrata* is generally the most common non-*albicans Candida* isolate, accounting for about 20% of infections. It is less virulent than *C. albicans* and is associated with increased age and solid organ transplants. Isolates of *C. tropicalis* are similar to those of *C. albicans* in terms of virulence and are comparatively less frequent (approximately 9%) (16).

In South America *C. tropicalis* is the most common non-*albicans Candida* isolate (approximately 20%), whereas *C. glabrata* is isolated in about 9% of cases. These differences in species distribution may help to explain the different mortality rates associated with candidemia reported in Europe (50%) and South America (70%), for example (16).

The relationship between *C. albicans* and *Candida* non-*albicans* species found in the present study is in agreement with most publications, whose evidence suggests a change in the last decades in relation to the estimated proportions. A decrease in the proportion of *C. albicans* and an increase in *C. glabrata* and *C. parapsilosis* is observed , mainly in works in USA and Europe. The results presented here and in other Brazilian states (Table 5), Russia (17) , China (18) and India (19) reflect, however, a higher proportion of *C. tropicalis* than *C. parapsilosis* , *C. glabrata* and other species.

TABLE 5Distribution of *Candida* species isolated from patients admitted to ICUs in Brazil.

Local	Period	Cases	<i>Candida albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	Others	References
Recife PE)									
João Pessoa (PB)	2015-2017	74	41.89%	35.14%	8.11%	14.86%	-	-	This study
Campinas, sp)	2006-2010	53	43.4%	28.4%	7.5%	9.4%	3.8%	7.5%	(20)
Sao Paulo-SP)	2003-2012	647	44%	21.8%	9.9%	17.2%	2.5%	1.9%	(21)
Londrina (PR)	2004-2011	108	28.7%	30.5%	8.3%	24,1%	1.8%	-	(22)
Ribeirão Preto (SP)	2011-2012	18	36.8%	26.3%	15.7%	5.2%	5.2%	5.2%	(23)
Brasilia DF)	2011-2012	40	22.5%	2.5%	5%	70%	-	-	(24)
Campo Grande, MS)	2013-2014	221	35.3%	33.5%	15.8%	9.9%	3.2%	2.4%	(25)
Curitiba (PR)	2011-2016	149	45%	15.4%	14.1%	12.1%	6.7%	6.7%	(14)

Regarding the independent variables, the results found in studies in Brazil present data similar to those reported in the present study. A study conducted in 16 hospitals in the five regions of the country between 2007 and 2010 identified 137 patients with candidemia, of which 88 were in ICUs. The majority of the patients were male (51.8%) and the mean age was 56 years. The most common underlying condition was cancer (32.1%), followed by gastrointestinal disease (18.9%). Among the main risk factors were the use of CVC (88.3%) and mechanical ventilation (49.6%). However, the observed mortality was 85% of patients admitted to the ICU who developed candidemia ($p < 0.01$), whereas in the present study it was 44.6% ($p = 0.3838$) (2) .

A retrospective study of 14,414 patients admitted to ICUs from 76 countries found a prevalence of candidemia of 6.9/1000 patients. Regarding gender, 59% were male, with a mean age of 59 years and were hospitalized for an average of 14 days in the ICU. The most common underlying condition was cancer (24.6%), followed by chronic obstructive pulmonary disease (13.1%). Regarding clinical interventions, the use of CVC (88.5%), mechanical ventilation (72.1%) and use of arterial catheter (63.9%) were the most noteworthy. Mortality was observed in 42.6% of these patients (26) .

ICU admission is considered an isolated risk factor for the development of candidemia, due to the great diversity of invasive procedures, existence of environmental reservoirs and cross-contamination of the care to which the patients are submitted (1,4,5).

The data point to the intestine as the initial source of endogenous *Candida* spp isolated in blood cultures. In studies with animal models, it has been shown that neutropenia with preserved intestinal integrity or intestinal lesion without neutropenia are insufficient conditions for the development of disseminated candidiasis in a murine model. In humans, this combination of factors is found in neutropenic enterocolitis (16). Less frequently, deep candidiasis may occur as a result of ascending pyelonephritis and may remain localized or lead to secondary candidemia (4,27).

Other situations that cause immunological weakness, such as those arising from the clinical conditions of patients with diabetes, renal insufficiency and other chronic diseases, are indicated as important risk factors for candidemia in ICU patients. The difference may be in the additive contribution of interventions, particularly the introduction of mechanical devices, including CVC, hemodialysis equipment, endotracheal tubes, and urinary catheters. (1,18,28,29). In addition to these factors, cases of candidemia in the ICU, when compared to cases in other sectors, are characterized by a more frequent pre-exposure to fluconazole with

subsequent echinocandin treatment, a lower incidence of *C. parapsilosis* and higher gross mortality rates (21) .

Regarding the risk of death, some independent factors associated with candidemia in the ICU may include diabetic patients, use of mechanical ventilation, immunosuppression, fever, age, arterial catheter use, *C. kefyr* infection, pre-exposure to caspofungin and lack of antifungal therapy at the time of blood culture results (1) .

In the present study, a virulence profile of the *Candida* isolates was estimated by *in vitro* assay evaluating the adhesion capacity in epithelial cells. It was verified that 44.6% of the isolates presented a profile of strong adhesion capacity *in vitro*. The stratified proportions by species (Table 3) were similar to that of another study where 60% of the *C. albicans* and 25% *C. parapsilosis* isolates, obtained from the collection of samples in several tissues, presented strong adhesion capacity *in vitro* (30) . Another study, however, considering only blood stream isolates, showed that the strong *in vitro* adherence profile of *C. albicans* was present in 30% of the isolates (31).

Among the species of *Candida* non- *albicans*, the profile of strong adherence was more frequent in *C. tropicalis*. In a study carried out with patients affected by *C. tropicalis* infection in the bloodstream, it was demonstrated that the increase in adhesion capacity, evaluated *in vitro* , was associated with a higher potential for biofilm formation and, consequently, greater virulence (32) .

As conclusion, this study evidenced the distribution of *Candida* species isolated from the bloodstream of patients admitted to the ICUs of public hospitals in Pernambuco and Paraíba. The data found are in agreement with other studies showing an increase in the incidence of non-*albicans Candida* species. The evaluation of the risk factors confirmed that the patients' immunological status, previous use of antimicrobials and submission to invasive procedures are significantly associated with the infection. Despite being an important risk factor for the development of candidemia, the difference in virulence of the isolated species, estimated by *in vitro* adherence capacity, was not statistically significant.

ACKNOWLEDGEMENTS

Fundação de Amparo a Pesquisa de Pernambuco (FACEPE), for the financial support to this research.

REFERENCES

1. Lamothe F, Lockhart SR, Berkow EL, Calandra T. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(April):i4–13.
2. Doi AM, Pignatari ACC, Edmond MB, Marra AR, Camargo LFA, Siqueira RA, et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *PLoS One.* 2016;11(1):e0146909.
3. Govender NP, Patel J, Magobo RE, Naicker S, Wadula J, Whitelaw A, et al. Emergence of azole-resistant *Candida parapsilosis* causing bloodstream infection: Results from laboratory-based sentinel surveillance in South Africa. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(7):1994–2004.
4. McCarty TP, Pappas PG. Invasive Candidiasis. *Infect Dis Clin North Am* [Internet]. 2016;30(1):103–24. Available at: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1315399>
5. Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag.* 2014;10(1):95–105.
6. Mistro S, MacIel IDM, De Menezes RG, Maia ZP, Schooley RT, Badaró R. Does lipid emulsion reduce amphotericin B nephrotoxicity? A systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2012;54(12):1774–7.
7. Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender NP, et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clin Infect Dis.* 2017;64(2):134–40.
8. Fredricks DN, Smith C, Meier A. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *J Clin Microbiol.* 2005;43(10):5122–8.
9. Li YL, Leaw SN, Chen JH, Chang HC, Chang TC. Rapid Identification of Yeasts Commonly Found in Positive Blood Cultures by Amplification of the Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003;22(11):693–6.
10. Kearns MJ, Davies P, Smith H. Variability of the adherence of *Candida albicans* strains to human buccal epithelial cells: inconsistency of differences between strains related to virulence. *Sabouraudia* [Internet]. junho de 1983;21(2):93–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6348979>
11. da Silva CM, de Carvalho Parahym AMR, Leão MPC, de Oliveira NT, de Jesus Machado Amorim R, Neves RP. Fungemia by *Candida pelliculosa* (*Pichia anomala*) in a Neonatal Intensive Care Unit: A Possible Clonal Origin. *Mycopathologia.* fevereiro de 2013;175(1–2):175–9.

12. Silva CM, Carvalho-Parahym AMR, Macêdo DPC, Lima-Neto RG, Francisco EC, Melo ASA, et al. Neonatal Candidemia Caused by *Candida haemulonii*: Case Report and Review of Literature. *Mycopathologia*. 2015;180(1–2):69–73.
13. Hinrichsen SL, Falcão É, Vilella TAS, Colombo AL, Nucci M, Moura L, et al. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(4):394–8.
14. Breda GL, Tuon FF, Meis JF, Herkert PF, Hagen F, de Oliveira LZ, et al. Breakthrough candidemia after the introduction of broad spectrum antifungal agents: A 5-year retrospective study. *Med Mycol* [Internet]. 2017;(January):1–10. Available at: <https://academic.oup.com/mmy/advance-article/doi/10.1093/mmy/myx077/4372444>
15. Wisplinghoff H, Ebbers J, Geurtz L, Stefanik D, Major Y, Edmond MB, et al. Nosocomial bloodstream infections due to *Candida* spp. in the USA: Species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2014;43(1):78–81. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.09.005>
16. Epelbaum O, Chasan R. Candidemia in the Intensive Care Unit. *Clin Chest Med* [Internet]. 2017;38(3):493–509. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccm.2017.04.010>
17. Vasilyeva N V., Raush ER, Rudneva M V., Bogomolova TS, Taraskina AE, Fang Y, et al. Etiology of invasive candidosis agents in Russia: a multicenter epidemiological survey. *Front Med*. 2018;12(1):84–91.
18. Li C, Wang H, Yin M, Han H, Yue J-F, Zhang F, et al. The Differences in the Epidemiology and Predictors of Death between Candidemia Acquired in Intensive Care Units and Other Hospital Settings. *Intern Med* [Internet]. 2015;54(23):3009–16. Available at: https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/54/23/54_54.3744/_article
19. Chakrabarti A, Sood P, Rudramurthy SM, Chen S, Kaur H, Capoor M, et al. Incidence, characteristics and outcome of ICU-acquired candidemia in India. *Intensive Care Med*. 2014;41(2):285–95.
20. Moretti ML, Trabasso P, Lyra L, Fagnani R, Resende MR, De Oliveira Cardoso LG, et al. Is the incidence of candidemia caused by *Candida glabrata* increasing in Brazil? Five-year surveillance of *Candida* bloodstream infection in a university reference hospital in southeast Brazil. *Med Mycol*. 2013;51(3):225–30.
21. Colombo AL, Guimarães T, Sukienik T, Pasqualotto AC, Andreotti R, Queiroz-Telles F, et al. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. *Intensive Care Med*. 2014;40(10):1489–98.

22. da Costa VG, Quesada RMB, Abe ATS, Furlaneto-Maia L, Furlaneto MC. Nosocomial Bloodstream Candida Infections in a Tertiary-Care Hospital in South Brazil: A 4-Year Survey. *Mycopathologia*. 2014;178(3–4):243–50.
23. Gaspar GG, Meneguetti MG, Auxiliadora-Martins M, Basile-Filho A, Martinez R. Evaluation of the predictive indices for candidemia in an adult intensive care unit. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(1):77–82.
24. Pinhati HMS, Casulari LA, Souza ACR, Siqueira RA, Damasceno CMG, Colombo AL. Outbreak of candidemia caused by fluconazole resistant *Candida parapsilosis* strains in an intensive care unit. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2016;16(1):4–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-016-1767-9>
25. Mattos K, Rodrigues LC, De Oliveira KMP, Diniz PF, Marques LI, Araujo AA, et al. Variability in the clinical distributions of *Candida* species and the emergence of azole-resistant Non-*Candida albicans* species in public hospitals in the midwest region of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017;50(6):843–7.
26. Kett DH, Azoulay E, Echeverria PM, Vincent JL. *Candida* bloodstream infections in intensive care units: Analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. *Crit Care Med* [Internet]. 2011;39(4):665–70. Available at: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003246-201104000-00008>
27. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2018;4(May):1445–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29749387><http://www.nature.com/articles/nrdp201826>
28. Kavakeb S, Nguyen TT, Yang Z, Jenkinson I. Evolutionary Fleet Sizing in Static and Uncertain Environments with Shuttle Transportation Tasks-The Case Studies of Container Terminals [Application Notes]. *IEEE Comput Intell Mag*. 2016;11(1):55–69.
29. Mermutluoglu C, Deveci O, Dayan S, Aslan E, Bozkurt F, Tekin R. Antifungal Susceptibility and Risk Factors in Patients with Candidemia. *Eurasian J Med* [Internet]. 2017;48(3):199–203. Available at: <http://www.eajm.org/sayilar/203/buyuk/199-2033.pdf>
30. Lima-Neto RG, Beltrão EIC, Oliveira PC, Neves RP. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. *Mycoses* [Internet]. 2011;54(1):23–9. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0507.2009.01757.x><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19735440>
31. Mandelblat M, Frenkel M, Abbey D, Ben Ami R, Berman J, Segal E. Phenotypic and genotypic characteristics of *Candida albicans* isolates from

- bloodstream and mucosal infections. *Mycoses*. 2017;60(8):534–45.
32. da Silva EM, Mansano ESB, Miazima ES, Rodrigues FAV, Hernandez L, Svidzinski TIE. Radiation used for head and neck cancer increases virulence in *Candida tropicalis* isolated from a cancer patient. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):1–9.

APÊNDICE C – VERSÃO EM INGLÊS DO ARTIGO 2

TLR1 R80T POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH CANDIDEMIA IN INTENSIVE THERAPY UNITS OF PERNAMBUCO AND PARAÍBA PUBLIC HOSPITALS IN THE YEARS 2015 TO 2017.

Rodrigo Niskier Ferreira Barbosa¹, Reginaldo Gonçalves Lima-Neto², Madi Veiga Diniz³, Cícero Pinheiro Inácio⁴, Ana Paula Santiago Rocha⁴, Michellângelo Nunes Silva⁴, Rejane Pereira Neves⁴

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, ²Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, ³Hospital Agamenom Magalhães, ⁴Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco

Susceptibility to candidemia in patients admitted to Intensive Care Units (ICUs) may increase in conditions such as neutropenia, mucosal injury, solid tissue or hematopoietic stem cell transplantation, immunosuppressive therapy, use of broad spectrum antimicrobials, prolonged stay and use of central venous catheter. However, some patients do not develop such an infection, even with a combination of several risk factors, with an important role for polymorphisms in genes with immunological function, such as the Toll Like-1 receptor (TLR1). The objective of this work was to verify the distribution of *Candida* species as etiological agents of fungal infections in the bloodstream of patients in ICUs of public hospitals of Pernambuco and Paraíba between the years 2015 and 2017 and the possible contribution of polymorphism rs5743611 (R80T) of the TLR1 gene in susceptibility to this infection. Hemoculture isolates were identified by automation and the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. The distribution of the rs5743611 polymorphism was determined from PCR followed by restriction enzyme assays. A total of 74 samples were obtained for species of the genus *Candida*, as candidemia agents. Clinical information of 80 patients with no culture was collected to characterize the control group. *Candida albicans* was found in 31 samples (41.89%), *C. tropicalis* in 26 (35.14%), *C. parapsilosis* in 11 (14.86%) and *C. glabrata* in 6 (8.11%). A statistically significant difference was observed in the use of immunosuppressants ($p = 0.0008$), neutropenia ($p < 0.0001$), previous use of antibacterial drugs ($p < 0.0001$), ICU stay longer than 14 days ($p < 0.001$), central venous catheter use ($p < 0.0001$), parenteral nutrition ($p < 0.0001$) and mechanical ventilation ($p < 0.0001$). The distribution of rs5743611 polymorphism genotypes was found in Hardy-Weinberg equilibrium in both groups

($p < 0.01$), but did not present a statistically significant difference between the groups ($p = 0.3594$). As a conclusion, the data found show that *Candida non-albicans* species present as important etiological agents of candidemia, associated with patients' immunological status, previous use of antimicrobial agents and submission to invasive procedures as risk factors. The results of this work sum up evidence pointing to a secondary role of polymorphism rs5743611 in the susceptibility to candidemia. Considering the miscegenation in the distinct genetic composition of Northeastern Brazil and the lack of association observed similarly in other studies, it is possible to suggest that future studies with a larger number of samples in Brazil may contribute to elucidate the role of TLR genes in susceptibility to this type of infection.

KEY WORDS: CANDIDEMIA. INTENSIVE CARE UNIT. TOLL LIKE RECEIVER

INTRODUCTION

Infection in the bloodstream by fungi of the genus *Candida* represents an important cause of clinical complications during patients' stay in the Intensive Care Units (ICUs) (1). However, some patients do not develop candidemia, even with a combination of several risk factors such as neutropenia, mucosal injury, solid tissue or hematopoietic stem cell transplantation, immunosuppressive therapy, use of broad spectrum antimicrobials, prolonged ICU stay and use of central venous catheter (2).

Among the main lines of research, an important role is attributed to underlying genetic variations, which, in combination with other risk factors, possibly regulate the patient's susceptibility. Thus, the polymorphisms in the genes of the superfamily *Toll Like Receptors* (TLR1 to TLR10), which encode receptors for the recognition of pathogens present in monocytes, macrophages, dendritic cells and neutrophilic cells (3).

The association between TLR1, TLR2 or TLR4 receptors with the molecular patterns of *Candida* spp. is well characterized and induces innate immune response, leading to the synthesis and release of cytokines, proinflammatory chemokines and activation of the NLRP3 inflammasome, which converts the IL-1 β and IL-18 interleukins to the active forms. Then, the subsequent activation of inflammation and the adaptive immune response occurs, and phagocytosis and death of the fungus occur, predominantly by neutrophils (4).

In a prospective study conducted in the United States with North American and Dutch patients, three SNP polymorphisms in the *TLR1* gene were associated with susceptibility to candidemia among Caucasian individuals. The SNP rs5743611, which results in the exchange of the amino acid arginine by threonine in codon 80 of

the gene (R80T), was the one with the highest *odds ratio* = 1.82 (95% confidence interval ranging from 1.12 to 2.98) with $p = 0.02$ (2).

The modification in the protein resulting from the variant allele of this polymorphism promotes a change in the central extracellular portion of TLR1, leading to decreased sensitivity of this receptor by the components of the cellular microbial apparent, in *in vitro* models. In addition to candidemia, it was associated with ulcerative colitis (*odds ratio* = 2.84, $p = 0.045$) and increased susceptibility to invasive aspergillosis in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation (*odds ratio* = 1.3, $p < 0.01$) (5,6) .

In Brazil there are few studies on the genetic susceptibility to candidemia and diagnosis of this predisposition, which would certainly help to determine which patients could benefit from prophylactic antifungal treatment or adjuvant immunotherapy. Thus, the objective of this study was to analyze the possible association between the rs5743611 polymorphism and the increase in susceptibility to candidemia in patients in the ICUs of public hospitals.

MATERIAL AND METHODS

Study Design and Target Population - It is an observational, transversal, case-control study. The participants of this research were patients admitted to the ICUs of public hospitals in Pernambuco and Paraíba, Northeastern Brazil, between the years 2015 and 2017. The case group consisted of patients admitted to ICUs who were over 18 years of age and who had a medical request for microbiological diagnosis, through blood culture, with a positive result for yeast. The control group consisted of adult patients hospitalized in ICUs with no history or evidence of candidemia or any invasive fungal infection or who had a negative result for yeast after blood culture.

Methods of Sample Collection and Analysis - Up to three venous blood samples were collected aseptically on consecutive days of each participant from the venous puncture test in Vacutainer® EDTA tubes by trained professionals and subsequently packed in tubes containing *Brain Heart Infusion medium* (BHI, KASVI, Brazil) for diagnosis laboratory.

Blood cultures were tested using the Bactec 9120 / Phoenix TM automated culture system BD-Becton Dickinson's (BD Diagnostic Systems, Franklin Lakes, NJ, USA).

Information on variables related to the participants was collected through patient records. The accomplishment of this work was approved by the research ethics committee of the Health Sciences Center of the Federal University of Pernambuco under registration CAAE 40428414.0.0000.5208.

Molecular Analysis by Polymerase Chain Reaction (PCR) - The isolated yeast DNA was extracted according to previously proposed methodology (7) . Each cell mass obtained was transferred to threaded extraction tubes containing glass beads. 700 μ L of hexadecyl trimethyl ammonium bromide-CTAB buffer, preheated at 60 ° C for 30 seconds, was pipetted into the extraction tubes containing glass beads and the cell mass, and then stirred in the FastPrep for 1 minute at 5.5 m / s, followed by incubation in a water bath for 1 hour at 65°C.

Centrifugation was performed at 13000 rpm for 10 minutes and each supernatant was transferred to 2.0 ml tubes to which chloroform-isoamyl alcohol solution (24:1) was added. Another centrifugation was then performed under the same conditions as before. Each supernatant was recovered and transferred to another tube, in which the same volume of isopropanol was added. Samples were maintained at -20°C for 30 minutes, and then centrifugation was performed under the same conditions. After this step, the formation of the precipitate was observed.

The supernatant was discarded and the precipitate was subjected to three successive washes with 70% ethanol. The tubes were held horizontally at 37°C for complete spontaneous ethanol evaporation. Subsequently, 55 μ L of ultra pure water was added to the DNA, kept in a refrigerator for suspension. The extracted DNA was quantified by ultraviolet light spectrophotometry at 260-280 nm (Nanodrop 1000 Spectrophotometer) and the concentrations were adjusted to 200ng/ μ L.

Species-specific identification by Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed using a previously described protocol (8). The final volume per reaction was 25 μ L, consisting of 20 ng of DNA, 10 x Taq Buffer, 10 mM dNTPs, 0.8 μ L of each primer (20 pmol/ μ L) and Taq DNA polymerase 1.25 U. amplifications performed in thermocycler (THERM-1000, MAXYGENE, New York, USA) were, initial denaturation at 92 ° C for two minutes, followed by 35 cycles of denaturation at 95 ° C for one minute, annealing at 50 ° C for one minute and extension at 72°C for one minute. After the 35 cycles the final extension was followed at 72 ° C for 10 minutes. The primers used in this work are in Table 1.

The amplification products were separated by 1% agarose gel electrophoresis with 1X TAE buffer (Tris-Acetate-EDTA) for 40 min at 3V / cm. The gel was stained

with *GelRed*[™] and analyzed under UV light using with reference to the molecular weights previously described (8).

TABLE 1
Primers used and size of amplified products (amplicons).

Identification	Sequence of <i>primers</i>	Size of amplicons
<i>Candida albicans</i>	5'-TCAACTTGTCACAGATTATT-3 '	402bp
<i>C. glabrata</i>	5'-CACGACTCGACACTTTCTAATT-3 '	632bp
<i>C. tropicalis</i>	5'-AAGAATTTAACGTGGAAACTTA-3 '	149bp
<i>C. parapsilosis</i>	5'-GGCGGAGTATAAACTAATGGATAG-3 '	126bp
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3 '	-

*The ITS4 was the reverse primer, while the others were the forward primers for each generated amplicon.

To investigate the rs5743611 polymorphism, DNA samples were extracted from participants' blood using previously standardized methodology (9) . The extracted DNA was quantified by ultraviolet light spectrophotometry at 260-280 nm (Nanodrop 1000 Spectrophotometer) and the concentrations were adjusted to 200ng/μL.

PCR amplification followed a previously described protocol (KIM et al., 2012). The final reaction volume was 25μL, composed of 20 ng of DNA, *Taq* 10x Buffer, 10 mM dNTPs, 10 pmol/μL *primers* (forward 5'-3'-AGGGTGGCAAGAAATCTTCA; Reverse 5'-3'-TCTGAGCTTTGGACTTCTGACA) and *Taq* DNA polymerase 1.5 U the conditions for amplifications performed in a thermocycler (THERM-1000, MAXYGENE, New York, USA) were initial denaturation at 92°C for five minutes, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 53°C for 30 seconds and extension at 72°C for 30 seconds. After the 35 cycles the final extension was followed at 72°C for 10 minutes.

Amplification products (165pb) were evidenced by 1% agarose gel electrophoresis with 1X TAE buffer (Tris-Acetate-EDTA) for 20 min at 3V / cm. After the confirmation, the PCR products were subjected to enzymatic digestion for 16 hours (*overnight*) at 37°C with restriction enzyme *Hinf* I. The fragments obtained (Allele G = 165pb, Allele C = 94pb + 71pb) were submitted to 3% agarose gel electrophoresis for 40 minutes. In both cases the gels were stained with *GelRed*[™] and analyzed under ultraviolet light.

Data analysis - The Hardy-Weinberg equilibrium for polymorphism rs5743611 was verified by the chi-square test (χ^2) separately in the control group and of patients with candidemia, using the statistical program PLINK 1.9. The association and analysis of the demographic and clinical variables were performed in the SAS 9.2 program (SAS Corporation). A dominant logistic regression model was used (considering the homozygote for the lower frequency allele and the heterozygote as at-risk genotypes).

In all cases a 95% confidence interval was established and the " *p* " value equal to or less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

A total of 74 samples were obtained for species of the genus *Candida*, as candidemia agents. Clinical information of 80 patients with no culture was collected to characterize the control group. The mean age was 49.5 years in the group of patients with candidemia (standard deviation = +/- 17.57) and 46.5 in the control group (standard deviation = +/- 17.34). There were a higher percentage of men both in the group of patients with candidemia (54.05%) and in the control group (62.5%).

In relation to single species, *C. albicans* was observed in 31 specimens (41.89%), *C. tropicalis* 26 (35.14%) *C. parapsilosis* 11 (14.86%) and *C. glabrata* six (8.11%).

The distribution of the genotypes in relation to polymorphism rs5743611 in the group of patients with candidemia and in the control group is presented in Table 2. The allele frequencies found in the group of patients with candidemia were $p(G) = 0.8378$, and $q(C) = 0.1622$. In the control group the frequency was $p = 0.7375$, and $q = 0.2625$. Both were in Hardy-Weinberg equilibrium (Group of patients with candidemia: $\chi^2 = 6.83$, $p < 0.01$; Control group: $\chi^2 = 30.02$, $p < 0.001$). Assuming a dominant model for the logistic regression calculation it was verified that the The distribution of the polymorphism investigated did not present a statistically significant difference in the group of patients with candidemia in relation to the control group ($p = 0.3594$, *Odds ratio* = 0.6778 with 95% CI = 0.3375 - 1.3624).

TABLE 2

Distribution of genotypes for polymorphism rs5743611 in the group of patients with candidemia and in the control group.

GROUPS	GENOTYPES			<i>p</i> value	Odds ratio(95% CI)
	GG	GC	CC		
Patients with candidemia (%)	55 (74.32)	14 (18.92)	5 (6.76)	0,3594	0,6781 (0.3375 - 1.3624)
Group control (%)	53 (66.25)	12 (15)	15 (18.75)		

DISCUSSION

It was evidenced in this work that *C. albicans* was the most incident species (41.89%), although the species of *Candida* non- *albicans*, together, were responsible for 58.11% of the cases. It is considered that the general distribution of the species depends on the geographical distribution and clinical characteristics associated with the patients. The changing epidemiology of *Candida* infections in connection with *Candida* species not -*albicans* is clinically relevant because of high rates of fluconazole resistance among isolates of *C. glabrata* and *C. krusei* intrinsic resistance to fluconazole (1.10) .

The relationship between *C. albicans* and non- *albicans Candida* species found in the present study was also verified in other studies, whose data show a change in the last decades in relation to the estimated proportions. For example, there is a decrease in the proportion of *C. albicans* and an increase in *C. glabrata* and *C. parapsilosis*, mainly in the USA and Europe. The results presented here and in other Brazilian states, Russia (11), China (12) and India (13) , however, reflect a higher proportion of *C. tropicalis* than *C. parapsilosis* , *C. glabrata* and other species.

It was not possible to show in this study the increase in susceptibility to candidemia in relation to polymorphism rs5743611. It is possible that in the study population the effect of this change has a smaller impact on the role of other TLR receptors, since TLR1 forms a functional heterodimer with TLR2 (14,15). This association promotes the activation of phagocytosis and production of inflammatory cytokines such as IL-8, IL-6 and IL-1 β (16). A study with mice showed that TLR1 and TLR2 deficiency interfere with epithelial homeostasis, increase the intestinal inflammatory reaction and the growth of *C. albicans* colonies in a model of induced acute colitis (17)

The contribution of TLR2 to TLR1 function may be associated with the distribution of polymorphic variants in distinct populations, which may result in significant differences (18). For example, no association of candidemia with SNPs of the *TLR2*, *TLR4*, *TLR6* and *TLR9* genes was observed in a study of Caucasian and African-American individuals in the USA. However, an association with rs4833095 (S248N), rs5743618 (I602S) and rs5743611 (R80T) polymorphisms of *TLR1* has been demonstrated only in Caucasian patients (2).

In Brazil, a study verified the influence of miscegenation on the distribution of 24 polymorphisms in *TLR* genes in 195 individuals from the southeast of the country (19). The authors demonstrated a predominantly European ancestry (63%) followed by African (22%). In addition, the variant allele of rs5743611 occurs in haplotypes with other variants of SNPs at high frequency in Europe, with moderate frequency in the Middle East, and with low frequency in the other populations (20).

In conclusion, the genetic composition inherited from Africans during the miscegenation of the populations analyzed in this study may have contributed significantly to the relatively low distribution of the rs5476311SNP variant allele, associated with susceptibility to candidemia in studies with Caucasians. In addition, polymorphisms in other genes, such as *TLR2*, may influence the role of *TLR1* in this infection. Future studies with a greater number of samples and other polymorphisms in Brazil may contribute to elucidate the role of these receptors in the susceptibility to candidemia.

ACKNOWLEDGEMENTS

Fundação de Amparo a Pesquisa de Pernambuco (FACEPE), for the financial support to this research

REFERENCES

1. Lamoth F, Lockhart SR, Berkow EL, Calandra T. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(April):i4–13.
2. Plantinga TS, Johnson MD, Scott WK, Van De Vosse E, Velez Edwards DR, Smith PB, et al. Toll-like receptor 1 polymorphisms increase susceptibility to candidemia. *J Infect Dis.* 2012;205(6):934–43.
3. McCarty TP, Pappas PG. Invasive Candidiasis. *Infect Dis Clin North Am* [Internet]. 2016;30(1):103–24. Available at: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1315399>
4. Davidson L, Netea MG, Kullberg BJ. Patient Susceptibility to Candidiasis—A

- Potential for Adjunctive Immunotherapy. *J Fungi* [Internet]. 2018;4(1):9. Available at: <http://www.mdpi.com/2309-608X/4/1/9>
5. Pierik M, Joossens S, Van Steen K, Van Schuerbeek N, Vlietinck R, Rutgeerts P, et al. Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12(1):1–8.
 6. Kesh S, Mensah NY, Peterlongo P, Jaffe D, Hsu K, VAN DEN Brink M, et al. TLR1 and TLR6 polymorphisms are associated with susceptibility to invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1062:95–103.
 7. Fredricks DN, Smith C, Meier A. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *J Clin Microbiol*. 2005;43(10):5122–8.
 8. Li YL, Leaw SN, Chen JH, Chang HC, Chang TC. Rapid Identification of Yeasts Commonly Found in Positive Blood Cultures by Amplification of the Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003;22(11):693–6.
 9. Wakamiya N, Suzuki Y. Molecular cloning of CL-P1 gene. Vol. 73, Seikagaku. 2001. 205-208 p.
 10. Breda GL, Tuon FF, Meis JF, Herkert PF, Hagen F, de Oliveira LZ, et al. Breakthrough candidemia after the introduction of broad spectrum antifungal agents: A 5-year retrospective study. *Med Mycol* [Internet]. 2017;(January):1–10. Available at: <https://academic.oup.com/mmy/advance-article/doi/10.1093/mmy/myx077/4372444>
 11. Vasilyeva N V., Raush ER, Rudneva M V., Bogomolova TS, Taraskina AE, Fang Y, et al. Etiology of invasive candidosis agents in Russia: a multicenter epidemiological survey. *Front Med*. 2018;12(1):84–91.
 12. Li C, Wang H, Yin M, Han H, Yue J-F, Zhang F, et al. The Differences in the Epidemiology and Predictors of Death between Candidemia Acquired in Intensive Care Units and Other Hospital Settings. *Intern Med* [Internet]. 2015;54(23):3009–16. Available at: https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/54/23/54_54.3744/_article
 13. Chakrabarti A, Sood P, Rudramurthy SM, Chen S, Kaur H, Capoor M, et al. Incidence, characteristics and outcome of ICU-acquired candidemia in India. *Intensive Care Med*. 2014;41(2):285–95.
 14. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, et al. Cutting Edge: Role of Toll-Like Receptor 1 in Mediating Immune Response to Microbial Lipoproteins. *J Immunol* [Internet]. 2002;169(1):10–4. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.169.1.10>

15. Gil ML, Murciano C, Yanez A, Gozalbo D, Interdisciplinar I, Biotecmed ERI, et al. Role of Toll-like receptors in systemic *Candida albicans* infections Burjassot , Spain , 3 Board of Governors Regenerative Medicine Institute and Research Division of. 2016;278–302.
16. Noreen M, Arshad M. Association of TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, and TIRAP polymorphisms with disease susceptibility. *Immunol Res.* 2015;62(2):234–52.
17. Choteau L, Vancraeynest H, Le Roy D, Dubuquoy L, Romani L, Jouault T, et al. Role of TLR1, TLR2 and TLR6 in the modulation of intestinal inflammation and *Candida albicans* elimination. *Gut Pathog.* 2017;9(1):1–13.
18. Barreiro LB, Ben-Ali M, Quach H, Laval G, Patin E, Pickrell JK, et al. Evolutionary dynamics of human toll-like receptors and their different contributions to host defense. *PLoS Genet.* 2009;5(7).
19. Guimarães LO, Bajay MM, Monteiro EF, Wunderlich G, Santos SE, Kirchgatter K. Genetic ancestry effects on the distribution of toll-like receptors (TLRs) gene polymorphisms in a population of the Atlantic Forest, São Paulo, Brazil. *Hum Immunol [Internet].* 2018;79(2):101–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2017.11.007>
20. Heffelfinger C, Pakstis AJ, Speed WC, Clark AP, Haigh E, Fang R, et al. Haplotype structure and positive selection at TLR1. *Eur J Hum Genet [Internet].* 2014;22(4):551–7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2013.194>