

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS  
APLICADAS À FARMÁCIA

PEDRINA GONÇALVES VIDIGAL

Contribuição laboratorial para a diferenciação entre colonização e  
infecção por leveduras em pacientes hospitalizados

Maringá  
2009

PEDRINA GONÇALVES VIDIGAL

Contribuição laboratorial para a diferenciação entre colonização e  
infecção por leveduras em pacientes hospitalizados

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Terezinha Inez Estivalet Svidzinski

Co-Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eliana Valéria Patussi

Maringá  
2009

# FOLHA DE APROVAÇÃO

PEDRINA GONÇALVES VIDIGAL

Contribuição laboratorial para a diferenciação entre colonização e infecção por leveduras em pacientes hospitalizados

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

## COMISSÃO JULGADORA

Profa. Dra. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski  
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Profa. Dra. Lilian Cristiane Baeza  
Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Márcia Edilaine Lopes Consolaro  
Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira  
Universidade Federal de Grande Dourados

Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra  
Universidade do Oeste do Paraná

Aprovada em: 14 de setembro de 2009

Local de defesa: Sala 05, Bloco J-90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

## DEDICATÓRIA

A Deus.

Aos meus pais, Maria Celeste e Pedro.

Aos meus irmãos, Andressa e Vinícius.

Ao meu namorado, Sebastian.

Aos meus amigos e todos que contribuíram para a realização deste trabalho...

Dedico...

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me possibilitou alcançar este importante objetivo.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, pela oportunidade de realizar este curso.

À professora doutora Terezinha Inez Estivalet Svidzinski, pela orientação, apoio e, acima de tudo, pela amizade e confiança.

À doutora Eliana Valéria Patussi pela Co-orientação e pela colaboração na execução deste trabalho.

À professora doutora Maria Aparecida Fernandez e toda a sua equipe do Laboratório de Biologia Molecular, Estrutural e Funcional do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da Universidade Estadual de Maringá, pela orientação e pelo auxílio prestado durante a realização dos experimentos.

À equipe do Laboratório de Micologia da Universidade Estadual de Maringá, pela colaboração, pelos ensinamentos compartilhados durante este período.

A secretária Luciane do Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, pelo apoio e pela amizade durante o curso.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, em especial à Dayanne, ao Leandro, à Luciene e à Marcinha, pela agradável convivência e pelo companheirismo.

À minha família e aos meus amigos, pelo estímulo e pela dedicação.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## EPÍGRAFE

A vida é mais simples do que a gente pensa, basta  
aceitar o impossível, dispensar o indispensável,  
e suportar o intolerável.  
(KATHLEEN NORRIS)

## Contribuição laboratorial para a diferenciação entre colonização e infecção por leveduras em pacientes hospitalizados

### RESUMO

O início da década de 1980 foi marcado pela emergência das infecções fúngicas hospitalares, principalmente em pacientes imunocomprometidos, resultando em graves problemas de saúde. As leveduras do gênero *Candida* estão entre os principais agentes desse cenário. Entretanto, as espécies não-*albicans* surgem não só como colonizadores, mas como patógenos responsáveis por graves infecções. Em adição, os tratos urinário (TU) e respiratório (TR) são sítios anatômicos colonizados por esses microrganismos, os quais também são susceptíveis a infecções, podendo haver disseminação hematogênica. Contudo, ainda existem controvérsias sobre a conduta mediante um achado laboratorial de leveduras nas amostras oriundas do TU ou do TR, visto que os critérios utilizados para o diagnóstico de micoses nesses sítios não estão bem estabelecidos. O objetivo deste trabalho foi comparar o perfil molecular de *C. tropicalis* isoladas a partir de amostras provenientes tanto do TU (urina e sangue), como TR (biópsia e tubo endotraqueal) de pacientes hospitalizados. Para tanto, DNA genômico destas amostras foram sequenciados, utilizando oligonucleotídeos que amplificaram as regiões ITS. Em seguida, as seqüências obtidas foram submetidas ao banco de dados do NCBI, sendo o alinhamento realizado com o software ClustalW2. Posteriormente, os resultados revelaram que as amostras do TU apresentavam um padrão genotípico idêntico entre si, assim como as do TR.

**Palavras-chave:** Candidemia. *Candida tropicalis*. Seqüenciamento de DNA. Trato urinário. Trato respiratório.

# Laboratorial contribution for differentiation between colonisation and infection caused by yeast in hospitalized patients

## ABSTRACT

The beginning of 80s has been noticeable by hospital fungal infections, mainly in immunocompromised patients, resulting in serious health problems. Yeasts from *Candida* genera are among the most important agents from this scenario, and especially non-*albicans* species emerge not only as colonizers, but also as pathogens responsible by severe infections. The urinary tract (UT) and respiratory tract (RT) are anatomical sites colonized by these microorganisms, which are also susceptible to infections that could disseminate to bloodstream. Nowadays, yet there are some controversies about the medical action towards yeast laboratorial finding in urine or pulmonary samples, once these criteria utilized for mycoses diagnosis in these sites are still not clear and well established. The objective of this work was to compare the molecular profile of *C. tropicalis* isolated in samples from UT (urine and blood), and in RT (biopsy and endotracheal tube) as well, from hospitalized patients. Thus, the genomic DNA from these samples was sequenced, using oligonucleotides that amplified ITS regions. After that, the obtained sequences were submitted to data bank of NCBI, and alignment performed by using ClustalW2 software. Therefore, the results revealed that the samples from UT presented an identical genetic pattern between themselves, as well as the RT ones.

**Keywords:** Candidaemia. *Candida tropicalis*. DNA sequencing. Urinary tract. Respiratory tract.



Dissertação elaborada e formatada  
conforme as normas das publicações  
científicas: *Journal of Clinical  
Laboratory Analysis* (artigo 1)

Disponível em:

<<http://mc.manuscriptcentral.com/jcl>>

e *New Microbiologia*. (artigo 2)

Disponível em: <[microbiologica.net/](http://microbiologica.net/)>

## SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I.....	11
1.1	A Infecção hospitalar e o envolvimento das leveduras.....	11
1.2	Vias de acesso à candidemia.....	16
1.3	Cenário microbiológico das espécies do gênero <i>Candida</i> .....	19
1.4	Diagnóstico laboratorial para detecção de leveduras.....	20
1.5	Justificativa.....	23
1.6	Objetivos.....	24
1.7	Referências.....	24
2	CAPÍTULO II.....	35
2.1	Could urinary tract infection caused by <i>C. tropicalis</i> evolve to a haematogenous infection?.....	36
2.2	The hidden threats of <i>Candida</i> spp. to the respiratory tract.....	55
3	CAPÍTULO III.....	59
3.1	Conclusões.....	59
3.2	Perspectivas Futuras.....	60

## CAPÍTULO I

### A INFECCÃO HOSPITALAR E O ENVOLVIMENTO DAS LEVEDURAS

Infecção hospitalar (IH) consiste numa das mais freqüentes e importantes complicações nos pacientes submetidos à hospitalização. Segundo a instituição americana *Center of Diseases Control* (CDC), a IH é definida como uma infecção localizada ou sistêmica, a qual não existia no momento da admissão do paciente no hospital. Portanto, é conseqüência de uma reação adversa devido à presença de um agente infeccioso ou à produção de suas toxinas (GARNER et al., 1996).

As IHS ocorrem no mundo todo, acometendo tanto os países desenvolvidos como os emergentes, e representam importante papel no âmbito da saúde pública. Portanto, constituem uma das principais causas de morte e de aumento da morbidade em pacientes hospitalizados, resultando assim, em consideráveis gastos econômicos (PONCE-DE-LEON, 1991; WENZEL, 1995; PLOWMAN et al., 1999).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), em estudo envolvendo 47 hospitais, originários de 14 países, representando quatro continentes do mundo, revelou que 3 a 21% dos pacientes hospitalizados apresentaram IH. Adicionalmente, os maiores índices de infecções nosocomiais foram observados na Unidade de Tratamento Intensivo - UTI (MAYON-WHITE et al., 1988).

Klevens et al. (2002) conduziram um estudo nos Estados Unidos e evidenciaram que o número de infecções nosocomiais foi de aproximadamente 1,7 milhões, com 98.987 óbitos atribuídos à IH.

No Brasil, as estimativas prevêm que aproximadamente 5 a 15% dos pacientes, durante o período de internação, contraem algum tipo de infecção hospitalar (MACHADO et al., 2001).

Até a década de 1970, infecções sistêmicas por leveduras eram consideradas raras; as leveduras não estavam entre os agentes etiológicos mais isolados em hospitais. A partir desse momento houve importante aumento da incidência e freqüência de IHS por leveduras. Espécies de *Candida* estão sendo consideradas como a quarta causa de infecções nosocomiais sistêmicas, representam sérios problemas, além da alta taxa de mortalidade, e de questões econômicas, pelo aumento do tempo de hospitalização e, conseqüentemente, aumento dos custos com tratamento do paciente (KRCMERY e BARNES, 2002; EGGIMANN et al., 2003).

Já no início da década de 1980, as infecções fúngicas emergiam como as principais causas de IHS, principalmente em pacientes imunocomprometidos ou aqueles que se encontravam hospitalizados por longos períodos devido a sérias doenças de base (VAZQUEZ et al., 1993; PAULA et al., 2007).

As espécies de *Candida* compõem a microbiota de indivíduos saudáveis, e podem encontrar-se amplamente disseminadas no meio ambiente. Usualmente, acredita-se que a maioria das pessoas apresenta uma única cepa em diferentes locais do corpo por um longo período. Entretanto, há alguns indivíduos que possuem mais de uma cepa ou espécies ao mesmo tempo, sendo este fato comumente observado em pacientes hospitalizados (ODDS, 1987; KLOTZ et al., 2007).

Por outro lado, *Candida* spp devem ser valorizadas, em virtude do potencial de se tornarem patógenos. Um componente crucial desta versatilidade é justamente o fato delas sobreviverem como comensais em diversos e distintos sítios anatômicos, cada uma com seus estresses ambientais particulares (CALDERONE e FONZI, 2001).

Vários fatores de virulência produzidos por esses microrganismos promovem o êxito da colonização ou da infecção invasiva dos tecidos do hospedeiro. Portanto, os fatores mais investigados são aqueles relacionados à parede celular, à adesão, e à produção de enzimas extracelulares proteolíticas. Em primeiro lugar, porque a parede celular propicia o crescimento do patógeno, por meio dos receptores de ligação presentes na superfície, os quais propiciam a colonização das células, bem como dos tecidos do hospedeiro. Em segundo lugar, porque as enzimas proteolíticas estão envolvidas no processo de penetração do patógeno; enquanto que as biomoléculas, neste caso as adesinas, conferem a capacidade patogênica de aderência às superfícies de mucosa, podendo resultar em colonização e infecção dos tecidos do hospedeiro (CALDERONE e BRAWN, 1991; CALDERONE e FONZI, 2001; WHITEWAY e OBERHOLZER, 2004).

Em geral, os fungos patogênicos possuem a capacidade de superar as expectativas do sistema imunológico do hospedeiro. Vários mecanismos de defesa compartilhados são efetivos no combate aos fungos, dentre eles a produção ou liberação de oxigênio reativo e peptídeos antimicrobianos; a co-estimulação de moléculas que estimulam a secreção de citocinas para desencadear a resposta imune; e o recrutamento de células efetoras para os locais de infecção através da ação de sinais inflamatórios, como a presença de citocinas, quimiocinas e componentes do sistema

complemento (SHOHAM e LEVITZ, 2005). Desta forma, neutrófilos, macrófagos e monócitos são fundamentais células efectoras antifúngicas.

Embora, *Candida albicans* possa infectar diversos sítios anatômicos do hospedeiro humano, há indícios de que a proteção imune seja do tipo sítio-específico. A candidíase orofaríngea tem como fator de proteção as respostas imunes promovidas pela célula T. Por outro lado, candidíase cutânea e infecções vaginais provavelmente estejam associadas à resposta fagocítica, envolvendo os neutrófilos e os fagócitos mononucleares (CALDERONE e FONZI, 2001).

Atualmente, nos Estados Unidos as espécies do gênero *Candida* são, em geral, associadas à infecção nosocomial de corrente sanguínea (WEY et al., 1988; JARVIS, 1995; EDMOND et al., 1999). A estimativa anual da incidência de candidemia é de 6 a 10 episódios para cada 100.000 pessoas (MORGAN, 2005; PFALLER e DIEKEMA, 2007).

No entanto, a estimativa da incidência de candidemia varia entre os países. A Finlândia detectou uma incidência de 1,9 casos para cada 100.000 pacientes hospitalizados ao ano (POIKONEN et al., 2003). Por sua vez, na Dinamarca, observou-se a mais elevada incidência: 11 casos para cada 100.000 pacientes hospitalares ao ano (ARENDRUP et al., 2005).

A incidência da candidemia nosocomial foi estimada em 7,6 para cada 10.000 liberações do hospital. Sendo que grande parte dos casos de candidemia hospitalar foi diagnosticada na UTI cirúrgica (CHENG et al., 2006).

Estudo realizado no norte de Taiwan detectou que as *Candida* spp. são os principais patógenos de IHS da corrente sanguínea (HSUEH et al., 2002).

De acordo com *Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance* (SCOPE), num estudo realizado durante o período de 1995 a 2002, constatou-se que *Candida* spp. foram a quarta causa mais comum de infecções nosocomiais de corrente sanguínea, correspondendo a 9% dessas infecções. A incidência de candidemia é mais elevada em UTIs; nesta unidade, candidemia é associada a 10,1% das infecções sanguíneas, enquanto a relação na enfermaria foi de 7,9% (WISPLINGHOFF et al., 2004).

Em 2005, na Itália, um estudo também corroborou que a frequência da candidemia é maior em UTIs, quando comparada aos centros cirúrgicos ou às enfermarias (LUZZATI et al., 2005). Os índices apresentados foram de 15,8/10.000

pacientes/dias em UTIs, enquanto que para a enfermaria e para os centros cirúrgicos foram estimados em 0,15/10.000 e 0,69/10.000 pacientes/ dias, respectivamente.

Diante disso, fica evidente que a candidemia hospitalar implica em elevados índices de morbidade e de mortalidade. Gudlaugsoon et al. (2003), reavaliando a mortalidade decorrente da candidemia hospitalar 15 anos após um estudo retrospectivo, demonstraram que a mortalidade bruta foi de 61%, considerando uma mortalidade atribuída equivalente a 49%, quando comparado com o grupo controle.

Falagas et al. (2006) também concluíram a existência de um considerável grau de associação entre a candidemia e a mortalidade atribuída. Segundo os autores, o óbito não pode ser relacionado somente a presença de outras comorbidades.

Entretanto, Pfaller e Diekema (2007), avaliando a taxa de mortalidade durante o período de 1991 a 2003, presenciaram um discreto decréscimo associado à candidemia ao longo deste tempo.

Uma vez que a candidemia está relacionada com longo período de permanência em UTIs, implica em aumento considerável no custo de manutenção deste paciente. Estima-se que nos Estados Unidos os gastos com tratamentos sejam de dois a quatro bilhões de dólares anuais (WILSON et al., 2002). De acordo com Olaechea et al. (2004), tanto a colonização quanto a infecção causadas por *Candida* spp. demandam grande impacto econômico, devido a longo período em UTI e no próprio hospital. Segundo os mesmos autores, os pacientes que foram liberados do hospital devido à colonização e à infecção por *Candida* spp., resultaram num impacto econômico de €12.908,00 e €21.075, respectivamente.

Os aspectos clínicos da candidemia não são específicos. Segundo Aquino et al. (2005), o principal sintoma clínico observado foi febre (87%), enquanto foram detectadas especificamente lesões cutâneas e oculares em 13,1% e 3,9% dos pacientes, respectivamente. Já em outro estudo realizado, os sintomas mais frequentes foram febre com rigidez, taquicardia e hipotensão (BREGENZER et al., 1996).

No entanto, na prática clínica, há alguns relatos sobre o envolvimento de diferentes órgãos em casos de candidemia, tais como o sistema nervoso central (SNC), o qual apresenta elevada frequência em neonatos prematuros; o coração, desencadeando na infecção do tecido endocárdico; as articulações, principalmente as maiores, comumente mais observado em crianças; e raramente o fígado e o baço (DIGNANI et al., 2003).

A candidemia prolongada é grave, precisa ser tratada adequadamente e é confirmada por hemoculturas positivas que sugerem a presença de foco ou fonte persistente, como o catéter venoso central (CVC), abscessos, tromboflebite; endocardite (WINGARD, 1995).

Em geral, os fatores de risco para os episódios de candidemia são neutropenia severa; cirurgia prévia; insuficiência renal aguda (IRA); nutrição parenteral; e o uso de instrumentação invasiva - como o CVC (MASCHMEYER, 2006; BASSETTI et al., 2007; CHOW et al., 2008). Entretanto, a análise multivariada evidenciou em estudo que o tempo de hospitalização, a presença de CVC, bem como os episódios de bacteremia, o tratamento de nutrição parenteral e a insuficiência renal aguda, são variáveis independentes associadas com o desenvolvimento de sepse por espécies de *Candida* (BASSETTI et al., 2007).

Por outro lado, Chow et al. (2008) mostraram que além desses riscos, o número de dias de hemodiálise, assim como cirurgias prévias, também constitui importante variável associada à candidemia causada não só por *Candida albicans*, mas também pelas outras espécies deste gênero. Segundo esses autores, o número de dias com ventilação mecânica e número de dias com CVC foram altamente correlacionadas.

Tumbarello et al. (2007) detectaram que os fatores de riscos mais comuns estavam correlacionados com comorbidades, como câncer em órgão sólido (40,1%), seguida do diabetes mellitus (DM) (19,7%) e das doenças hepáticas (10,2%). Os autores destacaram, ainda, o emprego da terapia antifúngica inadequada e a habilidade de formação de biofilme pelas espécies de *Candida*, como fortemente associados à elevada mortalidade nestes pacientes.

Outros fatores atuam na indução de imunossupressão, assim como a utilização de corticosteróides, de imunomoduladores; a quimioterapia; a desnutrição; a condição de malignidade e o quadro de neutropenia; queimaduras também favorecem o desenvolvimento de infecção fúngica (FRIDKIN e JARVIS, 1996).

Além disso, instrumentos médicos como as próteses, os implantes, as sondas, os tubos endotraqueais, os marca-passos cardíacos e os diversos tipos de catéteres, têm revelado capacidade de auxiliar no processo de colonização e na formação de biofilmes (RAMAGE et al., 2005). Biofilmes formados nestes instrumentos exercem a função de reservatório ou de fonte de leveduras para futuras infecções contínuas. Devido à organização estruturada e à fixação destes microorganismos em matriz de

material extracelular, pode gerar um impacto negativo sobre o paciente, acarretando insuficiência dos mesmos (DOUGLAS, 2002; RAMAGE et al., 2005).

A infecção fúngica invasiva consiste no aumento da biomassa do patógeno, o qual coloniza determinado sítio anatômico. Portanto, a infecção se agrava à medida que este patógeno se dissemina do local inicial da colonização, promovendo a sua penetração em barreiras defensivas do hospedeiro. Conseqüentemente, ocorrem danos tissulares, e casualmente, desencadeia-se um processo sistêmico (MAGRYS et al., 2005).

Entretanto, para ser considerada infecção, o caso requer pelo menos uma dessas características: a documentação de hemocultura positiva com confirmação do crescimento de *Candida* spp.; a verificação oftalmológica com endoftalmite em paciente que apresente quadro de sepse; o isolamento de *Candida* spp. de amostras biológicas significativas (líquido pleural, líquido ascítico, líquido pericárdico) ou provenientes da cavidade abdominal após ato cirúrgico (OLAECHEA et al., 2004).

Segundo alguns pesquisadores, grande parte das candidemias é originalmente endógena, sendo, portanto adquiridas pela colonização prévia de locais anatômicos que atuam como reservatórios, tais como a cavidade oral, o trato gastrointestinal (TGI), a vagina ou a pele. No entanto, há também indícios de que as infecções exógenas e as infecções cruzadas decorrentes da má-higienização das mãos de profissionais da área médica possam ocorrer (AHMAD et al., 2003; KHAN et al., 2003; TIRABOSCHI et al., 2007). A transmissão de um paciente infectado para outro pode ocorrer em curto espaço de tempo, entretanto, as cepas de *C. albicans* podem sobreviver e resistir por um longo período fora do organismo (RODERO et al., 2000).

## **VIAS DE ACESSO À CANDIDEMIA**

O trato urinário (TU) consiste no sítio anatômico mais propício para o desenvolvimento de infecções em pacientes hospitalizados, embora ainda permaneça como um problema de duvidosa significância (SCHABERG et al., 1991; GULER et al., 2006). Ainda que a maioria dessas infecções seja de origem bacteriana, estima-se que pelo menos 10% delas tenham como principal agente etiológico os fungos, sendo as espécies do gênero *Candida* as mais isoladas (RIVETT et al., 1986; SOBEL et al.,



2000). Há dados que evidenciam o isolamento de *Candida* em 22% das amostras de urina proveniente de pacientes admitidos em UTIs (ALVAREZ-LERMA et al., 2003).

As últimas duas décadas foram marcadas pelo aumento das infecções fúngicas nosocomiais do TU, possivelmente devido aos vários fatores predisponentes, os quais são relacionados à ocorrência de candidúria (SOBEL, 2002).

O termo candidúria pode ser expresso como o crescimento de leveduras do gênero *Candida* em culturas de urina, coletadas por meio de técnicas adequadas (COLOMBO e GUIMARÃES, 2007).

A recuperação de *Candida* spp. em amostras de urina expõe os clínicos a um grande desafio em virtude da amplitude de possibilidades clínicas. Dentre elas, destacam-se a pielonefrite; a cistite; a ocorrência de uma propagação hematogênica a partir do córtex renal, favorecendo assim, o curso da candidíase disseminada assintomática ou sintomática; e, por fim, fato este mais provável, a colonização de sítios anatômicos como a bexiga e o períneo, ou ainda a presença de um catéter urinário. Portanto, nem a presença de sintomas e sinais de infecção, ou ainda a contagem de colônias na urina fornecem subsídios suficientes para a interpretação da importância clínica da candidúria (LUNDSTROM e SOBEL, 2001; KAUFFMAN, 2005).

O curso natural da candidúria ainda não está claramente estabelecido. Por outro lado, a colonização do TU deve ser observada e acompanhada com mais atenção, uma vez que é considerada um evento comum em pacientes hospitalizados (NUCCI et al., 1998).

Os fatores de riscos associados com candidúria usualmente referem-se à administração de antibióticos; à terapia imunossupressiva; aos procedimentos cirúrgicos prévios; à idade avançada; ao sexo feminino; ao longo período de hospitalização; às comorbidades, em especial o DM; e à utilização de instrumentos urinários invasivos, tais como catéteres (LUNDSTROM e SOBEL, 2001; BUKHARY, 2008). A análise de regressão logística multivariada comprovou que o uso de antibióticos e o nível de glicose superior a 180mg/dL isoladamente já são parâmetros associados à candidúria (PAUL et al., 2007).

A primeira linha de defesa do corpo humano consiste nas barreiras mecânicas, como a pele e o epitélio das mucosas. A barreira física do trato respiratório (TR) superior é o epitélio, o qual é responsável pela incorporação dos potenciais patógenos em um muco e, a sua conseqüente eliminação. Entretanto, uma segunda linha de

defesa é exigida quando essa mucosa perde a sua integridade, promovendo não só a realização de ações não-específicas, como também a ativação do sistema imune. Portanto, uma modificação em quaisquer mecanismos de defesa permite que patógenos oportunistas possam infectar o corpo (FORREST e WEED, 1998).

Castellani *apud* Morin et al. (1951) foi o primeiro a descrever uma afecção broncopulmonar em trabalhadores de chá provenientes da região Ceylon. A partir da administração do pó de chá no TR superior em roedores “cobaias” (*Cavia porcellus*) durante vários meses, o autor os induziu às lesões pulmonares extensivas semelhantes àquelas isoladas nos trabalhadores.

A colonização do TR, desencadeada pelas espécies do gênero *Candida*, é comum em pacientes que utilizam a ventilação-mecânica (VM) por um período superior a dois dias. Isto ocorre em virtude da disseminação hematogênica pulmonar; ou pela aspiração de conteúdos colonizados de origem orofaríngea ou gástrica (MURRAY et al., 1977). É importante, também, o período prolongado de permanência na UTI, bem como de internação (AZOULAY et al., 2006).

Além disso, Delisle et al. (2008) demonstraram, a partir da análise de regressão, que há uma associação significativa entre a colonização do trato respiratório por *Candida* com a mortalidade hospitalar.

Freqüentemente, *Candida* spp. são encontradas no escarro e nos aspirados dos tubos de secreção endotraqueal, embora o envolvimento desses agentes infecciosos na causa de doenças ainda permaneça um dilema clínico. A infecção por *Candida* é confirmada histopatologicamente, e a invasão pulmonar usualmente não apresenta significância clínica comum. Em alguns casos de envolvimento pulmonar extensivo, a pneumonite ocorre comumente em pacientes terminais (DISMUKES et al., 2003).

Rotter e Staib (1958) realizaram um estudo sobre pneumonia causada por *C. tropicalis*, abordando os aspectos clínicos bem como o tratamento. Já na década de 1960, os estudos sobre candidíase pulmonar limitaram-se a poucos, como os conduzidos em países como a Itália, a Alemanha e a Espanha, respectivamente (BIDER e FIORA, 1965; SCHOCHY, 1966; LAMPE, 1967; KAUR et al., 1969).

Masur et al. (1977), num período de dois anos, avaliaram 30 pacientes provenientes do Memorial Hospital e New York Hospital, os quais apresentavam evidências histológicas de infecção pulmonar desencadeada por *Candida*. Os autores concluíram que aproximadamente 33% das infecções atingiram os pulmões por meio

da disseminação hematológica, enquanto que 54% foram pela aspiração. Além disso, observou-se que a maioria dos pacientes possuía doença neoplásica maligna.

Rose e Sheth (1978), verificando a correlação clínica e patológica da candidíase pulmonar, conduziram um estudo prospectivo num período de 13 anos. A candidíase pulmonar foi diagnosticada em 11 pacientes, dos quais nove apresentaram disseminação hematológica, enquanto dois revelaram pneumonia por aspiração. Adicionalmente, ressaltam que a candidíase pulmonar normalmente surge a partir da implantação de um foco infeccioso durante a disseminação hematológica. Os mesmos autores detectaram, ainda, que a utilização do catéter venoso constituiu a fonte para o desenvolvimento da candidemia em seis pacientes.

Estima-se que em pacientes que apresentam neoplasia, mais de 20% das infecções nosocomiais fúngicas sejam de origem pulmonar (JIANG et al., 2004).

Shen et al. (2005) avaliaram os fatores etiológicos, o diagnóstico e a terapia da infecção fúngica pulmonar relacionados com as doenças hematológicas. Os autores observaram, então, a presença de *C. albicans* em 71,42% dos casos estudados.

Xie et al. (2008) avaliaram o impacto da infecção fúngica invasiva (IFI) em pacientes cirúrgicos doentes com sepse severa. Os autores observaram que 28,3% dos pacientes avaliados apresentaram IFI, sendo a espécie *C. albicans* a mais isolada (58%), seguida por *C. tropicalis* (17%) e *C. glabrata* (15%). Em adição, também revelaram que o órgão mais acometido pela IFI foi o pulmão.

## **CENÁRIO MICROBIOLÓGICO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Candida***

Embora, *C. albicans* ainda permaneça como umas das espécies mais isoladas (PATEL et al., 2005), ultimamente nota-se a emergência de outras, como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii* (GALVAN e MARISCAL, 2006). Tumbarello et al. (2007), encontraram como isolados mais frequentes de candidemias as espécies: *C. tropicalis* (71,4%), *C. glabrata* (23,1%), *C. albicans* (22,6%), *C. parapsilosis* (21,8%). Acompanhando as alterações quanto às espécies, observam-se variações na susceptibilidade aos antifúngicos (anfotericina B e derivados azólicos). Conseqüentemente, este fato eleva as complicações para a escolha do tratamento a ser adotado inicialmente (KAO et al., 1999; RANGEL-FRAUSTO et al., 1999; VISCOLI et al., 1999; TRICK et al., 2002;

PAPPAS et al., 2003; WISHPLINGHOFF et al., 2004). As razões para essa inversão, em relação à distribuição das espécies, ainda não foram completamente esclarecidas.

Vários trabalhos conduzidos em diferentes hospitais brasileiros também detectaram uma mudança na distribuição dos agentes etiológicos nas IHS. Colombo et al. (1999) revelaram que dos 145 episódios de candidemias avaliados, apenas 37% foram desencadeadas por *C. albicans*, enquanto que os 63% restantes tiveram como agente causal espécies não-*albicans*. Em outro relato, as fungemias presenciadas em pacientes oncológicos tiveram como espécie mais freqüente a *C. tropicalis*, enquanto que *C. albicans* representou apenas 15% desses casos (NUCCI et al., 1998).

## DIAGNÓSTICO LABORATORIAL PARA DETECÇÃO DE LEVEDURAS

Um problema freqüente enfrentado por clínicos consiste em determinar quando a presença de candidúria representa, de fato, infecção do TU ou se simplesmente é uma colonização ou uma contaminação (AKALM et al., 2004). Desta forma, a distinção entre uma infecção autêntica e uma contaminação é complicada e ainda carece de critérios padronizados.

A contaminação da urina é um evento normal e ocorre especialmente em duas situações: quando a coleta não é adequada, freqüentemente em pacientes sob cateterização urinária, ou em mulheres, pela elevada colonização da região vulvovaginal (LUSTROM e SOBEL, 2001).

Atualmente, ainda não há metodologia fidedigna e segura para diferenciar colonização de infecção na presença de uma candidúria detectada em laboratório (BLOT et al., 2008). Para alguns, somente a simples presença de leveduras em uroculturas ou o exame direto já é suficiente para definir infecção (SELLAMI et al., 2006). No entanto, em alguns estudos a quantificação torna-se um dos critérios para a obtenção de tal definição, havendo ainda controvérsias para se estabelecer um valor-padrão. Alguns grupos de pesquisa acreditam que a contagem referente a 1.000 UFC/mL (VOSS et al., 1994; LEU e HUANG, 1995; KAUFFMAN et al., 2000; SOBEL, 2000) é satisfatória para o diagnóstico de candidúria, enquanto que para outros este valor pode ser igual ou superior a 10.000 UFC/mL (GUBBIS et al., 1993; JACOBS et al., 1996; ALVAREZ-LERMA et al., 2003).

No entanto, a infecção urinária pode ser caracterizada pela elevada colonização, a partir de uma contagem superior a 10.000 UFC/mL, demonstrando, no máximo a presença de duas espécies distintas. Além disso, alguns sintomas como a febre, a urgência miccional, a polaquiúria, a disúria ou a tensão na zona suprapúbica, também compõem o quadro clínico de infecção urinária por *Candida* spp. (GUBBIS et al., 1993).

O isolamento de *Candida* a partir de culturas de escarro, aspirados endotraqueais, amostras broncoscópicas, aspirados de punção percutânea do pulmão, ou até mesmo de tecido pulmonar pode representar somente colonização da árvore traqueobrônquica. Em adição, o valor de culturas quantitativas com amostras originárias do TR para o diagnóstico de pneumonia, em decorrência das espécies de *Candida*, ainda permanece desconhecido (EL-EBIARY et al., 1997).

Normalmente, as culturas resultantes de materiais como o sangue, o líquido cefalorraquidiano (LCR), o líquido sinovial, o abscesso coletado esterilmente, ou qualquer outro espécime cirúrgico estéril são consideradas representativas para o diagnóstico de candidíase (PATEL et al., 2005). A hemocultura ainda prevalece como padrão-ouro para o diagnóstico de candidemia. Entretanto, a sensibilidade deste exame é de somente 50 a 60%, o que pode propiciar um diagnóstico falso-negativo, e, conseqüentemente, resultar numa subestimação do impacto da mesma (ZAOUTIS et al., 2005; KLOTZ et al., 2007). Sendo assim, em várias ocasiões o médico clínico é forçado a conduzir um tratamento empírico com base nos fatores de riscos, e na suspeita clínica. Em virtude dessas e outras razões, ainda hoje, nem sempre é realizada a investigação laboratorial da candidemia, o que é lamentável, pois, em geral, as hemoculturas de amostras com *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* tornam-se positivas num período de um a dois dias (NODA et al., 1995; ANAISSIE et al., 2003). Assim sendo, considerando que a escolha inicial do tratamento antifúngico é de extrema importância, dados relacionados com a espécie e a susceptibilidade aos antifúngicos contribuiriam muito para a eficácia da terapia (PATEL et al., 2005).

De fato, os recursos laboratoriais atualmente disponíveis são limitados, visto que a sensibilidade das hemoculturas é baixa, embora seja inquestionável a sua capacidade de definir infecção. Além disso, atualmente não há protocolos padronizados que sejam reconhecidos e que possam oferecer subsídios capazes de prever precocemente o risco da presença de leveduras detectadas em amostras provenientes do TU ou do TR, mesmo considerado a probabilidade de uma

colonização evoluir em infecções de alta morbidade e mortalidade em determinados casos clínicos. Estudos prévios já haviam demonstrado a importância da colonização por *Candida*. Isto é elucidado pelo fato da patogênese da infecção, causada por este agente infeccioso, evoluir progressivamente a partir da colonização local, acarretando em uma ampla disseminação e, conseqüentemente, invasão (PITTET et al., 1994; RANGEL-FRAUSTO et al., 1999). Recentemente, Cheng et al. (2006) observaram que 79,5% dos casos de candidemia foram precedidos pela colonização, considerando que as taxas mais elevadas de colonização foram detectadas na urina (40%) e no CVC (35%).

Portanto, a caracterização da diversidade genética das leveduras *C. albicans* e não-*albicans* torna-se importante, em virtude do conhecimento da estrutura genética, que conseqüentemente, irá auxiliar a equipe médica a adotar a terapia mais adequada para cada paciente. Assim, a epidemiologia molecular pode também determinar se as infecções detectadas são recorrentes ou se houve recontaminação por outra cepa. Adicionalmente, os métodos de genotipagem são considerados importantes na identificação da fonte de contaminação, tais como os instrumentos invasivos, como o catéter; as mãos dos profissionais que trabalham em hospital; ou ainda os sítios endógenos do corpo (CHONG et al., 2006).

Os marcadores moleculares consistem em seqüências conservadas encontradas em todos os gêneros fúngicos que apresentam domínios e regiões variáveis que definem uma espécie, logo, sendo consideradas mais apropriadas para análises filogenéticas. As regiões denominadas como *Internal Transcribed Spacer* (ITS) referem-se a fragmentos de RNA não-funcional (GERBI, 1986), situado entre o RNA ribossomal estrutural no precursor do RNA mensageiro. Adicionalmente, a leitura desse precursor de RNAr policistrônico possui uma seqüência transcrita externa na extremidade 5' (5'ETS), 18S RNAr, ITS1, 5.8S RNAr, ITS2, 28S RNAr e finalmente a 3' ETS (HIBBETT, 1992).

Os genes que codificam o RNAr e os espaçadores ocorrem em uma série arranjada em *tandem* que consistem em múltiplas cópias (DUBOUZET e SHINODA, 1999). Cada uma é separada por regiões de DNA não-transcrito, chamadas de espaçador inter gênico não-transcrito (IGS) e espaçador não- transcrito (NTS).

Desta forma, a comparação das seqüências referente à região ITS é muito utilizada para estimar a variação e a distância genética entre diferentes espécies de microorganismos devido a fácil amplificação mesmo a partir de pouca quantidade de

DNA, bem como pela elevada variação entre espécies intimamente relacionadas (VILGALYS LAB, 2007).

Embora alguns profissionais da saúde apresentem a preocupação com as possíveis doenças fúngicas que possam estar presentes no ambiente hospitalar, esta realidade tanto em países emergentes como em países desenvolvidos ainda não foi bem estabelecida (WENZEL, 1995; PLOWMAN et al., 1999).

Um diagnóstico correto propiciará o tratamento adequado para o paciente, além de representar melhora no quadro das taxas de mortalidade decorrentes destas infecções. Portanto, a padronização de conduta tomada por clínicos e laboratoristas torna-se fundamental para a garantia do diagnóstico adequado, bem como da qualidade de vida de pacientes críticos, sendo indispensáveis os estudos que visem contribuir para a valorização dos quadros de colonização por leveduras. Desta forma, os mesmos poderão, em curto ou médio prazos, contribuir para a implantação de protocolos universais que proporcionem a rápida e eficiente tomada de decisões quanto ao manejo dos pacientes criticamente doentes.

## **JUSTIFICATIVA**

As infecções nosocomiais representam um importante papel no âmbito da saúde pública, tendo em vista que são muito frequentes tanto nos países desenvolvidos como nos emergentes. Constituem uma das principais causas de morte e de aumento da morbidade em pacientes hospitalizados, resultando assim, em consideráveis gastos econômicos.

Considerando o caráter do gênero *Candida* como habitante normal da mucosa, a confirmação de um processo infeccioso desencadeado por leveduras, ainda apresenta pontos a serem esclarecidos.

Desta forma, o estabelecimento do correto diagnóstico propiciará um tratamento adequado para a condição do paciente, além de representar uma melhora no quadro das taxas de mortalidade e morbidade decorrentes destas infecções.

## OBJETIVOS

### GERAL

Avaliar a contribuição da tecnologia molecular na diferenciação entre colonização e processo infeccioso desencadeados por leveduras em pacientes hospitalizados.

### ESPECÍFICOS

Comparar o perfil molecular de *C. tropicalis* isoladas a partir de amostras provenientes do trato urinário (urina e sangue) e respiratório (biópsia e tubo endotraqueal) de pacientes hospitalizados, através do seqüenciamento das regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*).

Realizar a análise das seqüências obtidas, em bancos de dados como o NCBI, utilizando a plataforma Blastn.

Alinhar as seqüências obtidas com bancos de dados públicos, usando o programa ClustalW2 (EMBL-EBI) para verificar a similaridade destas amostras, através da análise filogenética.

### Referências Bibliográficas

AHMAD, S. et al. Epidemiology of *Candida* colonization in an intensive care unit of teaching hospital in Kuwait. **Med. Mycol.**, v.41, p.487-493, 2003.

AKALM, H. et al. Persistent of candiduria in ICU catheterized patients is not linked to adherence and proteolytic activities of *Candida* strains. **Intes. Care Med.**, v.30, p.972-975, 2004.

ALVAREZ-LERMA, F. et al. Candiduria in critically ill patients admitted to intensive care medical units. **Care Med.**, v. 29, p. 1069-1076, 2003.

ANAISSE, E.; MCGINNIS, M.R.; PFALLER, M.A. *Clinical Mycology*. 1<sup>st</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Science, 2003. p.195-239.



AQUINO, V.R. et al. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in Southern Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 9, p.411-418, 2005.

ARENDROP, M.C. et al. Seminal surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p.4434-4440, 2005.

AZOULAY, E. et al. *Candida* colonization of the respiratory tract and subsequent Pseudomonas ventilator-associated pneumonia. **Chest**, v.129, p.110-117, 2006.

BASSETTI, M. et al. Incidence, risk factors, and predictors of outcome of candidemia. Survey in 2 Italian university hospitals. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.58, p.325-331, 2007.

BIDER, F.; FIORA, L. A case of pulmonary candidosis treated with amphotericin B. **Minerva Med.**, v.56, p.3364-3367, 1965.

BLOT, S. et al. Is *Candida* really a threat in the ICU? **Curr. Opin. Crit. Care**, v. 14, p. 601-604, 2008.

BREGENZER, T. et al. Clinical aspects of candidemia, a 6-year retrospective study. **Schweiz. Med. Wochenschr.**, v.126, p.1829-1833, 1996.

BUKHARY, Z.A. Candiduria: a review of clinical significance and management. **Saudi J. Kidney Dis. Transplant.**, v. 19, p. 350-360, 2008.

CALDERONE, R.A.; BRAUN, P.C. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. **Microbiol. Rev.**, v.55, p.1-20, 1991.

CALDERONE, R.A.; FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol.**, v.9, p.327-335, 2001.

CASTELLANI, A. Lancet, v.1, p. 13, 1912. Quoted by Langeron *apud* MORIN, J.E.; LEBLOND, S.; FISET, P. Bronchopulmonary candidosis. **Can. Med. Assoc. J.**, v. 65, p. 115-118, 1951.

CHENG, Y-R. et al. Risk factors for candidemia-related mortality at a medical Center in Taiwan. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v.39, p.155-161, 2006.

CHONG, P.P. et al. Recurrent candidaemia in a neonate with Hirschsprung's disease: fluconazole resistance and genetic relatedness of eight *Candida tropicalis* isolates. **J. Med. Microbiol.**, v.55, p.423-428, 2006.

CHOW, J.K. et al. Risk factors for albicans and non-*albicans* candidemia in the intensive care unit. **Crit. Care Med.**, v.36, p.1993-1998, 2008.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Candidúria: uma abordagem clínica e terapêutica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, p. 332-337, 2007.

COLOMBO, A.L. et al. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 34, p.281-286,1999.

DELISLE, M-S. et al. The clinical significance of *Candida* colonization of respiratory tract secretions in critically ill patients. **J. Crit. Care**, v.23, p.11-17, 2008.

DIGNANI, M.C.; SOLOMKIN, J.S.; ANAISSIE, E. *Candida*. In: Anaissie, E.; McGinnis M.R.; Pfaller, M.A. (eds). Medical Mycology. 1ª ed. Churchill Livingstone, Filadélfia, p. 195-239, 2003.

DISMUKES, W.E.; PAPPAS, P.G.; SOBEL, J.D. *Clinical Mycology*. United States, Oxford University Press, 2003. p.159.

DOUGLAS, L. J. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.19, p.139-143, 2002.

DUBOUZET, J.G.; SHINODA, K. Relationships among Old and New World alliums according to ITS DNA sequence analysis. **Theor. Appl. Genet.**, v.98, p.422–433, 1999.

EDMOND, M.B. et al. Nosocomial bloodstream infections in the United States hospitals: a three-year analysis. **Clin. Infect. Dis.**, v.29, p.239-244, 1999.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **Lancet Infect. Dis.**, v. 3, p. 685-702, 2003.

EL-EBIARY, M. et al. Significance of the isolation of *Candida* species from respiratory samples in critically ill, non-neutropenic patients. An Immediate postmortem histologic study. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.156, p. 583-590, 1997.

FALAGAS, M.E.; APOSTOLOU, K.E.; PAPPAS, V.D. Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case-control studies. **Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.**, v.25, p.419-425, 2006.

FORREST, L.A.; WEED, H. Candidalaryngitis appearing as leukoplakia and gerd. **J. Voice.**, v. 12, p. 91-95, 1998.

FRIDKIN, S.K.; JARVIS, W.R. Epidemiology of nosocomial fungal infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.9, p. 499-511, 1996.

GALVAN, B.; MARISCAL, F. Epidemiologia de la candidemia en UCI. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.23, p.12-15, 2006.

GARNER, J.S. et al. CDC definitions for nosocomial infections. In: Olmsted RN, ed.: APIC Infection Control and Applied Epidemiology: Principles and Practice. St. Louis: Mosby, 1996, pp.A1-A-20.

GERBI, S. A. 1986. Chapter 7 - Evolution of ribosomal DNA. Pp. 419-517 In: Molecular evolution, ed. McIntyre, R.

GUBBIS, P.O.; PISCITEKKI, S.C.; DANZIGER, L.H. Candidal urinary tract infections: a comprehensive review of their diagnosis and management. **Pharmacotherapy**, v. 13, p. 110-117, 1993.

GUDLAUGSOON, O. et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. **Clin. Infect. Dis.**, v.37, p.1172-1177, 2003.

GULER, S. et al. Risk factors for nosocomial candiduria. **Saudi Med. J.**, v. 27, p. 1706-1710, 2006.

HIBBETT, D.S. Ribosomal RNA and fungal systematics. **Trans. Mycol. Soc. Japan**, v.33, p.533-556, 1992.

HSUEH, P.R. et al. Antimicrobial drug resistance in pathogens causing nosocomial infections at a university hospital in Taiwan, 1981-1999. **Emerg. Infect. Dis.**, v.8, p63-68, 2002.

JACOBS, L.G. et al. Oral fluconazole compared with bladder irrigation with amphotericin B for treatment of fungal urinary tract infections in elderly patients. **Clin. Infect. Dis.**, v. 22, p. 30-35, 1996.

JARVIS, W.R. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. **Clin. Infect. Dis.**, v.20, p.1526-1530, 1995.

JIANG, Y. et al. Clinical analysis of nosocomial pulmonary fungal infection in patients with cancer. **Ai Zheng**, v.23, p. 1707-1709, 2004.

KAO, A.S. et al. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. **Clin. Infect. Dis.**, v.29, p.1164-1170, 1999.

KAUFFMAN, C.A. Candiduria. **Clin. Infect. Dis.**, v. 41, S371-S376, 2005.

KAUFFMAN, C.A. et al. Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 14-18, 2000.

KAUR, H.; CHUGH, T.D.; CHITKARA, N.L. Bronchopulmonary candidosis. **Indian J. Chest Dis.**, v.11, p.207-212, 1969.

KRCMERY, V.; BARNES, A.J. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **J. Hosp. Infect.**, v. 50, p. 243-260, 2002.

KHAN, Z.U.; CHANDY, R.; METWALI, K.E. *Candida albicans* strain carriage in patients and nursing staff of an intensive care unit: a study of morphotypes and resistotypes. **Mycoses**, v.46, p.479-486, 2003.

KLEVENS, R.M. et al. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals. **Public Health Rep.**, v.122, p.160- 166, 2002.

KLOTZ, S.A. et al. Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.59, p.401-406, 2007.

LAMPE, W. On the therapy of generalized candidiasis of both lungs. **Med. Welt.**, v.5, p. 282-286, 1967.

LEU, H.S.; HUANG, C.T. Clearance of funguria with short-course antifungal regimens: a prospective, randomized, controlled study. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, p. 1152-1157, 1995.

LUNDSTROM, T.; SOBEL, J. Nosocomial Candiduria: a review. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, p. 1602-1607, 2001.

LUZZATI, R. et al. Secular trends in nosocomial candidaemia in non-neutropenic patients in an Italian tertiary hospital. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.1, p.908-913, 2005.

MACHADO, A. et al. Prevenção da Infecção Hospitalar. In: Projeto Diretrizes: Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Agos. 2001.

MAGRYS, A. et al. The prognostic and diagnostic markers of invasive candidiasis in patients during chemotherapy. **Pol. J. of Microbiol.**, v.54, p.207-213, 2005.

MASCHMEYER, G. The changing epidemiology of invasive fungal infections: new threats. **Int. J. Antimicrob. Agents**, 27S, p. 3-6, 2006.

MASUR, H.; ROSEN, P.P.; ARMSTRONG, D. Pulmonary disease caused by *Candida* species. **Am. J. Med.**, v.63, p. 914-925, 1977.

MAYON-WHITE, R.T. et al. An international survey prevalence of hospital-acquired infection. **J. Hosp. Infect.**, 11; Suppl. A, p. 43-48, 1988.

MORGAN, J. Global trends in candidemia: review of reports from 1995-2005. **Curr. Infect. Dis. Rep.**, v.7, p.429-439, 2005.

MURRAY, P.R. VANSKOY, R.E.; ROBERTS, G.D. Should yeasts in respiratory secretions be identified? **Mayo Clin. Proc.**, v.52, p.42-45, 1977.

NODA, T. et al. Basic and clinical evaluation of lysis centrifugation in candidemia. **Kasenshogaku. Zassi.**, v.69, p. 145-150, 1995.

NUCCI, M. et al. Fungemia in cancer patients in Brazil: predominance of non-*albicans* species. **Mycopathologia**, v.141, p.65-68,1998.

ODDS, F.C. *Candida* infections: an overview. **Crit. Rev. Microbiol.**, v.32, p.123-129, 1987.

OLAECHEA, P.M. et al. Economic impact of *Candida* colonization and *Candida* infection in the critically ill patient. **Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.**, v.23, p.323-330, 2004.

PAPPAS, P.G. et al. A prospective observation study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. **Clin. Infect. Dis.**, v.37, p.634-643, 2003.

PATEL, M. et al. Initial management of candidemia at an academic medical center: evaluation of the ODSA guidelines. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.52, p.29-34, 2005.

PAUL, N. et al. Factors associated with candiduria and related mortality. **J. Infect.**, v. 55, p. 450-455, 2007.

PAULA, C.R. et al. Infecção hospitalar fúngica: experiência em hospitais públicos de São Paulo. **Prática hospitalar**, v.52, p.63-66, 2007.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.20, p.133-163, 2007.

PITTET, D. et al. *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill patients. **Ann. Surg.**, v.220, p.751-758, 1994.

PLOWMAN, R. et al. *The socio-economic burden of hospital-acquired infection*. London, Public Health Laboratory Service and the London School of Hygiene and Tropical Medicine, 1999.

POIKONEN, E. et al. Candidemia in Finland, 1995-1999. **Emerg. Infect. Dis.**, v.9, p.985-990, 2003.

PONCE-DE-LEON, S. The needs of developing countries and the resources required. **J. Hosp. Infect.**, v.18 (Supplement), p.376-381, 1991.

RAMAGE, G. et al. *Candida* biofilms: an update. **Eukaryotic Cell**, v.4, p.633-638, 2005.

RANGEL-FRAUSTO, M.S. et al. National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care unit. **Clin. Infect. Dis.**, v.28, p.253-258, 1999.

RIVETT, A.G.; PERRY, J.A.; COHEN, J. Urinary candidiasis: a prospective study in hospitalized patients. **Urol. Res.**, v. 14, p. 183-186, 1986.

RODERO, L. et al. Trasmisión nosocomial de *Candida albicans* en recién nacidos. **Ver. Argent. Microbiol.**, v.32, p.179-184, 2000.

ROSE, H.D.; SHETH, N.K. Pulmonary candidiasis. A clinical and pathological correlation. **Arch. Intern. Med.**, v.138, p.964-965, 1978.

ROTTER, W.; STAIB, F. *Candida tropicalis* pneumonia; treatment and course. **Dtsch. Med. Wochenschr.**, v.83, p.2285-2288, 1958.

SCHABERG, D.R. et al. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. **Am. J. Med.**, v. 91, suppl. 3B, p. 72-75, 1991.

SCHOCKY, S. Pulmonary candidiasis. **Med. Klin.**, v. 61, p. 492-497, 1966

SELLAMI, A. et al. La candidurie en miliey de réanimation:signification et intérêt de la numération des levares dans les urines. **Ann. Fr. Anesth. Reanim.**, v. 25, p. 584-588, 2006.

SHEN, Q. et al. Pulmonary fungal infection in malignant hematological diseases: an analysis of 14 cases. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi**, v.13, p. 1125-1127, 2005.

SHOHAM, S.; LEVITZ, S.M. The immune response to fungal infections. **Br. J. Haematol.**, v.129, p.569-582, 2005.



SOBEL, J.D. Controversies in the diagnosis of candiduria: What is the critical colony count? **Infect. Dis.**, v.4, p.81-83, 2002.

SOBEL, J.D. Practice guidelines for the treatment of fungal infections. For mycoses Study Group. Infectious diseases society of America. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 652, 2000.

SOBEL, J.D. et al. Candiduria: a randomized double-blind study of treatment with fluconazole and placebo. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 19-24, 2000.

THE FRENCH PREVALENCE SURVEY STUDY GROUP. Prevalence of nosocomial infections in France: results of the nationwide survey in 1996. **J. Hosp. Infect.**, v.46, p.186-193, 2000.

TIRABOSCHI, I.N. et al. Brote de candidemia por *Candida albicans* en neonatología. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.24, p. 263-267, 2007.

TRICK, W.E. et al. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989–1999. **Clin. Infect. Dis.**, v.35, p.627–630, 2002.

TUMBARELLO, M. et al. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. **J. Clin. Microbiol.**, v.45, p.1843-1850, 2007.

VAZQUEZ, J.A. et al. Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: an epidemiologic study. **J. Infect. Dis.**, v.168, p.195-201, 1993.

VILGALYS LAB. *Conserved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA*. Duke University. Disponível em: [www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm](http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm). Acesso em: 18 Jun 2007.

VISCOLI, C. et al. Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the invasive fungal infection group (IFIG) of the European

Organization for research and treatment of cancer (EORTC). **Clin. Infect. Dis.**, v.28, p.1071-1079, 1999.

VOSS, A.; MEIS, J.F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J.A. fluconazole in the management of fungal urinary tract infections. **Infection**, v. 22, p. 247-251, 1994.

XIE, G-H. et al. Impact of invasive fungal infection on outcomes of severe sepsis: a multicenter matched cohort study in critically ill surgical patients. **Critical Care**, v. 12, p. R5, 2008.

WENZEL, R.P. The economics of nosocomial infections. **J. Hosp. Infect.**, v.31, p.79-87,1995.

WEY, S.B. et al. Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. **Arch. Intern. Med.**, v.148, p.2642-2645, 1988.

WHITEWAY, M.; OBERHOLZER, U. *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.7, p.350-357, 2004.

WILSON, L.S. et al. The direct cost and incidence of systemic fungal infections. **Value Health**, v.5, p.26-34, 2002.

WINGARD, J.R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. **Clin. Infect. Dis.**, v.20, p.115-25, 1995.

WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clin. Infect. Dis.**, v.39, p.309-337, 2004.

ZAOUTIS, T.E. et al. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. **Clin. Infect. Dis.**, v.41, p.1232-1239, 2005.

## CAPÍTULO II

**Artigo: “Could urinary tract infection caused by *C. tropicalis* evolve to a haematogenous infection?”**

## **Could urinary tract infection caused by *C. tropicalis* evolve to a haematogenous infection?**

### **From candiduria to candidaemia.**

Pedrina Gonçalves Vidigal<sup>1</sup>, Simone Aparecida dos Santos<sup>2</sup>, Maria Aparecida Fernandez<sup>2</sup>, Eliana Valéria Patussi<sup>1</sup>, Hilton Vizi Martinez<sup>3</sup>, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Analysis, Universidade Estadual de Maringá, Brazil

<sup>2</sup> Department of Cell Biology, Universidade Estadual de Maringá, Brazil

<sup>3</sup> Hospital Universitário de Maringá, Universidade Estadual de Maringá, Brazil

Grant sponsor: Fundação Araucária

\* Corresponding author: Terezinha Inez Estivalet Svidzinski, Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, Av. Colombo, 5.790, 87020-900, Maringá – PR, Brazil.

Tel.: +55 44 3261-4809; fax: +55 44 3261 4860

*E-mail address:* terezinha@email.com

## Abstract

*Candida* spp. are usually found in normal microflora of human body, but they are might be considered opportunist pathogens. Currently, nosocomial fungal diseases had increased over the past decades. Even though, urinary tract is involved with disseminated infection processes, an adequate valorisation of yeast isolation from biological representative specimens remains controversial. We report a case of candiduria due to *Candida tropicalis*, which evolved to fatal candidaemia. DNA sequencing from collected urine and blood samples were done. Obtained sequences were submitted to data bank of NCBI and alignment conducted by using ClustalW2 software. In summary, *C. tropicalis* identified in samples, demonstrated an identical genotype pattern. This fact leads to a plausible hypothesis that yeasts previously present in the urinary tract evolved to haematogenous infection, causing the patient's death.

**Keywords:** Candiduria; colonisation; candidaemia; *Candida* spp.; DNA sequencing.

## Introduction

*Candida* species are opportunist pathogens, generally found in the microbiota of human body. Infections due to *C. albicans* and non-*C. albicans* species (NAS) had increased significantly over the past decade, becoming the main reason of nosocomial infections that result in serious health problems(1-3). The term candiduria refers to the growth of *Candida* sp in urine cultures collected through adequate techniques (4).

Annual incidence of nosocomial bloodstream infection in the United States is estimated in 6 to 7 episodes per 100,000 inhabitants (5). Besides, NAS, including *C. tropicalis*, are emerging as both colonisers and pathogens causing fungal bloodstream infections (6).

Urinary tract (UT) is one of the most propitious anatomical sites for the development of infections in hospitalized patients, even though it remains a problem with suspicious significance (7-8).

In the last two decades the increase of nosocomial infections of UT has been notable probably due to several predisponent factors, which are related to the occurrence of candiduria (9).

On the other hand, a common dilemma faced by clinicians consists on determining when the presence of candiduria represents in fact infection, colonisation or contamination (10). Hence, this distinction between an authentic infection and contamination is complex, once well established criteria to distinguish these two situations are not accessible.

Recently, *Candida* colonisation was investigated as possible source for candidaemia. However, in relation to *C. tropicalis* isolates, it was shown that

samples from blood and urine were indistinguishable (11). Candidaemia was strongly associated with candiduria, though microbiological data had not proven that urine was the source of *Candida* bloodstream infection (12).

The purpose of this work was to report a case of candiduria due to *C. tropicalis* that showed identical genotype pattern for the yeasts isolated from different anatomical sites (urine and blood), and consequently, evolved to a fatal candidaemia. In addition, factors related to this pathology were discussed as well.

## **Case report**

A 63 year-old male was presented to the emergency service of the Hospital Universitário de Maringá due to acute obstructive abdomen and enterorrhagia. This patient was submitted to a major abdomen surgery, being then transferred to the surgical clinic unit. Prior the hospitalisation, his current medical history included diagnosis of Diabetes mellitus and hypertension. Empirical treatment with antibiotics started immediately, in the first day of hospitalisation. Approximately 10 days after his major surgery, the patient underwent to other five successive surgeries of the gastrointestinal tract, and he was moved to the intensive care unit (ICU). After the second surgical procedure, cefepime, ciprofloxacin and vancomycin were administrated for a period of 10, 2 and 30 days, respectively. Urine sample was obtained under aseptic conditions to conduct quantitative uroculture in Cystine-Lactose-Eletrolyte Deficient agar, which resulted in exclusive development of yeast with a colony-forming unit CFU/mL counting superior to  $10^5$ . Then, confirmable urine culture was done from a sample collected 24h after

vesicular probe switching. Cultures from faeces and surgical material were negative to yeasts presence, but two blood samples were collected for haemocultures and were submitted to Bactec system. All haemocultures pointed out restricted development of yeasts; CHROMagar revealed colonies of steel blue colour, without the presence of germinative tube in animal serum, being then identified as *C. tropicalis* by the morphological, physiological and biochemical characteristics (13). Antifungal susceptibility test was carried out for both samples. Antifungal agents used were ketoconazole (Janssen Pharmaceutical, Beerse, Belgium), amphotericin B (Bristol – Myers Squibb, Princeton, NJ), fluconazole and voriconazole (Pfizer, Inc., New York, NY). All procedures were done according to documents (14,15). Yeasts detected from urine and blood samples presented similar minimum inhibitory concentration for ketoconazole, amphotericin B, fluconazole and voriconazole, which were 0.03µg/mL, 0.25µg/mL, 1µg/mL and 0.03µg/mL, respectively. Thus, they were considered susceptible to all tested drugs. When verified the presence of *C. tropicalis* in urine and blood samples, treatment with vancomycin was managed together with fluconazole and amphotericin B, for 8 and 33 days, respectively. Later, vancomycin had been substituted by the combination of piperacillin/tazobactam, which consequently, had been replaced by meropenem. No corticosteroids were prescribed to the patient. Total parenteral nutrition was carried during 42 days. Despite of all health care given to this patient, he died 63 days after the isolation of yeast in his blood, being his death attributed by the physicians to candidaemia. Consequently, genomic DNA from yeasts isolates from both urine and blood samples were obtained to confirm their similarity.



### *DNA extraction*

Genomic DNA extraction was carried out according to Amberg (16) with modifications. Firstly, yeast cells were washed twice by centrifugation (1,000g) during 5 min with sterile Milli-Q H<sub>2</sub>O, then resuspended in lysis buffer (Tris-HCl pH 8.0; SDS 10%; CaCl<sub>2</sub> 0.5M). Glass beads were added to the tubes, which later were homogenised up to 2 min, by using a vortex. The supernatant was recovered, supplemented with 0.1mg mL<sup>-1</sup> proteinase K and incubated for 2h at 52°C. Posteriorly, 300µL of ammonium acetate 7M (pH 7.0) was added, and another incubation at 65°C during 10 min was carried out. The DNA was extracted utilizing chloroform, phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1), and chloroform/isoamyl alcohol (24:1) solutions, interposing these steps with centrifugations (12,000rpm) at 4°C for 15 min. The DNA was recovered with 2.5 volumes of cold absolute ethanol, which was maintained overnight at -80°C. The samples were once more centrifuged, and 1mL of cold ethanol 70% was added to the pellet, repeating the same previously described centrifugation conditions. The supernatant was discarded and the pellet was dried off ethanol at room temperature. Finally, the DNA was resuspended in Tris – EDTA (pH 8.0) solution with RNase.

### ***PCR amplification and sequence analysis***

PCR amplification was performed using the following primers forward 5'-TCAACTTGTCACACCAGATT-3' and reverse 5'-TTTTTGGTTAGACCTAAGCC-3', generating amplicons for sequencing. PCR amplification was conducted in a GeneAmp model 9700 thermal cycler (Perkin Elmer Applied

Biosystems, Foster City, Calif.), and PCR components were obtained from Invitrogen®. The PCR mix contained 10mM concentrations of each deoxynucleoside triphosphate, 2U of Taq DNA polymerase, 25mM concentrations of each primer, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 30ng of DNA, and the appropriate amount of PCR buffer 1X to result in a final volume of 15µL. Amplification was performed using a denaturation step of 94°C for 3 min, followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 52°C for 30 s, and 72°C for 60 s. A final extension step at 72°C for 10 min was then used. Consequently, the amplicons were visualized in a 1.5% agarose gel using Digi-Doc-It software (Figure 1).

Sequencing reaction was performed using the DYEnamic ET Dye Termination kit (GE®). Sequencing reaction consisted on 1µL of primers forward and reverse previous utilized for the amplification but at a concentration of 10pmols, 8µL of pre-mix, and 3µL of PCR products, resulting in a final volume of 20µL. The obtained sequences were submitted to data bank of National Center for Biotechnology Information (NCBI) through BLASTn platform. Alignment was carried out using ClustalW2 (EMBL-EBI) software for analysis.

## Results

According to ClustalW2, analyzed sequences were considered homologous. In addition, using the BLASTn platform and GenBank, a similarity of these sequences was obtained with accession number AB467295.1, which corresponds to *C. tropicalis* gene ITS1, strain NT1106

(17). The E-value observed was  $3.10^{-70}$ , whereas the maximum identity was 99%.

As consequence, the selected primers used for the PCRs had mainly amplified the ITS1 region of *C. tropicalis* gene. It is important to point out that the expected amplified products should be restricted to the region between 237 and 449bp, with a length that corresponds to 213bp.

Besides, an alignment of these sequences with the chosen ribosomal DNA region of *C. tropicalis* was conducted, and it has been revealed that they were in agreement (Figure 2).

## Discussion

UT in hospitalised patients consists on a susceptible site to infections, and it remains a controversial problem (7-8). Certain underlying patient factors, such as age, diabetes or even catheterisation, have great impact on the aetiology of urinary tract infection (UTI). Organisms considered less virulent are rarely able to cause disease in anatomically or metabolically normal UT, except upon the presence of abnormalities in the organs that compose this system (18). Although, most of these infections have bacterial origin, yeasts also have been valorised (19-21). In the last decades, the increase of nosocomial UTI has been notable probably due to several predisponent factors, which are related to candiduria (9).

*Candida* spp. recovery from urine samples exposes clinicians to a great challenge because of colonised anatomical sites, such as bladder and perineum or yet the presence of urinary catheter. Neither the presence of

symptoms and infection signs, or yet the quantification of colonies from urine, give substantial information for candiduria clinical interpretation (22-23).

There are several risk factors associated with candiduria (22,24), especially recent antimicrobial therapy and plasma glucose level superior to 180mg/dL (25). This patient was diabetic, usually, UTI in diabetes are caused by the same urinary pathogens found in other populations (26). Yet it seems that yeasts are capable to grow faster in urine with increased glucose (27). Micturition abnormalities, frequent in patients with longstanding diabetes, increases residual urine and probably accounts for higher host morbidity and susceptibility to infection (28).

Urine contamination is a normal event, and mainly occurs when the sample is not correctly collected, as in catheterised patients; or in women with high colonisation at perineum region (22). Generally, colonisation assigns to *Candida* spp. presence in surveillance cultures, upon absence of any clinical or infection symptoms (10). Hence, this distinction between an authentic infection and a contamination is complex.

Nowadays, there is not a proper and safe technique to distinguish colonisation and infection when candiduria is detected by the lab (29). For some lab teams, the mere presence of yeast in uroculture or direct exam are already enough to define an infection (30). Quantification could be used as criterion to obtain such definition, but there are some dilemmas to establish a standardized value. Few authors believe that 1,000 CFU/mL counting is satisfactory for candiduria diagnosis (31-34), whereas this value could be equal or superior to 10,000 CFU/mL for others (21,35,36). Further, there is also the concept that counting must be allied to symptoms as fever, urgency,

frequency, dysuria, or suprapubic tenderness, also related to urinary infection condition caused by *Candida* spp. (37). Moreover, when uroculture is positive, it is necessary to confirm by a second sample if yeast presence persists and verify if the patient has pyuria. When pyuria is absent, colony counting inferior to 1,000 CFU/mL could be ruled out by *Candida* infection. Detection of pyuria usually supports infection by *Candida* only when co-existence of bacteria is negative (24).

Candiduria natural course remains unclear. However, UT colonisation should be observed and monitored with good care, since it is considered a common event in hospitalised patients (38).

Molecular typing methods are important tools, since they are able to distinguish *Candida* strains, and then, provide guidance for epidemiological investigations (39). Prior studies had used epidemiological techniques, such as RAPD and PFGE, and in most cases, identical genotype patterns for isolated strains from blood and urine were established (40-42). Even so, studies using these tools (11-12) had not revealed a significant association between candiduria and candidaemia, especially to *C. tropicalis*. Thus, we assume that our work seems to be one of the first reports revealing by genomic DNA sequencing identical genotype pattern of *C. tropicalis* isolates, from a Brazilian general hospital.

In this case, urine yeast finding was considered infection due to repetitive quantification of *C. tropicalis* superior to  $10^5$  CFU/mL. Besides, great similarity between yeasts isolated from both urine and blood samples, was verified.

Previous studying, confirmed the importance of colonisation by *Candida* (43-44). It is known that infection pathogenesis, caused by this pathogen, evolves progressively from local colonisation, resulting in ample dissemination, and then, in invasion. Approximately 80% of candidaemia cases were preceded from high colonisation rates in urine or central venous catheter (CVC) (45).

Once our patient had several surgical processes, his immunological system became debilitated. Hence, this fact leads us to believe that an ascending infection was the route for UTI, since the introduction of organisms may have occurred during the processes of gastrointestinal surgeries. Consequently, tropism of *C. tropicalis* under the use of broad spectrum antibiotics might have contributed for haematogenous infection (22). Thus, fungi should receive a high priority for UTI differential diagnosis in patients with altered immune status.

Risk factors for candidaemia engage several conditions as: previous surgery; ICU length of stay; broad spectrum antibiotics (46-48) and particularly number of days with CVC and mechanical ventilation (49,50).

Further, this scenario is compatible to emergence of others NAS, including *C. tropicalis* (6). There are two concerns about candidaemia caused by NAS. Firstly, significant mortality has been associated to the virulence and pathogenicity of certain NAS, which represents an important issue for immunocompromised host. Secondly, occurrence of species resistant to present available antifungal drugs, is a serious clinical problem that implies in high mortality and economic issue because of prolonged hospitalisation time. Therefore, these factors complicate even more the choice for an initial

adequate treatment (44,51-54), creating challenges for future empirical therapeutic and prophylactic strategies.

*C. tropicalis* is one of the three most frequent NAS isolated (46,55-57) and it seems to display a higher potential for dissemination, and this tendency justify the reported relatively high mortality rate associated (58). In Brazilian general hospital this yeast is a leading cause for candidaemia as well (57).

Once candidaemia is related to long length ICU stay, it ensures a significant rise of patient maintenance cost. Annually, US invest about two billion dollars with treatments (59). Both colonisation and infection caused by *Candida* spp. have great economical impact due to hospitalisation period; and were estimated in €12,908.00 and €21,075, respectively (60).

In summary, our results suggest that UT was the plausible source of a fatal *C. tropicalis* candidaemia, since urine and blood samples had demonstrated an identical genotype pattern. In addition, no obstruction of UT and/or gastrointestinal tract was noticed, as it could suggest a contamination or colonisation. Then, candiduria should be better interpreted and valorised, since it might represent signs of a disseminated *Candida* infection.

## **Acknowledgements**

This work was supported by Fundação Araucária and T.I.E.S. receives grants from CNPq. We thank Cristiane S. S. Mesquita for lab assistance.

## **References**

1. Odds FC. *Candida* infections: an overview. Crit Rev Microbiol 1987;32:123-129.

2. Vazquez JA, Sanchez V, Dmuchowski C, Dembry LM, Sobel JD, Zervos MJ. Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: an epidemiologic study. *J Infect Dis* 1993;168:195-201.
3. Klotz SA, Chasin BS, Powell B, Gaur NK, Lipke PN. Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;59:401-406.
4. Colombo AL, Guimarães T. Candidúria: uma abordagem clínica e terapêutica. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007;40:332-337.
5. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:133-163.
6. Galvan B, Mariscal F. Epidemiologia de la candidemia en UCI. *Rev Iberoam Micol* 2006;23:12-15.
7. Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med* 1991;91:72-75.
8. Guler S, Ural O, Findik D, Arslan U. Risk factors for nosocomial candiduria. *Saudi Med J* 2006;27:1706-1710.
9. Sobel JD. Controversies in the diagnosis of candiduria: What is the critical colony count? *Infect Dis* 2002;4:81-83.
10. Akalm H, Ener B, Kahveci F, Akçaglar S, Gürcan S, Töre O. Persistence of candiduria in ICU catheterized patients is not linked to adherence and proteolytic activities of *Candida* strains. *Intes Care Med* 2004;30:972-975.
11. Miranda LN, van der Heijden IM, Costa SF *et al.* *Candida* colonisation as a source for candidaemia. *J Hosp Infect* 2009;72:9-16.
12. Binelli CA, Moretti ML, Assis RA *et al.* Investigation of the possible association between nosocomial candiduria and candidaemia. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:538-543.
13. Ahearn DG, Simmon RB. 1998. Yeast pathogenic for humans. In: Kurtzman CP, Fell JW. *The yeast - a taxonomic study*, 4th edn. Amsterdam: Elsevier, p. 454-463.
14. European Committee on Antibiotic Susceptibility. 2002. Method for determination of minimal inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. Discussion document E. Dis. 7.1. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Taufkirchen, Germany.
15. Clinical Laboratory Standards Institute. 2003. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. CLSI document M-27 A2, Wayne, PA.



16. Amberg DC, Burke DJ, Strathern JN. 2005. Preparation of genomic DNA from yeast using glass beads. In: Amberg DC, Burke DJ, Strathern JN. Yeast DNA isolations. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
17. Chen Y. 2008. Isolation and characterization of marine yeast at eastern coast of Taiwan. Yisheng Chen Ming Chuan University, Department of Biotechnology.
18. Ronald A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Am J Med* 2002;113:14-19.
19. Rivett AG, Perry JA, Cohen J. Urinary candidiasis: a prospective study in hospitalized patients. *Urol Res* 1986;14:183-186.
20. Sobel JD, Kauffman CA, McKinsey D *et al.* Candiduria: a randomized double-blind study of treatment with fluconazole and placebo. *Clin Infect Dis* 2000;30:19-24.
21. Alvarez-Lerma F, Nolla-Salas J, León C *et al.* Candiduria in critically ill patients admitted to intensive care medical units. *Intensive Care Med* 2003;29:1069-1076.
22. Lundstrom T, Sobel J. Nosocomial Candiduria: a review. *Clin Infect Dis* 2001;32:1602-1607.
23. Kauffman CA. Candiduria. *Clin Infect Dis* 2005;41:371-376.
24. Bukhary ZA. Candiduria: a review of clinical significance and management. *Saudi J Kidney Dis Transplant* 2008;19:350-360.
25. Paul N, Mathai E, Abraham OC, Michael JS, Mathai D. Factors associated with candiduria and related mortality. *J Infect* 2007;55:450-455.
26. Ronald A, Ludwig E. Urinary tract infections in adults with diabetes. *Int J Antimicrob Agents* 2001;17:287-292.
27. Geerlings SE, Brouwer EC, Gaastra W, Verhoef J, Hoepelman AI. Effect of glucose and pH on uropathogenic and non-uropathogenic *Escherichia coli*: studies with urine from diabetic and non-diabetic individuals. *J Med Microbiol* 1999;48:535-539.
28. Sawers JS, Todd WA, Kellett HA *et al.* Bacteriuria and autonomic nerve function in diabetic women. *Diabetes Care* 1986;9:460-464.
29. Blot S, Dimopoulos G, Rello J, Vogelaers D. Is *Candida* really a threat in the ICU? *Curr Opin Crit Care* 2008;14:601-604.

30. Sellami A, Sellami H, Makni F *et al.* La candidurie en milieu de réanimation: signification et intérêt de la numération des levures dans les urines. *Ann Fr Anesth Reanim* 2006;25:584-588.
31. Voss A, Meis JFGM, Hoogkamp-Korstanje JAA. Fluconazole in the management of fungal urinary tract infections. *Infection* 1994;22:247-251.
32. Leu HS, Huang CT. Clearance of funguria with short-course antifungal regimens: a prospective, randomized, controlled study. *Clin Infect Dis* 1995;20: 152-157.
33. Kauffman CA, Vazquez JA, Sobel JD *et al.* Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 2000;30: 14-18.
34. Sobel JD. Practice guidelines for the treatment of fungal infections. *Formycoses Study Group infectious diseases society of America. Clin Infect Dis* 2000;30:652.
35. Gubbis PO, Piscitekki SC, Danziger LH. Candidal urinary tract infections: a comprehensive review of their diagnosis and management. *Pharmacotherapy* 1993;13:110-117.
36. Jacobs LG, Skidmore EA, Freeman K, Lipschultz D, Fox N. Oral fluconazole compared with bladder irrigation with amphotericin B for treatment of fungal urinary tract infections in elderly patients. *Clin Infect Dis* 1996;22:30-35.
37. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. 1996. CDC definitions for nosocomial infections. In: Olmsted RN, ed.: *APIC Infection Control and Applied Epidemiology: Principles and Practice*. St. Louis: Mosby, p. 1-20.
38. Magill SS, Swoboda SM, Johnson EA *et al.* The association between anatomic site of *Candida* colonization, invasive candidiasis, and mortality in critically ill surgical patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;55:293-301.
39. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:512-530.
40. Klemp-Selb B, Rimek D, Kappe R. Karyotyping of *Candida albicans* and *Candida glabrata* from patients with *Candida* sepsis. *Mycoses* 2000;43:159-163.
41. Vrioni G, Matsiota-Bernard P. Molecular typing of *Candida* isolates from patients hospitalized in an intensive care unit. *J Infect* 2003;42:50-56.

42. Ahmad S, Khan A, Mustafa AS, Khan ZU. Epidemiology of *Candida* colonization in an intensive care unit of teaching hospital in Kuwait. *Med Mycol* 2003;41:487-493.
43. Pittet D, Monod MM, Sutter PM, Frenk E, Auckenthaler R. *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg* 1994;220:751-758.
44. Rangel-Frausto MS, Wiblin T, Blumberg HM *et al.* National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care unit. *Clin Infect Dis* 1999;28:253-258.
45. Cheng Y-R, Lin LC, Young TG, Liu CE, Chen CH, Tsay RW. Risk factors for candidemia-related mortality at a medical Center in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2006;39:155-161.
46. Patel M, Kunz DF, Trivedi VM, Jones MG, Moser SA, Baddley JW. Initial management of candidemia at an academic medical center: evaluation of the IDSA guidelines. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;52:29-34.
47. Maschmeyer G. The changing epidemiology of invasive fungal infections: new threats. *Int J Antimicrob Agents* 2006;27:3-6.
48. Bassetti M, Trecarichi EM, Righi E *et al.* Incidence, risk factors, and predictors of outcome of candidemia. Survey in 2 Italian university hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;58:325-331.
49. Chow, JK, Golan Y, Ruthazer R *et al.* Risk factors for *albicans* and non-*albicans* candidemia in the intensive care unit. *Crit Care Med* 2008;36:1993-1998.
50. Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM *et al.* Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *J Clin Microbiol* 2007;45:1843-1850.
51. Kao AS, Brandt ME, Pruitt WR *et al.* The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. *Clin Infect Dis* 1999;29:1164-1170.
52. Viscoli C, Girmenia C, Marinus A *et al.* Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the invasive fungal infection group (IFIG) of the European Organization for research and treatment of cancer (EORTC). *Clin Infect Dis* 1999;28:1071-1079.
53. Pappas PG, Rex JH, Lee J *et al.* A prospective observation study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis* 2003;37:634-643.

54. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004;39:309-337.
55. Nucci M, Silveira MI, Spector N *et al.* Fungemia in cancer patients in Brazil: predominance of non-*albicans* species. *Mycopathologia* 1998;141:65-68.
56. Yamamura DLR, Rostein C, Nicolle LE, Ioannou S. Candidemia at selected Canadian sites: results from the Fungal Disease Registry. *Can Med Assoc J* 1998;160:493-499.
57. Nucci M, Colombo AL. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diag Microbiol Infect Dis* 2007;58:77-82.
58. Krcmery V, Barnes AJ. Non-*albicans Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect* 2002;50:243-260.
59. Wilson LS. The direct cost and incidence of systemic fungal infections. *Value Health* 2002;5:26-34.
60. Olaechea PM, Palomar M, León-Gil C *et al.* Economic impact of *Candida* colonization and *Candida* infection in the critically ill patient. *Eur J Microbiol Infect Dis* 2004;23:323-330.

## Figures

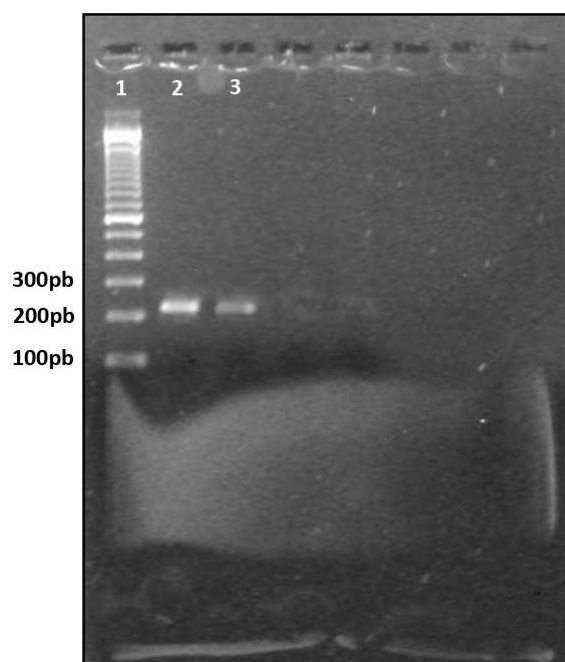


Figure 1. Amplicons after PEG purification. Line 1: loading 100 bp (Invitrogen®); Line 2: blood sample; Line 3: urine sample.

```

Urine -----TTGCGCCCTTGGTATT 17
Blood -----AACGCACATTGCGCCCTTGGTATT 25
DNAr TGAATTGCAGATATTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATT 60
*****

Urine CCAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCCCGGGTTTGGTGTTGAGC 77
Blood CCAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCCCGGGTTTGGTGTTGAGC 85
DNAr CCAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCCCGGGTTTGGTGTTGAGC 120
*****

Urine AATACGCTAGGTTTGTGTTGAAAGAATTTAACGTGGAACTT----- 118
Blood AATACGCTAGGTTTGTGTTGAAAGAATTTAACGTGGAACTTATTTAAGCGACTTAGGTT 145
DNAr AATACGCTAGGTTTGTGTTGAAAGAATTTAACGTGGAACTTATTTAAGCGACTTAGGTT 180
*****

Urine -----
Blood TATCC----- 150
DNAr TATCCAAAACGCTTATTTTG 201

```

Figure 2. Alignment of the sequences obtained from urine and blood samples with the ribosomal DNA region of *Candida tropicalis*, using the ClustalW2 program (EMBL-EBI). The "\*" indicates that nucleotides are identical for all aligned sequences.

**Artigo: “The hidden threats of *Candida* spp. to the respiratory tract”**

## The hidden threats of *Candida* spp. to the respiratory tract

### Could it be pulmonary candidiasis?

Pedrina G. Vidigal<sup>1</sup> and Terezinha. I. E. Svidzinski<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Mycology, Department of Clinical Analysis, Universidade Estadual de Maringá (UEM), PR, Brazil

\* Corresponding author: Terezinha I. E. Svidzinski, Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, Av. Colombo, 5.790, 87020-900, Maringá – PR, Brazil.

Tel.: +55 44 3261-4809; fax: +55 44 3261 4860 *E-mail address:*

terezinha@email.com

Dear Editor,

We would like to show that even when using the most advanced diagnosis tools, difficulty upon results interpretation endures, and this type of technology was not enough for a patient's diagnosis conclusion.

Health professionals still deal with some difficult dilemmas, especially to determine when a patient has only yeast colonization or infection. This is a reason why pulmonary candidiasis is so hard to be diagnosed. Usually, lungs are involved with disseminated infection processes, and so far, the necessary attention to yeast isolating from representative biological specimens of respiratory tract is not given, once they tend to carry contaminant microorganisms. Hence, *Candida* species and their role as a probable cause of pulmonary disease is an usual clinical impasse.

We would like to share our past experience with an Intensive Care Unit patient who probably developed pneumonia due to *Candida tropicalis*, but the results were not considered because of the rough interpretation of them.

Firstly, endotracheal tube direct exam showed development of yeast, which was characterized as *C. tropicalis*. Doctors were communicated, but the yeast finding was ignored, since it was considered colonization. In the next day, it was done a biopsy from the right hemithorax anterolateral area that showed a lesion, and a culture was carried out with this material on agar blood. Morphological, physiological and biochemical characteristics from biopsy culture were examined by standardized methods used for yeast taxonomy, and gave excellent identification for *C. tropicalis*. To confirm that yeasts isolated from endotracheal tube and biopsy were similar, genomic DNAs were analyzed throughout sequencing.

Genomic yeast DNA extraction was conducted according to Amberg *et al.* (2004) with modifications. Isolates were differentiated by amplification of regions ITS1, 5.8S and ITS2, with the following primers: forward 5'-TCAACTTGTCACACCAGATT-3' and reverse 5'-TTTTTGGTTAGACCTAAGCC-3'. Sequencing reaction was performed using the DYEnamic ET Dye Termination kit (GE). Posteriorly, sequences obtained were submitted to data bank of NCBI, whereas the alignment was carried out using the ClustalW2 (EMBL-EBI) software.

Alignment had shown that the analyzed sequences were considered homologous (Figure 1). Hence, the yeast isolated from the endotracheal tube showed to be similar to the one also identified in the biopsy. In addition, it was revealed a 100% of similarity of these sequences with accession number



AB467295.1, which corresponds to *C. tropicalis* gene ITS1, strain NT1106 (Chen, 2008). The observed E-value was  $3.10^{-59}$ . However, the doubt of antifungal treatment necessity persisted evidences to determine the cause of pneumonia or even diagnosis of pulmonary candidiasis are still misty. This fact is explained by the lack of complete information and integration between physicians and lab professionals, requiring then, a standardized protocol action to guarantee adequate diagnosis. This will represent not only a decreasing on mortality and morbidity rates due to these infections, but also improve life quality for the patients. Throughout studies related to yeast finding valorization, in short or medium term they might provide universal protocols with efficient and fast decisions about management of critically ill patients. This work was approved by Ethical Committee from UEM.

## References

Chen, Y. 2008. Isolation and characterization of marine yeast at eastern coast of Taiwan. Department of Biotechnology, Yisheng Chen Ming Chuan University, China.

Amberg, DC; Burke, DJ; Strathern, JN. 2005. Preparation of genomic DNA from yeast using glass beads. In: Amberg DC, Burke DJ, Strathern JN. Yeast DNA isolations. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

## Attachment

```

Endotracheal -----GCGCCCTTTGGTATT 15
Biopsy -----GCGCCCTTTGGTATT 15
DNAr TGAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATT 60
*****

Endotracheal CCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCCCGGGTTGGTGGTTGAG 75
Biopsy CCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCCCGGGTTGGTGGTTGAG 75
DNAr CCAA-GGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCCCGGGTTGGTGGTTGAG 119
**** *****

Endotracheal CAATACGCTAGGTTTGTGTTGAAAGAATTTAACGTGGAAACTTATTTAAGCG----- 127
Biopsy CAATACGCTAGGTTTGTGTTGAAAGAATTTAACGTGGAAACTTATTTAAGCG----- 127
DNAr CAATACGCTAGGTTTGTGTTGAAAGAATTTAACGTGGAAACTTATTTAAGCGACTTAGGT 179
*****

Endotracheal -----
Biopsy -----
DNAr TTATCCAAAAACGCTTATTTTG 201

```

Figure 1. Alignment of the sequences obtained from endotracheal tube and biopsy samples with the ribosomal DNA region of *Candida tropicalis*, using the ClustaW2 program (EMBL-EBI). The “\*” indicates that nucleotides are identical for all aligned sequences.

## CAPÍTULO III

### CONCLUSÕES

O presente trabalho realizados com amostras do TU (urina e sangue) e do TR (biópsia e tubo endotraqueal), provenientes de pacientes hospitalizados, permitiu concluir que:

- 1) Os pares de isolados da espécie *C. tropicalis*, identificados genotipicamente através do seqüenciamento, apresentaram grande similaridade entre si.
- 2) Ambos trabalhos propiciaram a discussão sobre a versatilidade das *Candida* spp., bem como a valorização do seu envolvimento em processos de colonização/infecção do trato urinário e respiratório.
- 3) Destacou a importância das medidas destinadas à diminuição dos fatores de riscos que promovem a colonização e a infecção tanto do trato urinário, quanto respiratório por *Candida* spp.
- 4) Apontou sobre a importância da interação entre os médicos e os laboratoristas no sentido não apenas de identificar um agente potencialmente patogênico, mas também de tentar definir se o achado é originário apenas de uma situação de colonização, ou é consequência de um processo infeccioso.

## PERPECTIVAS FUTURAS

Diante dos resultados apresentados, a caracterização do perfil molecular dos isolados do gênero *Candida* de diferentes sítios anatômicos, provenientes de um mesmo paciente, poderão ser empregados no estudo do quadro de candidíase, investigando se a mesma foi ou não precedida por um processo de colonização.

Em adição, a verificação da presença dos genes da família SAPT (*secrete aspartic proteinases*), em isolados de *C. tropicalis*, também poderá auxiliar no estudo sobre a virulência, uma vez que auxiliam na alteração, bem como na destruição da integridade da membrana celular do hospedeiro.

Considerando que a espécie *C. glabrata*, assim como *C. tropicalis*, está diretamente relacionada à candidíase sistêmica, apresentando elevada resistência aos agentes antifúngicos, bem como taxa de mortalidade, estudos futuros poderão comparar essas duas espécies, a fim de verificar quais genes conferem a propriedade de aumentar o grau de virulência. Assim sendo, o emprego de diferentes ferramentas moleculares irão assistir na confirmação do grau de similaridade desses isolados, bem como os possíveis mecanismos de virulência.