



Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia

ELIANE MARTINS DA SILVA BETTEGA

IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DE LEVEDURAS
ISOLADAS DE SUPERFÍCIES E MÃOS DE PROFISSIONAIS EM UTI DE
UM HOSPITAL NA REGIÃO NOROESTE DO PARANÁ.

MARINGÁ

2012

ELIANE MARTINS DA SILVA BETTEGA

IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DE LEVEDURAS ISOLADAS
DE SUPERFÍCIES E MÃOS DE PROFISSIONAIS EM UTI DE UM HOSPITAL NA
REGIÃO NOROESTE DO PARANÁ.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, 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.^a Dr.^a Terezinha Inez Estivalet Svidzinski

MARINGÁ

2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

B865i Bettega, Eliane Martins da Silva
 Identificação e perfil de susceptibilidade de
leveduras isoladas de superfícies e mãos de
profissionais em UTI de um hospital da região
noroeste do Paraná / Eliane Martins da Silva
Bettega. -- Maringá, 2012.
 54 f. : il., figs., tabs.

 Orientador: Prof^a. Dr^a. Terezinha Inez Estivalet
Svidzinski.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento
de Análises Clínicas e Biomedicina, Programa de Pós-
Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, 2012.

 1. Candida. 2. Reação em cadeia da polimerase.
3. Infecção hospitalar. 4. Superfícies hospitalares.
5. Mãos de profissionais de UTI. 6. Fomites. I.
Svidzinski, Terezinha Inez, orient. II.
Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências
da Saúde. Departamento de Análises Clínicas e
Biomedicina. Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia. III. Título.

CDD 21.ed. 616.015

AHS-001504

FOLHA DE APROVAÇÃO

ELIANE MARTINS DA SILVA BETTEGA

IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DE LEVEDURAS ISOLADAS DE SUPERFÍCIES E MÃOS DE PROFISSIONAIS EM UTI DE UM HOSPITAL NA REGIÃO NOROESTE DO PARANÁ.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, 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 Eliana Valéria Patussi

Universidade Estadual de Maringá

Profª Drª Maria Cristina Bronharo Tognin

Universidade Estadual de Maringá

Profª Drª Marcia Cristina Furlaneto

Universidade Estadual de Londrina

Profª Drª Raquel Maria Lima Lemes

Universidade Federal de Alfenas

Aprovada em: 18 de Dezembro de 2012.

Local de defesa: Auditório FADEC - Bloco 30, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus familiares, amigos e colegas que, direta ou indiretamente contribuíram para sua execução.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, Senhor a quem entreguei a minha vida, pois, nos momentos mais difíceis, através de Sua palavra e do seu agir, me sustentou física e emocionalmente, protegeu a mim e a minha família, me deu força e coragem para realizar o presente trabalho.

Ao meu eterno namorado, amado esposo, Julio César, pelo incentivo, compreensão, apoio financeiro, amizade, carinho e atenção. Sou muito grata por acreditar em mim.

Ao meu pai, Adão (*in memoriam*), pelos ensinamentos morais e cristãos. Sinto sua falta!

À minha mãe por me ensinar a lutar por meus objetivos.

À Tia Wanda, pelo apoio e incentivo, desde o início dessa jornada.

Aos meus irmãos, Éderson, Jackes e Esdras, que sempre estiveram dispostos a me ajudar. Vocês são muito especiais para mim. Com coragem e com a direção Divina, vocês também alcançarão seus objetivos.

Aos meus filhos, Juliane e Cristiano, que embarcaram nessa aventura comigo, mudando radicalmente a vida deles em prol desse título. Amo vocês!

À minhas colegas de laboratório, sem as quais não seria possível realizar esse trabalho, especialmente à Elaine Mansano, Adriana Fiorini, Patrícia Bonfim e Flávia Tobaldini.

Aos estagiários e alunos de Iniciação Científica.

Ao Paulo e Eliana, do Laboratório de Micologia Médica – LEPAC-UEM, pela ajuda incondicional no processo e identificação e outros.

Às “meninas” do laboratório de Bacteriologia – LEPAC-UEM. Pela ajuda, recepção calorosa, carinho e atenção.

À Isabel e aos demais colegas e colaboradores do departamento - DAB, por inúmeras vezes foram de suma importância na realização deste trabalho.

Agradecimento especial aos professores que, em parceria ou colaboração dispuseram seus laboratórios para realização deste trabalho: Professora Rosilene Fressati Cardoso, Professora Márcia Edilaine Lopes Consolaro, Professor Celso Luiz Cardoso, Professora Aparecida Bidóia e ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP-UEM).

Aos funcionários do Hospital Metropolitano de Sarandi, que permitiram e participaram ativamente deste trabalho.

À minha querida orientadora, Prof^a Terezinha Svidzinski, um exemplo de vida dedicada ao ser humano, sempre disposta a ajudar e a ensinar, sem qualquer preconceito. Mulher sábia, inteligente e temente a Deus. Muito obrigada pela oportunidade. Que o Senhor te abençoe, te guarde e te dê a paz!

EPÍGRAFE

“Tudo quanto te vier à mão para fazer,
faze-o conforme as tuas forças, porque
na sepultura, para onde tu vais, não há
obra nem projeto, nem conhecimento,
nem sabedoria alguma.”

Eclesiastes 9:10

IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DE LEVEDURAS ISOLADAS DE SUPERFÍCIES E MÃOS DE PROFISSIONAIS EM UTI DE UM HOSPITAL NA REGIÃO NOROESTE DO PARANÁ.

RESUMO

Infecções relacionadas à Assistência à Saúde (IrAS), tem sido um problema de âmbito mundial. A Unidade de Terapia Intensiva (UTI) é o local mais vulnerável à ocorrência de IrAS devido às características e gravidade dos pacientes. *Candida albicans* é a espécie de levedura mais isolada em IrAS no entanto outras espécies estão emergindo como *C. parapsilosis* que tem sido apontada em vários estudos como agente causador de IrAS em UTI neonatal. Este estudo teve como objetivo verificar se mãos de servidores e superfícies de um hospital da região noroeste do Paraná são reservatórios de leveduras implicadas em IrAS. Para coleta das 98 superfícies foram utilizados *Swab's* umedecidos em salina, e para coleta das 114 mãos foram utilizados sacos plásticos contendo água destilada. A identificação foi realizada por microcultivo em ágar fubá Tween-80 e pela técnica PCR-RFLP amplificação do gene secundário álcool-desidrogenase (*SADH*), seguido de digestão com a enzima de restrição *BanI*. Foram isoladas leveduras em 47% das amostras de superfícies, sendo 21,42% identificadas como *C. parapsilosis stricto sensu*. Das amostras de mãos 75,4% das amostras foram positivas para leveduras, sendo 49,12% identificadas como *C. parapsilosis stricto sensu*. Foi possível identificar ainda 9 *C. albicans* (4,3%); 9 *C. tropicalis* (4,3%); 5 *C. krusei* (2,2%); 3 *C. glabrata* (1,3%). A análise das repetições microssatélites utilizando marcadores CP1, CP6 e B5 mostrou 76 genótipos diferentes, formando 13 agrupamentos. O teste de concentração inibitória mínima foi realizado através da técnica de microdiluição em caldo, e indicou que *C. parapsilosis* foi sensível a anfotericina B, fluconazol e voriconazol e, menos sensível à micafungina. Os resultados encontrados mostraram que não há uma fonte comum de contaminação na UTI adulto do hospital em estudo.

Palavras-chave: Candida, Reação em Cadeia da Polimerase, Infecção hospitalar, Superfícies, Mãos.

ABSTRACT

IDENTIFICATION AND SUSCEPTIBILITY PROFILE OF YEASTS ISOLATED FROM SURFACES AND HANDS OF HEALTHCARE WORKERS IN ICU OF A HOSPITAL FROM THE NORTHWEST OF PARANA STATE.

Infection related Health Care (IrAS), has been a worldwide problem. The Intensive Care Unit (ICU) is the most sensitive to the occurrence of IrAS due to the characteristics and severity of the treated patients. *Candida Albicans* is the most common species isolated, however there are reports that other species are emerging in this environment. *C. parapsilosis* has been investigated by the high rate of IrAS in the neonatal ICU. This study aimed to verify if hands of healthcare workers server and surfaces of a hospital from the northwestern of Parana state are reservoirs of the main yeasts involved in IRAs. The yeasts found, 45.3% were identified as *C. parapsilosis* sensu stricto. The identification was by microculture on corn-meal agar supplemented with tween 80 and by amplification of the secondary alcohol dehydrogenase-encoding gene (*SADH*) followed by digestion with the restriction enzyme *BanI*. The microsatellite repeats analysis with markers CP1, CP6 e B5 showed 76 different genotypes, forming 13 groups. The minimum inhibitory concentration test was performed by broth microdilution technique indicated that *C. parapsilosis* was sensitive to amphotericin B, fluconazole and voriconazole, and was less sensitive to micafungin. The results showed that there is not a common source of contamination in the adult ICU of the hospital under study.

Keywords: Candida, Polymerase Chain Reaction, infection, Surfaces, Hands.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas de publicação científica: Clinical Microbiology and Infection (artigo). Disponível em : <http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/%28ISN%291469-0691/issues>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diagrama da frequência de <i>C. parapsilosis</i> stricto sensu em colonização de mãos e superfícies abióticas.....	37
Tabela 1 - Distribuição dos funcionários colonizados nas mãos por <i>C. parapsilosis</i> , conforme a ocupação.....	38
Tabela 2 - Distribuição de superfícies contaminados por <i>C. parapsilosis</i>	39
Tabela 3 - Características dos <i>loci</i> dos microssatélites selecionados.....	40
Tabela 4 - Descrição dos 13 genótipos que agruparam mais de um isolado de <i>C. parapsilosis</i> presentes em mãos de profissionais e superfícies de uma UTI adulto de um hospital geral do Paraná, Brasil.....	41
Tabela 5 - Perfil de Sensibilidade de <i>C. parapsilosis</i> isoladas de superfícies e mãos de profissionais da saúde, frente à quatro antifúngicos testados pela metodologia de microdiluição em caldo (CLSI – M23 A4).....	42

SUMÁRIO

1	CAPITULO I	12
1.1	Infecção Hospitalar.....	12
1.2	Leveduras de Interesse Médico.....	13
1.3	<i>Candida parapsilosis</i>	15
1.4	Sensibilidade aos Anfifúngicos.....	16
1.5	Técnicas Moleculares Aplicadas à Epidemiologia de Fungos.....	16
1.6	Justificativas.....	17
1.7	Objetivos.....	18
1.8	Referências Bibliográficas.....	19
2.	CAPITULO II.....	24
2.1	Complexo <i>Candida parapsilosis</i> isolado de superfícies hospitalares e de mãos de profissionais em Unidade de Terapia Intensiva Adulto.....	25
3.	CAPITULO III.....	46
3.1	Conclusões.....	46
3.2	Perspectivas Futuras.....	46

CAPÍTULO I

INFECCÃO HOSPITALAR

Infecção hospitalar (IH) ou infecção nosocomial, atualmente com a sugestão de que seja denominada Infecções relacionadas à Assistência à Saúde (IrAS), é definida como infecção adquirida após a admissão do paciente no ambiente hospitalar, que pode se manifestar durante a internação ou após a alta e, está relacionada com a internação ou com outros procedimentos hospitalares [1].

Embora conhecida há mais de um século, apenas na metade do século XX houve o registro de dados para controle das IrAS. Estudos realizados nos Estados Unidos em 1970 indicaram que os custos com IrAS atingiam aproximadamente um bilhão de dólares por ano, sendo que 35% dessas infecções poderiam ser prevenidas [29]. Ainda hoje, a incidência de IrAS tem se tornado fator determinante no aumento do tempo de internação, do índice de morbidade e mortalidade, além de elevar o custo direto e indireto do tratamento médico hospitalar [2,3].

As IrAS podem ser primárias, quando resultam da introdução na corrente sanguínea de micro-organismos, ou secundárias, quando provém de uma infecção já presente no corpo [29]. Os micro-organismos implicados nas IrAS podem ser de origem endógena, ou seja, infecções por micro-organismos colonizantes, ou exógena, quando o micro-organismo tem origem externa à microbiota do paciente infectado [4].

De modo geral, um conjunto de fatores contribui para a ocorrência das IrAS, entre outros, fatores externos ao paciente, como higienização insuficiente das mãos [5], cuidados inadequados do ambiente hospitalar, bem como dos objetos de rotina [6,7,8] a falta, ou uso inadequado de equipamentos para proteção individuais (EPIs), e fatores ligados ao paciente como subnutrição [9], uso empírico de antibióticos de amplo espectro, debilidade do sistema imunológico[10].

Em 1843, Oliver Wendell Holmes sugeriu que a febre puerperal seria transmitida por mãos de médicos que realizavam os partos. Alguns anos depois, em 1850, Ignaz Semmelweiss, em Viena, demonstrou que a lavagem de mãos antes da realização de

procedimentos cirúrgicos prevenia a ocorrência de muitas infecções, inclusive a febre puerperal. [29].

Estudos evidenciam a preocupação do profissional em não se expor ao risco de adquirir doenças e, então o uso de luvas de procedimento acaba sendo para proteção do profissional. Quando o profissional, ao descalçar as luvas, deixa de lavar as mãos segundo o protocolo pré-estabelecido, acaba contaminando as novas luvas, podendo transferir micro-organismos patógenos a outros locais inclusive outros pacientes [31,33].

O ambiente hospitalar no qual o paciente está mais susceptível a IrAS é a unidade de tratamento intensivo (UTI), onde procedimentos invasivos são rotineiros. Em 2009, Karabey et al verificaram, em um hospital de ensino em Istambul, que a frequência de higienização das mãos da equipe multiprofissional que atuava na UTI estava muito aquém do necessário, refletindo em aumento de IrAS especialmente de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) [33]. Em um estudo realizado no Brasil verificou-se que a frequência de leveduras em mãos de profissionais de uma maternidade em Jundiaí-SP, foi de 19,2% e constituída por espécies do gênero *Candida*, sendo que, no período da pesquisa ocorreram três óbitos devido a infecção por *Candida* sp [30].

LEVEDURAS DE INTERESSE MÉDICO

Leveduras são micro-organismos eucariotos presentes em diversos ambientes, inclusive fazendo parte da microbiota humana. Estes micro-organismos, em sua maioria, se reproduzem através de brotamentos ou cissiparidade, formando blastoconídios, uma unidade reprodutiva assexuada. Entretanto, há leveduras que podem se reproduzir também de forma sexuada [32].

Em um levantamento realizado em hospitais nos Estados Unidos da América, os fungos foram considerados responsáveis por 9,5% das infecções nosocomiais de corrente sanguínea e, as leveduras do gênero *Candida* spp foram apontadas como os agentes infecciosos em 9% das mortes provocadas por IrAS [36,44].

As leveduras passaram da condição de sapróbios a patogênicos (micro-organismos de interesse médico). Este fato pode estar ligado ao hospedeiro, ou não. No ambiente hospitalar há grande incidência de infecção por esses patógenos, onde a microbiota nosocomial é rica em

fungos em princípio considerados contaminantes. Entre tantos pode ser citada *Rhodotorula* spp que é uma levedura de origem ambiental caracterizada por células esféricas, ovóides e alongadas e se reproduzem por brotamento multilateral. Possuem pigmentos carotenóides, vermelhos ou amarelos em culturas jovens [32]. Ramos *et al* (2012), relatam dois casos de fungemia por *Rhodotorula* sp, sendo que um deles culminou em óbito do paciente [51].

Outro contaminante, *Trichosporon asahii*, é um tipo de levedura cuja cultura tem aspecto de cera, coloração creme, crescimento moderado em ágar-Sabouraud. Frequentemente isolado do ambiente, principalmente do solo e madeira em decomposição [32]. Yong *et al* (2012), reportam um caso de hemocultura positiva para *C. glabrata* e, posteriormente *T. asahii*, levando o paciente à morte [39].

Apesar de vários gêneros estarem envolvidos, *Candida* sp é o mais frequente em IrAS no Brasil e no mundo, *Candida albicans* ainda é agente infeccioso mais comum [44,11]. No entanto, nos últimos anos vem sendo observado aumento na frequência de infecções por outras espécies, hoje conhecidas como *Candida* não-*C. albicans* (CNCA) [11,12,19].

Estudo realizado na Argentina entre 2007 e 2008 apontou que, das 461 leveduras recuperadas em culturas de sangue, apenas 38,4% foram identificadas como *C. albicans* enquanto 52,7% eram CNCA distribuídas da seguinte forma: *C. parapsilosis* 26,0%, *C. tropicalis* 15,4%, *C. glabrata* 4,3%. Outras espécies incomuns foram encontradas, como *C. pelliculosa*, *C. guilliermondii* 1,5%, *C. dubliniensis* 0,9%, *C. lusitaniae* e *C. viswanathii* 0,6%, *C. haemulonii* e *C. krusei* 0,4%, *C. famata*, *C. fermentati*, *C. inconspicua*, *C. kefyr* 0,2% [37].

Em cateteres venosos de pacientes internados em UTI de Hospital de ensino em Maringá, Paraná, além de *C. albicans*, foram encontradas *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* [20].

Weichert *et al*, (2012) reportaram um caso de infecção fúngica por *C. kefyr* em bebê neonatal [34]. Estes fatos podem estar associados à pressão seletiva, causada pelo uso de antifúngicos não específicos, principalmente os azólicos. Estudos mostram que algumas espécies, como *C. glabrata* e *C. krusei* desenvolveram resistência aos antifúngicos comerciais que são amplamente utilizados [16].

Candida parapsilosis

Considerada uma levedura oportunista, é capaz de causar candidíase superficial e sistêmica em pacientes imunocomprometidos. Em testes com camundongos, *C. parapsilosis* foi apontada como causa de lesões gastrintestinais e viscerais [32].

Um levantamento realizado entre 2001 e 2005 em 124 centros médicos, abrangendo várias regiões do mundo, sobre variação na frequência de *C. parapsilosis* por regionalização geográfica foi observado que de 141.383 isolados de *Candida* sp a partir de amostras de sangue, 6,6% foram identificadas como *C. parapsilosis* [42]. Em estudos realizados na Itália, e em Izmir-Turquia, *C. parapsilosis* foi o terceiro patógeno em infecção sanguínea por *Candida* sp [40,41].

Em 2005 foram definidos formalmente duas novas espécies, que juntas comporiam o complexo *Candida parapsilosis*. Em razão das diferenças genotípicas, essas espécies foram denominadas *Candida metapsilosis* e *Candida orthopsilosis*. A partir de então, ao citar o complexo sem diferenciação interna de espécies deverá ser acrescentado a expressão *lato sensu*, quando a identificação de *C. parapsilosis* levar em consideração a diferenciação dentro do complexo, sugere-se que seja acrescentado o termo *stricto sensu*. Para identificação do complexo é necessário aplicação de técnicas moleculares [43].

No Brasil, um estudo retrospectivo dos casos de candidemia entre 1998 a 2007, *C. parapsilosis stricto sensu* foi considerada a segunda causa de infecção sanguínea. Neste estudo 3% foram identificadas como *C. orthopsilosis* e não foram encontradas *C. metapsilosis* [44]. Em uma UTI neonatal foram registrados 36 casos de candidemia por *C. parapsilosis*, no período de sete anos, sendo que três desses pacientes acabaram em óbito. Neste mesmo estudo foram avaliadas amostras de mãos da equipe, das quais foi possível isolar uma amostra de *C. orthopsilosis*. Não houve relação entre os isolados clínicos e os isolados de mãos dos servidores, no entanto foi possível observar que em alguns casos houve mais de uma fonte de contaminação, sugerindo que o cuidado materno ou o ambiente possa ter contribuído na formação de reservatórios desse patógeno [45].

SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

Inicialmente o tratamento das infecções fúngicas superficiais era realizado com iodo, ácido salicílico, ácido benzóico, iodeto de potássio e iodeto de sódio. Com o desenvolvimento

da Química Farmacêutica, outras drogas com atividade antifúngica foram descobertas, incluindo produtos de síntese orgânica e os obtidos por biossíntese [32]

A realização de ensaios *in vitro* permite avaliar a atividade do antifúngico, que pode ser fungistática, quando inibe o crescimento, ou fungicida, quando causa a morte do fungo.

As drogas frequentemente utilizadas são: os derivados azólicos, demetilam o carbono 14 do esterol da parede celular do fungo, promovendo consequentemente a perda de constituintes celulares, bem como, causando falhas na absorção de nutrientes extracelulares importantes; as equinocandinas, que atuam inibindo a síntese da β -(1,3)-D-glucana, um importante componente da parede celular do fungo; e os poliênicos, que agem lesando a membrana citoplasmática do fungo, interferindo em sua permeabilidade [11,32,49,50].

Os testes de sensibilidade são padronizados por dois institutos reconhecidos, na América pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e na Europa pelo *European Committee on Antibiotic Susceptibility* (EUCAST) [47,48].

Estudos mostram que *Candida parapsilosis stricto sensu*, não tem apresentado sensibilidade frente a micafungina, podendo inclusive, agir como agente de seleção de cepas resistentes. *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* são mais sensíveis á micafungina [35].

TÉCNICAS MOLECULARES APLICADAS À EPIDEMIOLOGIA DE FUNGOS

A identificação e discriminação de subpopulações de uma espécie de micro-organismos são indispensáveis para reconhecimento de surtos de infecção, detecção de transmissão cruzada de patógenos nosocomiais, acompanhamento da rota de transmissão de infecções entre outras importâncias epidemiológicas. Muitas técnicas moleculares que são utilizadas para esse fim baseiam-se na separação de fragmentos ou moléculas de DNA, que diferem em tamanhos ou número [21,26,32].

Vários segmentos, aparentemente sem função específica, se repetem ao longo do DNA, apresentando variações específicas em cada indivíduo, como uma impressão digital do DNA. Cerca de 30% desses segmentos estão dispostos em regiões no genoma que apresentam seqüências repetitivas de nucleotídeos, e por isso são denominadas regiões microssatélites [52].

Com a utilização de iniciadores que flanqueiam as regiões de microssatélites é possível analisar várias regiões simultaneamente através da amplificação por produtos de reação de polimerização em cadeia (PCR) assim, a análise de microssatélites passa a ser uma importante ferramenta de investigação e, uma técnica de alto poder discriminatório para diferenciação de micro-organismos de mesma espécie [21,53].

Outra técnica realizada para diferenciação de micro-organismos do mesmo gênero é análise das variações de tamanho de fragmentos de DNA gerados por digestão com endonuclease de restrição (RFLP), onde são detectados variações de sequência no genoma, utilizando endonuclease para amostrar pequenos trechos de DNA amplificado por PCR. As endonucleases são enzimas que reconhecem sequências específicas e cortam o DNA nas proximidades do sítio de reconhecimento. Estes foram os primeiros marcadores utilizados para estudo de comparação de diferentes isolados [26,32].

JUSTIFICATIVAS

Infecções relacionadas à Assistência à Saúde (IrAS) têm sido um dos maiores problemas na saúde pública, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, elevando o custo e o tempo de permanência hospitalar.

O crescente número de óbitos entre pacientes hospitalizados provenientes de infecções por leveduras tem levado profissionais da saúde a buscar alternativas para medidas de controle. Nesse caso, a diferenciação entre aquisição exógena e endógena é importante, para que se possam instituir medidas apropriadas de controle e prevenção na transmissão horizontal de leveduras. Nesse quesito, as técnicas moleculares são ferramentas importantes na identificação de possíveis reservatórios de agentes infecciosos.

O uso de antifúngicos inespecíficos ou em subdosagem permite a seleção de micro-organismos resistentes. Portanto, a realização de testes para determinar a concentração inibitória mínima de cada antifúngico é importante, tanto para ampliar o conhecimento sobre a patogenicidade como auxiliar no monitoramento em ações de vigilância visando a prevenção das infecções.

Estudos nesse sentido contribuem para a conscientização da importância da lavagem correta das mãos, bem como da limpeza adequada dos fômites hospitalares, medidas de extrema importância na prevenção do carreamento de patógenos.

OBJETIVOS

GERAL

Avaliar o índice de colonização por leveduras em mãos da equipe de saúde e em superfícies da UTI de um hospital da região noroeste do Paraná e, conscientizar sobre a importância de medidas preventivas contra infecção hospitalar por leveduras.

ESPECÍFICOS

Analisar a frequência e diversidade de leveduras do gênero *Candida* sp presentes nas mãos da equipe de saúde que atua na UTI do hospital em estudo.

Determinar o perfil de sensibilidade de leveduras isoladas aos antifúngicos mais utilizados na prática médica.

Distinguir as leveduras do complexo *C. parapsilosis* dos isolados de mão e superfícies.

Divulgar os dados encontrados para contribuir com o controle de leveduras resistentes aos antifúngicos no ambiente hospitalar.

Referências Bibliográficas:

1. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Pediatria: prevenção e controle de infecção hospitalar. (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 2005.
2. Santos, AAM, Lopes, FFP, Cardoso, MRA, Serufo, J.C., Diagnóstico do controle da infecção hospitalar no Brasil. Programa de Pesquisas Hospitalares. 19p. 2005.
3. Ferraz Edmundo Machado, Ferraz Álvaro Antônio Bandeira, Bacelar Tércio Souto, D'Albuquerque Helena Suely T., Vasconcelos Maria das Dores Maia M., Leão Cristiano Souza. Controle de infecção em cirurgia geral: resultado de um estudo prospectivo de 23 anos e 42.274 cirurgias. Rev Col Bras Cir 2001; 28:17-26.
4. Colombo AL, Guimaraes T., Candiduria: a clinical and therapeutic approach. Rev Soc Bras Med Trop 2007; 40:332-337.
5. Tipple AF, Pereira MS, Hayashida M, Moriya TM, Silva e Souza AC. Teaching infection control: a theoretical and practical essay. Rev Lat Am Enfermagem 2003; 11:245-250.
6. Santos, LF, Junior,VFV, Santos AF, Alvarez, CCS, Pereira, CAS, Lopes, FA, et al. Potentials sources of hospital infection: tapes, adhesive tapes and nonsterile gloves. Rev Panam Infectol 2010;12:8-12.
7. Andrade, D, Angerami ELS, Padovani CR. Condição microbiológica dos leitos hospitalares antes e depois de sua limpeza. Rev. Saúde Pública 2000; 34:163-169.
8. Luzzati R, Allegranzi B, Antozzi L, Masala L, Pegoraro E, Azzini A, et al. Secular trends in nosocomial candidaemia in non-neutropenic patients in an Italian tertiary hospital. Clin Microbiol Infect 2005; 11:908-913.
9. Medeiros, AC, Neto, TA, Filho, AMD, Junior, FELP, Uchôa, RAC, Carvalho, MR. Infecção hospitalar em pacientes cirúrgicos de hospital universitário / Nosocomial infection in surgical patients of an University Hospital. Acta Cir Bras 2003; 18:15-18.
10. Oliveira, RDR., MAFFEI, CML, MARTINEZ, R. Infecção urinária hospitalar por leveduras do gênero *Candida*. Rev Ass Med Brasil 2001; 47:231-235.
11. Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobon AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. Clin Infect Dis 2010; 51:561-570.

12. Yu N, Kim HR, Lee MK. The First Korean Case of Candidemia due to *Candida dubliniensis*. Ann Lab Med 2012; 32:225-228.
13. Colombo AL, Guimaraes T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. Rev Soc Bras Med Trop 2003; 36:599-607.
14. Trabasso, P., Estudo clínico epidemiológico das infecções fúngicas em receptores de transplante de medula óssea no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas. 2001 [s.n.]. Tese (Doutorado em Clínica médica) Área de concentração: Clínica Médica – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
15. Rodriguez D, Almirante B, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL, Mensa J, Ayats J, et al. Predictors of candidaemia caused by non-albicans *Candida* species: results of a population-based surveillance in Barcelona, Spain. Clin Microbiol Infect. 2010 Nov;16(11):1676-82.
16. Slavin MA, Sorrell TC, Marriott D, Thursky KA, Nguyen Q, Ellis DH, et al. Candidaemia in adult cancer patients: risks for fluconazole-resistant isolates. J Antimicrob Chemother. 2010; 65:1042-1051.
17. Merenstein, D., Hu, H, Wang, C, Hamilton, P, Blackmon, M, Chen, H, Calderone, R, Li, D. Colonization by *Candida* species of the oral and vaginal mucosa in HIV-infected and noninfected women. AIDS Research and Human Retroviruses 2013; 29:30-34.
18. Roilides E, Farmaki E, Evdoridou J, Dotis J, Hatzioannidis E, Tsivitanidou M, et al. Neonatal candidiasis: analysis of epidemiology, drug susceptibility, and molecular typing of causative isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23:745-750.
19. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouer SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical center. J Clin Microbiol 2006; 44:2816-2823.
20. Tamura NK, Negri MF, Bonassoli LA, Svidzinski TI. Virulence factors for *Candida* spp recovered from intravascular catheters and hospital workers hands. Rev Soc Bras Med Trop 2007; 40:91-93.
21. Vaz C, Sampaio P, Clemons KV, Huang YC, Stevens DA, Pais C. Microsatellite multilocus genotyping clarifies the relationship of *Candida*. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 71:159-1562.

22. Luo G, Mitchell TG. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2860-2865.
23. Del Sal G, Manfioletti G, Schneider C. The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template. *Biotechniques* 1989; 7:514-520.
24. Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida*. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2006; 47:225-229.
25. Garcia-Effron G, Canton E, Peman J, Dilger A, Roma E, Perlin DS. Assessment of two new molecular methods for identification of *Candida*. *J Clin Microbiol* 2011; 49:3257-61.
26. Madingan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Brock: biology of microorganisms. 12a ed. Porto Alegre: Artmed; 2010.
27. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 2008; 46:2659-2664.
28. Butler, G., M. D. Rasmussen, M. F. Lin, M. A. Santos, S. Sakthikumar, C. A. Munro, E. Rheinbay, M. Grabherr, A. Forche, et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes 2009; *Nature* 459:657–662.
29. Mims C, Playfair J, Roytt I, Wakelin D, Williams R. *Microbiologia Médica*. 1 ed. São Paulo: Editora Manole Ltda; 1999.
30. Storti LR, Pasquale G, Scomparim R, Galastri AL, Alterthum F, Gambale W, et al. *Candida* spp. isolated from inpatients, the environment, and health practitioners in the Pediatric Unit at the University Hospital of the Jundiaí Medical College, State of São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012; 45:225-231.
31. Primo MGB, Ribeiro LCM, Figueiredo LFS, Sirico SCA, Souza MA. Adesão à prática de higienização das mãos por profissionais de saúde de um Hospital Universitário. São Paulo, Brasil. *Rev Eletr Enf* 2010; 12:266-271.
32. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. *Tratado de Micologia Médica Lacaz*. 9ª Edição; São Paulo: Editora Sarvier; 2002.

33. Karabey S, Ay P, Derbentli S, Nakipoglu Y, Esen F. Handwashing frequencies in an intensive care unit. *J Hosp Infect* 2002; 50:36-41.
34. Weichert S, Reinshagen K, Zahn K, Geginat G, Dietz A, Kilian AK, et al. Candidiasis caused by *Candida kefyr* in a neonate: case report. *BMC Infect Dis* 2012; 12:61.
35. Canton E, Espinel-Ingroff A, Peman J, del Castillo L. In vitro fungicidal activities of echinocandins against *Candida metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. parapsilosis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:2194-2197.
36. 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; 39:309-317.
37. Cordoba S, Vivot W, Bosco-Borgeat ME, Taverna C, Szusz W, Murisengo O, et al. Species distribution and susceptibility profile of yeasts isolated from blood cultures: results of a multicenter active laboratory-based surveillance study in Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2011; 43:176-185.
38. Romeo O, Delfino D, Cascio A, Passo CL, Amorini M, Romeo D, et al. Microsatellite-based genotyping of *Candida parapsilosis* sensu stricto isolates reveals dominance and persistence of a particular epidemiological clone among neonatal intensive care unit patients. *Infect Genet Evol* 2013; 13:105-108.
39. Yong, L, Hartmann, T, Tao, Z, Rong-ya, Y, Jun-hong, A, and Wen-ling, W. Breakthrough trichosporonosis in patients receiving echinocandins: case report and literature review. *Chin Med J* 2012; 125:2632-2635.
40. De Luca C, Guglielminetti M, Ferrario A, Calabr M, Casari E. Candidemia: species involved, virulence factors and antimycotic susceptibility. *New Microbiol* 2012; 35:459-68.
41. Ece G, Samlioglu P, Akkoçlu G, Atalay S, Kose S. The Evaluation of the Distribution of Yeast like Fungi '*Candida Species*' at a tertiary care center in western Turkey. *Int J Med Sci* 2012; 9:617-620.
42. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ng KP, Colombo A, et al. Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: a

- global assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol* 2008; 46:842-849.
43. Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* 2005; 43:284-292.
 44. Bonfietti LX, Szeszs MW, Chang MR, Martins MA, Pukinskas SR, Nunes MO, et al. Ten-year study of species distribution and antifungal susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates at a Brazilian tertiary hospital. *Mycopathologia* 2012; 174:389-396.
 45. Miranda L, Rodrigues EC, Costa SF, van der Heijden IM, Dantas KC, Lobo RD, et al. *Candida parapsilosis* candidaemia in a neonatal unit over 7 years: a case series study. *BMJ Open* 2012; 2:2-4.
 46. Bonassoli LA, Bertoli M, Svidzinski TI. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *J Hosp Infect.* 2005; 59:159-162.
 47. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast, 3rd ed. Approved stanard. CLSI M27-A3(28). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.2008.
 48. European Commitee on Antibiotic Susceptibility . Method for determination of minimal inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeast. Europea Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2002.
 49. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, et al. In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six year of global surveillance. *J Clin Microbiol* 2008; 46:150-156.
 50. Tascini C, Bongiorno MG, Tagliaferri E, Di Paolo A, Flammini S, Soldati E, et al. Micafungin for *Candida Albicans* pacemaker-associated endocarditis: A case report an review of the literature. *Mycopathologia* 2013; 175:129-134.
 51. Ramos A, Cabero M, Orden B, Angel-Moreno A, Fores R. Fungemia caused by *Rhodotorula mucilaginosa*. Report of two cases. *Rev Esp Quimioter* 2012; 25:76-78.
 52. Naidoo R, Chetty R. The application of microsatellites in molecular pathology. *Pathol Oncol Res* 1998; 4:310-315.
 53. Schlotterer C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 2000; 109:365-371.

CAPITULO II

Artigo: COMPLEXO *Candida parapsilosis* ISOLADO DE SUPERFÍCIES HOSPITALARES E DE MÃOS DE PROFISSIONAIS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA ADULTO.

COMPLEXO *Candida parapsilosis* ISOLADO DE SUPERFÍCIES HOSPITALARES E DE MÃOS DE PROFISSIONAIS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA ADULTO.

Candida parapsilosis COMPLEX ISOLATED FROM HOSPITAL SURFACES AND HANDS OF WORKERS IN AN ADULT INTENSIVE CARE UNIT.

E. M. S. Bettega,¹ E. S. B. Mansano¹, P. Bonfim-Mendonça², A. Fiorini¹, F. Tobaldini¹, T. I. E. Svidzinski³

Resumo:

No ambiente hospitalar há uma grande preocupação com as infecções causadas por leveduras, pois a microbiota nosocomial é rica em fungos em princípio considerados contaminantes. *Candida albicans* é a espécie de levedura mais encontrada em infecções hospitalares, porém, nos últimos anos vêm sendo observado aumento na frequência de infecções por outras espécies de *Candida* não-*Candida albicans* (CNCA). Este estudo teve como objetivo verificar se mãos de servidores e fômites de um hospital terciário no Paraná-Brasil são reservatórios das principais leveduras implicadas em Infecções Hospitalares Adquiridas. Para coleta das superfícies foram utilizados *Swabs* umedecidos em salina, e para coleta das mãos foram utilizados sacos plásticos contendo água destilada. A identificação foi realizada por microcultivo em ágar fubá Tween-80 e pela técnica PCR-RFLP amplificação do gene secundário álcool-desidrogenase (*SADH*), seguido de digestão com a enzima de restrição *BanI*. Foram isoladas leveduras em 47% das amostras de superfícies, sendo 21,42% identificadas como *C. parapsilosis* stricto sensu. Das amostras de mãos 75,4% das amostras foram positivas para leveduras, sendo 49,12% identificadas como *C. parapsilosis* stricto sensu. A análise das repetições microssatélites utilizando os marcadores CP1, CP6 e B5 mostrou 76 genótipos diferentes, formando 13 agrupamentos. O teste de concentração inibitória mínima foi realizado através da técnica de microdiluição em placa indicou que *C. parapsilosis* foi sensível a anfotericina B, fluconazol e voriconazol, e menos sensível à micafungina. Os resultados encontrados mostraram que não há uma fonte comum de contaminação na UTI adulto do hospital em estudo.

Palavras-chave: *Candida*, Reação em Cadeia da Polimerase, Infecção hospitalar, Superfícies, Mãos.

Correspondência do autor e pedidos de reimpressão: Svidzinski, T.I.E. Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá - UEM.

Av. Colombo, 5.790 • Jd. Universitário • Maringá - Paraná - Brasil • CEP 87020-900 • (44) 3011-4040

e-mail: terezinha.svidzinski@gmail.com

¹ Programa de pós graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia – Universidade Estadual de Maringá.

² Programa de pós graduação em Ciências da Saúde – Universidade Estadual de Maringá.

³ Departamento de Biomedicina e Análises Clínicas – LEPAC - Universidade Estadual de Maringá.

Abstract:

In the hospital environment there is a major concern with yeast infection because the nosocomial flora is rich in fungi considered usually contaminants. The most isolated yeasts species found in hospital infections is *Candida albicans*, but in recent years has been observed an increased frequency of infections by other non-albicans *Candida* (NAC) species. This study aimed to verify if hands of healthcare workers server and surfaces of a hospital from the northwestern of Parana state are reservoirs of the main yeasts involved in IRAs. The identification was by microculture on corn-meal agar supplemented with tween 80 and by amplification of the secondary alcohol dehydrogenase-encoding gene (*SADH*), followed by digestion with the restriction enzyme *BanI*. The yeasts found, 45.3% were identified as *C. parapsilosis* sensu stricto. The microsatellite repeats analysis with markers CP1, CP6 e B5 showed 76 different genotypes, forming 13 groups. The minimum inhibitory concentration test was performed by broth microdilution technique indicated that *C. parapsilosis* was sensitive to amphotericin B, fluconazole and voriconazole, and was less sensitive to micafungin. The results showed that there is not a common source of contamination in the adult ICU of the hospital under study.

Keywords: *Candida*, Polymerase Chain Reaction, infection, Surfaces, Hands.

Corresponding author and reprint requests: Svidzinski, T.I.E.; Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá - UEM.

Av. Colombo, 5.790 • Jd. Universitário • Maringá - Paraná - Brasil • CEP 87020-900 • (44) 3011-4040

E-mail: terezinha.svidzinski@gmail.com

¹ Programa de pós graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia – Universidade Estadual de Maringá.

² Programa de pós graduação em Ciências da Saúde – Universidade Estadual de Maringá.

³ Departamento de Biomedicina e Análises Clínicas – LEPAC - Universidade Estadual de Maringá.

Introdução:

As leveduras do complexo *C. parapsilosis* têm sido relatadas com frequência como agentes de fungemia no Brasil [1,2,3,4] e no mundo [5,6,7,8,9], sendo a maioria das vezes essas infecções são caracterizadas como Infecções Hospitalares Adquiridas IHA. A circulação de um determinado micro-organismo no hospital é um dos primeiros fatores predisponentes para o estabelecimento das IHA, e por isso tem sempre buscado estratégias para higienização de mãos [10,11].

Estudos revelam que *C. parapsilosis* ocupa o terceiro lugar de importância em infecção sanguínea por *Candida* spp e tem como principais fontes as mãos de profissionais e superfícies hospitalares [5,8,10,11]. Entretanto a maioria destes estudos foi realizada em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN), havendo poucos relatos sobre UTI Adulto (UTIA). Além disso, pouco é conhecido sobre a distribuição das espécies desse complexo entre as leveduras presentes em colonização de mãos e superfícies. Devido ao grande envolvimento de *C. parapsilosis* em Infecções Hospitalares Adquiridas (IHA) é importante a identificação do complexo que inclui *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* [13].

A identificação e classificação taxonômica de micro-organismos são indispensáveis para o reconhecimento de surtos de infecção, detecção de transmissão cruzada de patógenos nosocomiais, acompanhamento da rota de transmissão de infecções entre outras importâncias epidemiológicas [14].

O objetivo desse estudo foi identificar leveduras do complexo *C. parapsilosis*, verificar perfil de sensibilidade bem como a similaridade entre as cepas encontradas no ambiente da UTIA de um hospital no estado do Paraná-Brasil.

Materiais e Métodos:

Este estudo foi conduzido em um hospital geral conveniado ao Sistema Único de Saúde na região Noroeste do Paraná-Brasil. A enfermaria possui 110 leitos distribuídos em cinco especialidades médicas, e outros 16 leitos na UTI Adulto Tipo II, objeto deste estudo, onde atuam aproximadamente 60 profissionais em diversas funções.

Coleta e cultivo das amostras

No período de Janeiro a Março/2012 foram coletadas 98 amostras de diversas superfícies dos 16 leitos presentes na UTIA (teclados de computadores, teclados e botão regulador inferior de aparelhos de ventilação mecânica, teclados das bombas de infusão, grades protetoras e manivelas de regulação de altura da maca, superfícies de mesas de apoio e do balcão central, estetoscópios, bandejas de medicamentos, pastas de prontuários, torneira do bebedouro, telefones, maçanetas de gavetas). *Swabs* foram umedecidos em salina fisiológica adicionada de Tween-80 1% e em seguida foram colocados em contato com a região de cada superfície (aproximadamente 10cm²) por aproximadamente 30 segundos em movimentos circulares, cada swab foi então inserido em tubos cônicos esterilizados e imediatamente transportados, em caixas térmicas, até o laboratório onde foram incubados em 2ml de caldo Sabouraud acrescido de cloranfenicol por 48h a 25°C.

A coleta das amostras das mãos dos profissionais foi realizada com utilização de sacos plásticos, previamente esterilizados contendo 10ml de água destilada esterilizada. Cada participante inseriu as mãos direita e esquerda respectivamente em dois sacos, fazendo movimentos de fricção por 30s [15,16]. Os sacos foram amarrados, acondicionados em caixa térmicas e imediatamente levados ao laboratório. Foi cultivado 100µl de cada amostra em tubos cônicos contendo 2ml de caldo Sabouraud acrescido de cloranfenicol. Foram excluídas do estudo pessoas com ferimentos nas mãos ou que haviam lavado as mãos imediatamente antes da coleta..

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa envolvendo seres humanos, protocolo CAAE 0448.0.093.000-11.

Para os dois tipos de amostra, alíquotas do caldo Sabouraud foram semeadas em ágar base modificado HiCrome Candida (Himedia-India) e incubadas por 48h a 25°C, para triagem das colônias desenvolvidas.

Identificação

As colônias foram selecionadas conforme cor e textura, cada tipo macromorfológico foi semeado ágar Sabouraud inclinado e incubado por 24h a 35°C. A seguir foram avaliadas as características micromorfológicas em microcultivos feitos em lâmina com ágar-fubá (Himedia-India) acrescido de Tween-80 1% e inoculados por 48-72 horas a 25°C.

Para extração do DNA uma alçada foi cultivada em 5ml de caldo Sabouraud e incubado *overnight* à 25°C sob agitação. As leveduras foram lavadas duas vezes em água purificada e em seguida ressuspensas em 1 ml de tampão de lise (10mM de Tris-HCL pH8, 100mM de NaCl, 1mM de EDTA pH8,0, 1% de SDS e CaCl 2.5mM), acrescentado 6-8 pérolas de vidro e agitado em vórtex por 2 minuto, com intervalo de 1 minuto em banho de gelo. As células lisadas foram ressuspensas e transferidas para micro tubos, onde foi adicionado 7µl de proteinase K, mantido em banho-maria por uma hora a 60°C. Em seguida foi adicionado 300µl de acetato de amônio 7,5M (pH6,5). Foi homogeneizado em agitador de tubo e mantido em banho maria por mais 10 minutos a 65°C. Em seguida foi centrifugado por 10 minutos a 15.400g, recuperado o sobrenadante e adicionado 10µl de RNase (Invitrogen-USA) e mantido em banho maria por mais 2 horas a 37°C. O DNA genômico foi extraído como descrito por Chong *et al.* (2003) [17]. A concentração do DNA foi determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260nm e a pureza determinada em 260/280

nm. As amostras de DNA foram visualizadas em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5x (Tris-base 90 mM, Ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM pH 8,0).

A Reação em Cadeia da Polimerase associada com Polimorfismos de Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP), foi realizada segundo Mirhendi *et al*, (2006) [18], onde o espaçador transcrito interno (ITS) do rDNA ITS1-5.8S-ITS2 foi amplificado por PCR e clivado com a enzima *MspI* (New England Biolabs). A sequência dos oligonucleotídeos utilizados foram: para o iniciador forward ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e para o iniciador reverse ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1X. Foi utilizado como padrão de tamanho molecular 100 pares de base (pb) *ladder* (Invitrogen®).

Das leveduras identificadas como *C. parapsilosis* (*lato sensu*), foi amplificado por PCR o gene secundário álcool-desidrogenase (*SADH*). O produto da amplificação foi clivado com a enzima de restrição *Ban I* para identificação do complexo, segundo Tavanti *et al*, (2005) [12]. A reação foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1X. Foi utilizado como padrão de tamanho molecular de 100 pb *ladder* (Invitrogen®).

Análise de microssatélites pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os iniciadores usados para amplificação das sequências das regiões microssatélites em *C. parapsilosis* foram: CP1, CP6 e B5, segundo Sabino *et al* (2010) [19], usando 100 ng de DNA genômico em um volume de reação de 25 µl contendo tampão de PCR 1x, 0.2 mM de cada desoxinucleosídeo trifosfato, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 µM de cada iniciador, e 1 U da Taq polimerase (Invitrogen®). Depois de um período de pré-incubação a 95°C por 2 min, as amplificações por PCR foram realizadas em 28 ciclos sob as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 30s, anelamento em 54 ciclos a 60°C por 30s, e extensão a 72°C por 1 min com um passo final de extensão de a 72°C por 7 min.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% em tampão de corrida TBE 1X, com marcador de tamanho molecular 25 pb (Invitrogen). As condições de corrida foram 160 Volts por 5h e 30min. Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotodocumentados sob luz Ultra Violeta em sistema L-Pix (Loccus Biotecnologia). O tamanho dos fragmentos amplificados foi determinado pelo software de análise de imagens LabImage 1D (Loccus Biotecnologia). Os resultados foram expressos de acordo com o nome do *locus* testado e o tamanho dos alelos observados, em pares de bases. O Poder Discriminatório (PD) foi calculado para cada marcador, de acordo com o índice de Simpson [20].

Teste de sensibilidade aos antifúngicos

A sensibilidade aos antifúngicos foi determinada por microdiluição em caldo segundo o documento M27-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [21]. Os antifúngicos utilizados foram anfotericina B (Bristol- Myers Squibb), fluconazol (Pfizer), voriconazol (Pfizer) e micafungina (Astellas). As leituras foram feitas em leitor de microplacas Expert plus - ASYS® com filtro de 450nm. Como controle foi utilizado *C. parapsilosis* ATCC 22019. A concentração inibitória mínima foi determinada como a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento fúngico na presença dos azólicos e micafunfina, e 90% de anfotericina B.

Resultados

Identificação

Os resultados das culturas estão sumarizados na Figura 1. Várias amostras apresentaram mais de um tipo de colônia no meio cromogênico, somando um total de 223

isolados. *C. parapsilosis* foi a levedura mais frequente, representando 45,29% de todos os isolados. Houve crescimento dessa espécie de levedura em 21,42% das amostras de superfícies e em 49,12% das mãos dos servidores. A distribuição dos isolados de *C. parapsilosis* obtidas de mãos de profissionais que atuam na UTIA está representada, por categoria, na Tabela 1, e a distribuição de *C. parapsilosis* encontradas nas superfícies está contida na Tabela 2. A clivagem pela enzima *MspI* permitiu ainda confirmar a avaliação micromorfológica e identificar 9 *C. albicans* (4,3%); 9 *C. tropicalis* (4,3%); 5 *C. krusei* (2,2%); 3 *C. glabrata* (1,3%). As demais colônias foram descartadas por esse protocolo de triagem.

A amplificação do gene *SADH* das amostras de *C. parapsilosis* mostrou bandas uniformes pouco acima de 700pb. A clivagem pela enzima de restrição *BanI* permitiu visualizar dois fragmentos de aproximadamente 500 e 200pb, confirmando que dentro do complexo, todas eram *C. parapsilosis stricto sensu* descartando assim a possibilidade de haver *C. metapsilosis* ou *C. orthopsilosis* entre as amostras isoladas.

Microsatélite

Para todos os isolados de *C. parapsilosis* foram obtidos produtos característicos de amplificação das regiões microsatélites. Um ou dois fragmentos de PCR por locus foram produzidos para cada isolado. Cada fragmento foi definido como um alelo, a detecção de dois produtos de PCR caracterizou as amostras heterozigotas, as demais foram consideradas homozigotas.

A análise dos 101 isolados de *C. parapsilosis* mostrou que todos os *loci* de microsatélites foram polimórficos. O PD da genotipagem de regiões de microsatélites, o

tamanho dos alelos, os números correspondentes de repetições e os genótipos determinados estão apresentados na Tabela 3. Ao todo foram encontrados 76 diferentes genótipos, dos quais a maioria correspondeu a um único isolado, somente 13 genótipos agruparam mais de um isolado, estes estão detalhados na Tabela 4. Não houve correlação entre as amostras de mãos e superfície.

De alguns isolados aleatórios foi extraído DNA em duplicidade e essas amostras foram inseridas à coleção para amplificação da região microssatélite em ensaio cego, todas apresentaram genótipos idênticos nas repetições.

Perfil de sensibilidade aos antifúngicos

A CIM das leveduras variou de 0,03-32µg/mL para fluconazol, 0,03-4,0µg/mL para voriconazol e micafungina e 0,03-2µg/mL para anfotericina B. O conjunto dos resultados do teste de sensibilidade está apresentado na Tabela 5.

Discussão

A UTI é o ambiente hospitalar mais susceptível às IHA, devido à rotina de procedimentos invasivos, tanto quanto pela debilidade dos pacientes [3,11,22]. As mãos dos profissionais são fundamentais na abordagem e manejo de doentes graves. Neste estudo, o índice de colonização por leveduras e a diversidade genética no grupo de enfermeiros foram altos (66,7%), bem como no grupo de técnicos em enfermagem (40%). Este índice de colonização por *Candida parapsilosis* é muito preocupante, tanto pelo fato de os enfermeiros serem encarregados de orientar os demais profissionais na educação em saúde, orientando quanto a correta lavagem das mãos na prevenção de IHA, como pelo fato de os técnicos de

enfermagem estarem frequentemente em contato direto com o paciente, onde o risco de contaminação é iminente.

Conforme Tabela 1 e 2 nós confirmamos o alto índice de colonização por *C. parapsilosis* *stricto sensu*, tanto em mãos de profissionais (49,12%) quanto em superfícies (21,42%) da UTIA. Esses resultados são equivalentes, quanto à colonização por *C. parapsilosis*, em mãos de profissionais que atuam em UTIN [3,4,11,23]. Entretanto, contrariamente ao esperado revelou ampla diversidade genotípica.

C. parapsilosis é um complexo de três espécies, com fenótipos muito semelhantes, diferenciado apenas por técnicas moleculares. A identificação das espécies desse complexo é importante para o tratamento de forma adequada, pois vários estudos citados por Garcia-Effron *et al* (2011) [24] mostram que há variação quanto a virulência e a sensibilidade aos antifúngicos. Em nosso estudo não foram encontradas *C. orthopsilosis* ou *C. metapsilosis*, confirmando relatos de outros autores sobre a baixa frequência dessas espécies em relação a *C. parapsilosis stricto sensu*, fato preocupante por ser essa a espécie mais resistente [4,8,23,25].

As IHA's por essa espécie sempre foram associadas com a transmissão cruzada envolvendo mãos de profissionais e superfícies hospitalares, contudo até onde sabemos os estudos de tipagem molecular não apresentaram dados suficientes para suportar essa hipótese [3,4,23].

A micafungina é o antifúngico mais recente introduzido no Brasil, para uso em ambiente hospitalar, no entanto o teste de sensibilidade revelou que 40,0% das *C. parapsilosis* não foram sensíveis à esta droga, este resultado é compatível com outros estudos, evidenciando que *C. parapsilosis stricto sensu* são pouco sensíveis à micafungina [26,27]. Amostras resistentes aos antifúngicos alertam para os cuidados com a higienização e

utilização correta dos equipamentos de proteção individual (EPI's), para evitar a contaminação dos pacientes, em especial pacientes já debilitados e imunocomprometidos.

A alta diversidade entre os isolados de *C. parapsilosis* encontrada neste estudo está de acordo com resultados obtidos por Romeo *et al* (2012) [25] contudo é intrigante, considerando a alta frequência dessa levedura em mãos, superfícies como também em IHA, seria esperado encontrar altos índices de similaridade. Entretanto diversidade genotípica também tem sido demonstrada por outros autores [19,23] mostrando que os marcadores de microssatélites são ferramentas úteis para distinguir epidemiologicamente isolados de *C. parapsilosis* para comprovar ou não transmissão cruzada.

Os 76 genótipos encontrados em 101 isolados, correspondem a pouco mais de uma levedura por genótipo, mostrando alta variabilidade. Somente 13 genótipos incluíam mais de um isolado variando entre 2 e 6 indivíduos com perfis idênticos, mas nenhum genótipo encontrado em mãos foi verificado em superfícies (Tabela 4). Observamos também que uma parcela considerável dos profissionais teve mais de um isolado de *C. parapsilosis* com genótipos diferentes em suas mãos. Em algumas superfícies também foram encontradas mais de uma *C. parapsilosis* com genótipos diferentes. Estes dados sugerem que não há uma fonte comum deste patógeno, contrariando a hipótese de contaminação cruzada entre superfícies e mãos dos profissionais da saúde.

Interessante notar que apesar do alto índice de colonização por essa espécie, é baixa a frequência de *C. parapsilosis* como agente de IHA nesse hospital, no período não foi detectado nenhuma hemocultura positiva para essa espécie em pacientes internados nesta unidade. A referida UTI atende pacientes com nível de complexidade médio, e o potencial de virulência dessa espécie de levedura é baixo, além disso é possível que as medidas de controle de IHA como lavagem das mãos e uso de luvas estariam sendo eficientes para evitar que

leveduras de mãos contaminem as superfícies e vice-versa, consequentemente impedindo a evolução para IHA. Ou seja, nossos resultados sugerem que embora *C. parapsilosis* seja frequente no ambiente hospitalar, fica evidente que pontos da etiopatogenia da candidemia por *C. parapsilosis* ainda não estão esclarecidos e a fonte ambiental deste micro-organismo como origem de IHA precisa ser melhor avaliada.

Em conclusão, nosso estudo revela que *C. parapsilosis* foi a levedura mais isolada em superfícies hospitalares e mãos de servidores da saúde que atuam em UTIA. Além disso, a ampla diversidade genética e a não relação entre amostras das superfícies e amostras das mãos abrem caminho para investigações no sentido de melhor explicar a alta frequência dessa espécie em IHA.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Micologia Médica - Departamento de Análise Clínica e Biomedicina do LEPAC-UEM. À Fundação Araucária, protocolo nº20559 pelo apoio financeiro; à CAPES e CNPq pelas bolsas concedidas à orientada e orientadora respectivamente.

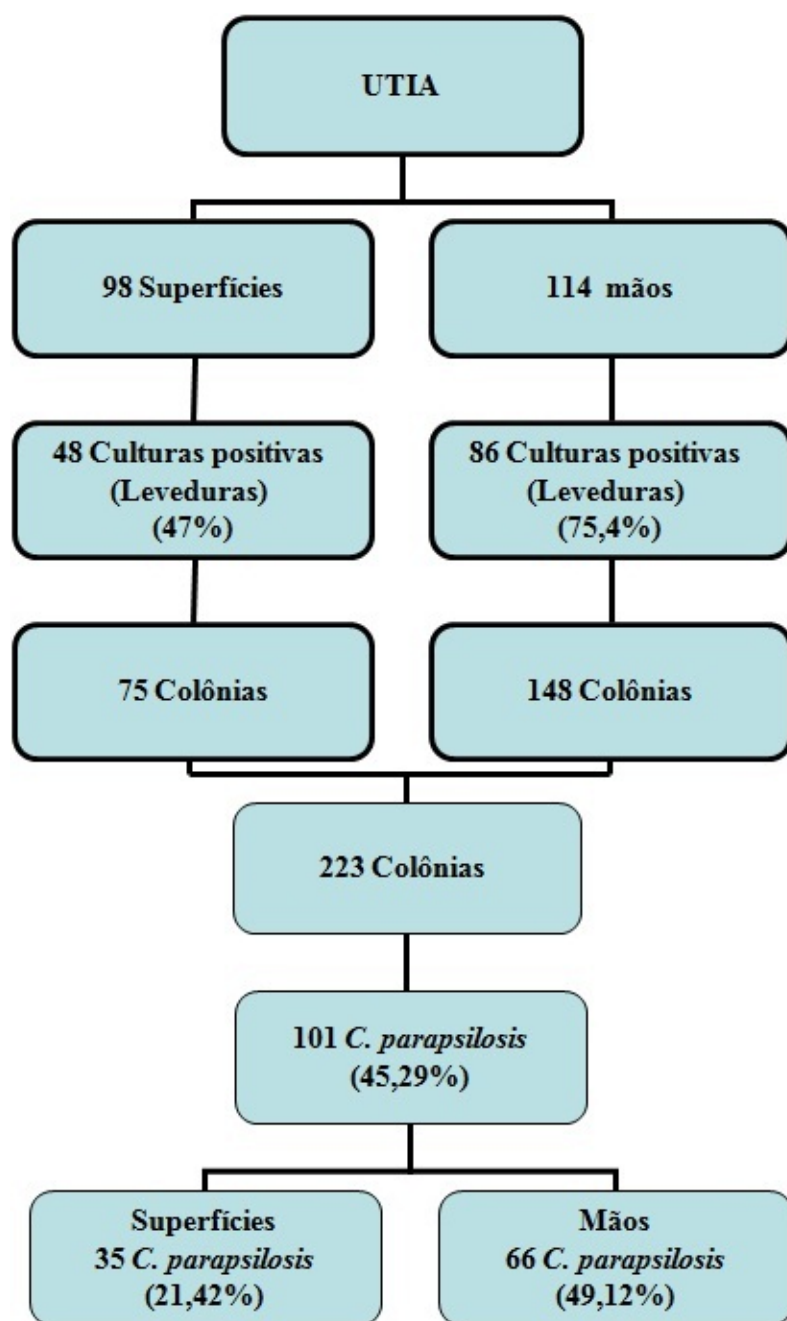


Fig 1 Diagrama da frequência de *C. parapsilosis* stricto sensu em colonização de mãos e superfícies abióticas de uma Unidade de Terapia Intensiva Adulto. A levedura foi identificada por micromorfologia, PCR-RFLP e confirmada pela presença do gene *SADH*.

Tabela 1. Distribuição dos funcionários* colonizados nas mãos por *Candida parapsilosis*, conforme a ocupação:

Função	<u>Profissionais</u>		<u>Nº de Isolados</u>	
	N	%	Mão Direita	Mão Esquerda
Técnico enfermagem	8	40	12	7
Enfermeiro	8	66,7	8	15
Auxiliar enfermagem	3	50	2	3
Médicos	3	50	4	5
Zeladora	1	33	2	1
Fisioterapeuta	2	100	1	2
Recepcionista	1	100	0	2
Copeiras	2	100	1	1
Total	28	49,12	30	36

*Todos eram destros

Tabela 2. Distribuição de superfícies contaminadas por *Candida parapsilosis*:

SUPERFÍCIES	Proporção	Nº de isolados de leveduras
Teclado do aparelho de ventilação mecânica	1/16	2
Manivela de regulação de altura da maca	3/16	5
Teclado das bombas de infusão de medicamentos	4/16	5
Superfície da mesa de apoio	3/16	6
Grades protetoras da maca	1/16	2
Botão regulador inferior do aparelho de ventilação mecânica	2/16	4
Puxadores do balcão da pia	1/1	2
Pasta de prontuário	4/16	8
Superfície do balcão central	1/1	1
Estetoscópio	1/16	1
Total	21/99	35

Tabela 3. Características dos *loci* dos microssatélites selecionados

Iniciador Microssatelite	Nº de Alelos	Intervalo de pares de base	Nº de Genótipos	PD
CP1	12	207-270	12	0,70
CP6	18	246-350	29	0,93
B5	17	95-163	12	0,89
(CP1 + CP6 + B5)	47	95-350	76	0,99

PD: poder discriminatório

Tabela 4. Descrição dos genótipos que agruparam mais de um isolado de *Candida parapsilosis* presentes em mãos de profissionais e superfícies de uma UTI adulto de um hospital geral do Paraná, Brasil

Genótipos	CP1	CP6	B5	No. de isolados	Fonte	Local: Box/Função
A2	240:240	273:273	114:103	4	Superfícies	- Box 03 – Mesa de apoio - Box 06 – Bomba de infusão - Box 13 – Ap. vent. mecânica - Box 15 – Ap. vent. mecânica
A3	240:240	270:270	114:103	3	Superfícies	- Box 03 - Bomba de infusão - Box 14 – Ap. vent. mecânica - Box 15 – Ap. vent. mecânica
A7	240:240	270:270	104:103	2	Superfície	- Box 03 - Mesa de apoio - Bomba de infusão
A13	240:240	300:300	114:103	2	Mãos	- Tec. Enfermagem (D/E)*
B1	240:207	270: 255	141:127	2	Superfícies	- Box 01 - Estetoscópio - Balcão central
B2	240:207	306:306	156:136	4	Superfícies	- Box 05 – Mesa de apoio - Box 08 – Mesa de apoio - Box 14 – Grade protetora da maca - Pasta de prontuário L15
B3	240:207	321:321	141:127	3	Mãos	- Zeladora - Tec. Enfermagem (2)
B7	240:207	300:300	141:127	6	Mãos	- Tec. Enfermagem (D/E)* - Enfermeiros (3) - Zeladora
B11	240:207	288:288	141:127	2	Mãos	- Médico - Enfermeiro
B21	240:207	330:330	156:136	2	Mãos	- Aux. Enfermagem - Zeladora
D1	237:207	306:306	141:127	2	Mãos	- Enfermeiro - Médico
D2	237:207	276:276	141:127	2	Superfícies	- Box 05 – Manivela reg. alt. maca - Pasta de prontuário L14
D5	237:207	306:306	163:145	2	Mãos	- Médico (D/E)*

* Mãos direita e esquerda da mesma pessoa

Tabela 5. Perfil de sensibilidade de *Candida parapsilosis* isoladas de superfícies e mãos de profissionais da saúde, frente a quatro antifúngicos testados pela metodologia de microdiluição em caldo (CLSI – M23 A4)

Antifúngicos	CIM ₅₀	CIM ₉₀	Variação
--------------	-------------------	-------------------	----------

		(μ l/ml)	
<i>Fluconazol</i>	0,5	2,0	0,03 – 32
<i>Voriconazol</i>	0,03	0,125	0,03 – 4,0
<i>Micafungina</i>	2,0	4,0	0,03 – 4,0
<i>Anfotericina B</i>	0,5	1,0	0,03 – 2,0

CIM₅₀ e CIM₉₀ foram definidos como a menor concentração de cada droga capaz de inibir 50% e 90% dos isolados, respectivamente. Os valores de variação correspondem respectivamente a menor e a maior CIM de cada droga.

Referências

01. Bonfietti LX, Szeszs MW, Chang MR, Martins MA, Pukinskas SR, Nunes MO, et al. Ten-year study of species distribution and antifungal susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates at a Brazilian tertiary hospital. *Mycopathologia* 2012; 174:389-396.

02. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouer SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical center. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:2816-2823.
03. Storti LR, Pasquale G, Scomparim R, Galastri AL, Alterthum F, Gambale W, et al. *Candida* spp. isolated from inpatients, the environment, and health practitioners in the Pediatric Unit at the University Hospital of the Jundiai Medical College, State of Sao Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012; 45:225-231.
04. Miranda L, Rodrigues EC, Costa SF, van der Heijden IM, Dantas KC, Lobo RD, et al. *Candida parapsilosis* candidaemia in a neonatal unit over 7 years: a case series study. *BMJ Open* 2012; 2:2-4.
05. Ece G, Samlioglu P, Akkoclu G, Atalay S, Kose S. The Evaluation of the Distribution of Yeast like Fungi '*Candida* Species' at a tertiary care center in western Turkey. *Int J Med Sci* 2012; 9:617-620.
06. Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobon AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis* 2010; 51:561-570.
07. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ng KP, Colombo A, et al. Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: a global assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol* 2008; 46:842-849.
08. Tay, ST, Na SL, Chong J. Molecular differentiation and antifungal susceptibilities of *Candida parapsilosis* isolated from patients with bloodstream infections. *J Med Microbiol* 2009; 58:185-191.
09. Yu N, Kim HR, Lee MK. The First Korean Case of Candidemia due to *Candida dubliniensis*. *Ann Lab Med* 2012; 32:225-228.
10. Monistrol O, Calbo E, Riera M, Nicolás C, Font R, Freixas N, Garau J. Impact of a hand hygiene educational programme on hospital-acquired infections in medical wards. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18:1212-1218.
11. Helder OK, van Goudoever JB, Hop WC, Brug J, Kornelisse RF. Hand disinfection in a neonatal intensive care unit: continuous electronic monitoring over a one-year period. *BMC Infect Dis* 2012; 12:248.
12. De Luca C, Guglielminetti M, Ferrario A, Calabr M, Casari E. Candidemia: species involved, virulence factors and antimycotic susceptibility. *New Microbiol* 2012; 35:459-68.
13. Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* 2005; 43:284-92.

14. Madingan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Brock: biology of microorganisms. 12a ed. Porto Alegre: Artmed; 2010.
15. Bonassoli LA, Bertoli M, Svidzinski TI. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. J Hosp Infect. 2005; 59:159-162.
16. Larson EL, Strom MS, Evans CA. Analysis of three variables in sampling solutions used to assay bacteria of hands: type of solution, use of antiseptic neutralizers, and solution temperature. J Clin Microbiol 1980; 12:355-360.
17. Chong, PP, Lee YL, Tan BC, Ng KP. Genetic relatedness of *Candida* strains isolated from women with vaginal candidiasis in Malaysia. J Med Microbiol 2003; 8: 657-660.
18. Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi 2006; 47:225-9.
19. Sabino R, Sampaio P, Rosado L, Stevens DA, Clemons KV, Pais C. New polymorphic microsatellite markers able to distinguish among *Candida parapsilosis sensu stricto* isolates. J Clin Microbiol 2010; 48:1677-82.
20. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol 1988; 26:2465-2466.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2008. Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast, 3rd ed. Approved standard. CLSI M27-A3(28). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008.
22. Weichert S, Reinshagen K, Zahn K, Geginat G, Dietz A, Kilian AK, et al. Candidiasis caused by *Candida kefyr* in a neonate: case report. BMC Infect Dis 2012; 12:61.
23. Vaz C, Sampaio P, Clemons KV, Huang YC, Stevens DA, Pais C. Microsatellite multilocus genotyping clarifies the relationship of *Candida parapsilosis* strains involved in a neonatal intensive care unit outbreak. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 71:159-162.
24. Garcia-Effron G, Canton E, Peman J, Dilger A, Roma E, Perlin DS. Assessment of two new molecular methods for identification of *Candida parapsilosis sensu lato* species. J Clin Microbiol 2011; 49:3257-3261.
25. Romeo O, Delfino D, Cascio A, Passo CL, Amorini M, Romeo D, et al. Microsatellite-based genotyping of *Candida parapsilosis sensu stricto* isolates reveals dominance and persistence of a particular epidemiological clone among neonatal intensive care unit patients. Infect Genet Evol 2013; 13:105-108.
26. Spreghini E, Orlando F, Tavanti A, Senesi S, Giannini D, Manso E, et al. In vitro and in vivo effects of echinocandins against *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*. J Antimicrob Chemother 2012; 67:2195-2202.

27. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol 2008; 46:2659-2664.

CAPITULO III

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com o presente estudo realizado com leveduras isoladas de superfícies e mãos de servidores que atuam em UTIA de um hospital na região noroeste do Paraná demonstraram que:

- 1) Mãos e fômites hospitalares são importantes reservatórios de *Candida parapsilosis* e outras leveduras de importância médica.
- 2) Todos os isolados de *Candidas parapsilosis* foram identificados como *Candida parapsilosis stricto sensu*
- 3) Apesar de apresentarem perfil de sensibilidade aos antifúngicos testados, foram encontrados isolados resistentes a drogas recentemente inseridas no mercado. Isso é preocupante, pois mesmo que encontrada em pequena quantidade, é um alerta para cuidados com a higienização e uso de EPI's.
- 4) Foi verificada alta diversidade genética entre *C. parapsilosis* isoladas de mãos e superfícies, não sendo possível relacionar as amostras dos diferentes sítios.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Para um eficiente método de prevenção devemos conhecer os micro-organismos ao nível de espécie. Portanto sugerimos continuidade do estudo para identificação genotípica das 89 leveduras ainda não identificadas pelos métodos utilizados, considerando a possibilidade de haver outros micro-organismos emergentes.

Ampliar este estudo através da realização de testes de fatores de virulência, aprofundando o conhecimento sobre as leveduras resistentes.

Diante da problemática das IrAS, podemos sugerir medidas de controle para prevenção de infecções cruzadas no ambiente hospitalar, desenvolvendo um estudo de educação em saúde.

Clinical Microbiology and Infection

© European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases



Edited By: Didier Raoult

Impact Factor: 4.54

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2011: 10/70

(Infectious Diseases); 22/114 (Microbiology)

Online ISSN: 1469-0691

Author Guidelines

Author Guidelines

Clinical Microbiology and Infection (CMI), the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, was initiated in 1995 and publishes manuscripts presenting the results of original research in clinical microbiology, infectious diseases, virology and parasitology, including immunology and epidemiology as related to these fields. The journal also publishes invited editorials and reviews, as well as guidelines and position papers originating from ESCMID Study Groups and ESCMID-sponsored conferences.

NEW POLICY

To allow rapid dissemination of original investigations and reduce the delays before publications, all accepted Original Articles exceeding 2500 words **submitted** after **1 March 2012** will be published **online-only**. Like all articles published in *CMI*, online-only Original Articles will be fully citable and indexed. Each Original Articles will have the abstract included in the accompanying print issue and be referenced in the table of contents.

SUBMISSION

PROCESS

Please see <http://mc.manuscriptcentral.com/cmi> for submission instructions. Manuscripts must be submitted via the account of the Corresponding Author.

Please enter author names in full, following the conventional use of capitalization (do not use either all lower case or all upper case).

Correct and individual email addresses must be entered for all authors (do not enter the corresponding author's address for co-authors; this will delay the review process until all co-author's addresses are furnished).

Please upload manuscripts as Word documents rather than pdf files.

In case of difficulty, please contact ScholarOne (Get Help Now in the upper right corner of the screen).

For security reasons, the Editorial Office is unable to provide passwords.

MANUSCRIPT CATEGORIES

Original Article

unstructured abstract (up to 250 words)
5-10 key words
2500 words maximum
4 to 5 tables/figures maximum (optional colour online)
30 references maximum

Research Note

unstructured abstract (up to 100 words)
5 key words
1000 words maximum (no subheadings)
2 tables/figures maximum
20 references maximum

NEW POLICY: To allow rapid dissemination of new, exciting and high quality preliminary primary research, all accepted Research Notes, **submitted** after **1 August 2011**, will be published **online-only**. Like all articles published in *CMI*, online-only Research Notes will be fully citable and indexed. Each Research Note will have the abstract included in the accompanying print issue and be referenced in the table of contents.

Editorials and Reviews

Please do not submit uninvited manuscripts. The Editorials and Reviews to be published during 2010 have been invited in conjunction with monthly themes. Proposals for Guest Editorship of a theme section for publication in 2011 are welcome.

ESCMID

Publications

Manuscripts from ESCMID Study Groups or proposals for publications originating from ESCMID Conferences should be discussed with the Editorial Office prior to submission.

Please contact Didier Raoult (cmi.raoult@gmail.com) to propose a theme section or an ESCMID publication.

AUTHORSHIP

All named authors should have made a significant contribution to the overall design of the study or the execution of the work described, or both. The journal considers all authors to be responsible for the content of the entire paper. Individuals who supplied facilities, strains or reagents, or individuals who completed questionnaires should not be listed as authors but may be recognized in the Acknowledgement section, either collectively or individually. Similarly, individuals who critiqued the manuscript or gave advice should be acknowledged but are not considered authors.

Authors are encouraged to describe their actual contributions to a study/paper in a section entitled Authorship/Contribution which will be published below the Transparency Declaration.

For guidelines: <http://www.councilscienceeditors.org/services/authorship.cfm>,
<http://www.acponline.org/journals/resource/unifregr.htm>

ACKNOWLEDGEMENTS

Acknowledged individuals must be named in full and must agree to their acknowledgement. All results presented previously at a scientific meeting or in another public context must be acknowledged, giving the context, location and date of presentation. Previously published material or illustrations must be accompanied by the written permission of the copyright holder.

TRANSPARENCY DECLARATION

NEW POLICY: CMI upholds the most rigorous standards of transparency, as defined by the International Committee of Medical Journal Editors. Each online submission must be accompanied by a Conflict of Interest Disclosure Form:

http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf

One form should be completed by the corresponding author on behalf of all co-authors. It is the corresponding author's responsibility to ensure that co-authors' disclosures are included. Individual authors should be named in the 'Comments' section of any question where a declaration is made.

Upload this document along with your other manuscript files via CMI ScholarOne Manuscripts, selecting the file designation 'Submission Document'.

If no funding or conflicting interests are declared on the form, the following sentence will appear at the end of the article:

“The authors declare no conflicts of interest.”

For guidelines: <http://www.icmje.org>

MANUSCRIPT REQUIREMENTS

TEXT

Manuscripts must be submitted in English, using British spelling. Authors unsure of English usage should consult someone proficient in the English language. Nonconformity to accepted standards of English usage or journal style may delay both the review and the editorial process. Brevity is an advantage as well as a requirement (see length restrictions under Manuscript Categories). In particular, text should not be repeated in more than one section; text and tables/figures should not be redundant. Consistency is important; contributions from different authors and text from different sources must be rewritten to create a coherent and homogenous text.

FORMAT

All manuscripts must be double-spaced, with wide margins, and should have continuous line numbers throughout.

TITLE PAGE

All submissions in all manuscript categories must include a title page indicating the intended category, the title, the full names and institutional affiliations of each author, a running title of up to 55 characters, and a complete postal address, email address, and international telephone and fax numbers for the single Corresponding Author (telephone and fax numbers will not be published).

ILLUSTRATIONS AND FIGURES

All colour illustrations and figures are published in print and on-line, free of charge to the author.

Data reported in tables or figures should not be repeated in the text. Figures should be submitted electronically, with a high resolution (at least 300 dpi). Please save artwork as EPS files and bitmat files as TIFF. Ideally, vector graphics that have been saved in metafile (.WMF) or pict (.PCT) format should be embedded within the body of the text file. Please avoid using tints. Detailed information on digital illustration standards is available at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp.htm>. Hard copy of all figures must be retained by the authors and may be required during the publication process. Hard copy figures should be professionally prepared in the form of high-quality photographic prints (not less than 13 x 18 cm) or electronically produced laser prints on A4 bonded paper. Please be aware that all illustrations will be significantly reduced in size for publication (often to a single column width). All descriptive or explanatory captions should be typed double-spaced on a separate page following text and tables, and should include full explanations of any abbreviations used in the figure. In the full-text online edition of the journal, figure legends may be truncated in abbreviated links to the full screen version. Therefore, the first 100 characters of any legend should inform the reader of key aspects of the figure.

TABLES

Each table should be presented on a separate page with a descriptive or explanatory title, and numbered consecutively as cited in the text. Wherever possible, tables should be typed as text, using 'tabs' to align columns. The use of table editors should be avoided, as should graphics software. Please do not use paragraph returns within tables to indicate spacing within blocks of text; use instead a soft return (shift, return). Abbreviations may be used, but must be explained in full as footnotes. Units of measurement must be clearly indicated.

SUPPORTING INFORMATION (formerly SUPPLEMENTARY MATERIAL)

Extensive data sets or large figures may appear as Supporting Information on line. In this case, it remains the authors's responsibility to ensure that all figures or tables are illustrative of the text, but not redundant, and presented in such a way that non-specialist readers are likely to find the information understandable. Supporting Information will appear in colour as deemed appropriate.

ETHICAL CONSIDERATIONS

Reports of research involving human subjects must include a statement in the Methods section that informed consent was obtained, as well as a statement of approval by a local human investigations committee. Similarly, experiments involving animals must have been conducted under appropriate licensing/approval arrangements, details of which should be included in the Methods section.

REFERENCES

Authors are responsible for the accuracy and completeness of all references and are also responsible for ensuring that references are not used out of context. References should be numbered sequentially in the text in square brackets before punctuation marks, according to the Vancouver style. (Examples of references following).

Article

Henriques Normark B, Normark S. Antibiotic tolerance in pneumococci. Clin Microbiol Infect 2002; 8: 613-622.

Article from a Supplement

Nikaido H. Crossing the envelope: how cephalosporins reach their targets. Clin Microbiol Infect 2000; 6 (suppl): 22-26.

Book

Finch RG, Greenwood D, Norrby SR, Whitley RJ, eds. Antibiotic and chemotherapy. 8th edn. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2003.

Chapter from a Book

Jacoby G, Bush K. *f*-Lactam Resistance in the 21st Century. In: White DG, Alekshun MN, McDermott PF, eds. Frontiers in antimicrobial resistance. Washington, D.C.: ASM Press, 2005: 53-65.

Meeting Abstracts, Websites and Databases, Articles in press

Meeting abstracts are not acceptable as references within the Methods section, but are acceptable as preliminary unpublished results (if not older than 2 years) and should be cited parenthetically within the text rather than in the list of References (e.g. 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, abstract XXX). Similarly, references to websites or databases should be made parenthetically within the text, as should references to unpublished data, personal communications and articles submitted for publication. Copies of manuscripts in press or submitted manuscripts should be uploaded at the time of submission to facilitate the review process.

EDITORIAL PROCESS / PEER REVIEW

An automated message confirming receipt is sent upon submission. Please be aware that the submission process is not complete until you receive this message indicating a tracking number (CLM-XX-XXXX).

Submissions are screened for completeness and quality of files and will not enter the review process until the online files are satisfactory.

Submissions are initially reviewed by the Editor-in-Chief and are either assigned to an Associate Editor or declined as being out of scope or lacking priority considering the current rate of rejection (c. 75%).

The peer review process is managed by Associate Editors who are responsible for assessing priority and for selection of reviewers.

Submissions may be declined without external review as deemed appropriate by the Editor-in-Chief and Associate Editors.

Correspondence concerning papers that have been reviewed externally is between the Editor-in-Chief or an Associate Editor and the Corresponding Author.

Revised submissions are handled directly by the Editor-in-Chief or an Associate Editor and should be resubmitted within 6 weeks. The intent is a short-term process of revision; however, some submissions may require several revisions. Although unusual, a submission may be declined after revision if the response to suggestions and requests is deemed incomplete or inadequate.

The current status of submissions is available via your Author Centre (select the appropriate category under My Manuscripts and view status on the right side of the screen). Do not contact ScholarOne concerning editorial status.

Questions concerning the editorial process or an editorial decision should be addressed to the Editor-in-Chief (cmi.raoult@gmail.com)

PUBLICATION

COPYRIGHT / EXCLUSIVE LICENSE

An Exclusive License Form, which grants to Wiley-Blackwell the exclusive right to publish an article on behalf of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, must follow each accepted manuscript. Authors remain the copyright owner of the article.

Do not send an Exclusive License Form until a submission has been accepted. Forms are available from the submission website and here: [CMI Exclusive License Form](#).

Forms should be sent to:

Production Editor, Clinical Microbiology and Infection, Wiley-Blackwell, 101 George Street, Edinburgh, EH3 2ES; Fax: +44 131 226 3803.

ONLINEOPEN

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee (currently \$3000) to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see: http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms.

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: <https://onlinelibrary.wiley.com/onlineOpenOrder>

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

PAGE PROOFS

Page proofs will be made available to the Corresponding Author and, if corrections are required, these should be returned within three days of receipt to the Publisher (in case of absence, arrangements should be made for a colleague to correct the proof pages). If corrections are not received, approval for publication is assumed. Notification will be sent by email with a link to a secure server where the proof pages will be available as an Acrobat pdf file. Acrobat Reader is required to read this file; software can be downloaded (free of charge): <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

REPRINTS

A pdf file will be made available to the Corresponding Author for purposes of creating reprints for personal use. To purchase reprints for commercial purposes or wide distribution, use the reprints order form which will be included with the proof pages.

