



**Carolina Maria da Silva**

**INFECCÕES FÚNGICAS INVASIVAS EM NEONATOS, EPIDEMIOLOGIA E  
PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA DOS AGENTES  
ETIOLÓGICOS**

**RECIFE  
NOVEMBRO/2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**INFECÇÕES FÚNGICAS INVASIVAS EM NEONATOS, EPIDEMIOLOGIA E  
PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA DOS AGENTES  
ETIOLÓGICOS**

**Carolina Maria da Silva**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

**Área de Concentração:** Micologia aplicada

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rejane Pereira Neves

**Co-orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosemary de Jesus Machado Amorim

**RECIFE  
NOVEMBRO/2011**

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Carolina Maria da

Infecções fúngicas invasivas em neonatos, epidemiologia e perfil de susceptibilidade antifúngica dos agentes etiológicos / Carolina Maria da Silva. – Recife: O Autor, 2015.

67 f.: il.

Orientadores: Rejane Pereira Neves, Rosemary de Jesus Machado Amorim

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia de Fungos, 2015.

Inclui referências e anexos

1. Micologia médica 2. Fungos I. Neves, Rejane Pereira (orient.) II. Amorim, Rosemary de Jesus Machado (coorient.) III. Título.

616.96901

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-059

**INFECCÇÕES FÚNGICAS INVASIVAS EM NEONATOS, EPIDEMIOLOGIA E  
PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA DOS AGENTES  
ETIOLÓGICOS**

**CAROLINA MARIA DA SILVA**

Data da defesa: 29 de novembro de 2011

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**MEMBROS TITULARES**

---

Dr<sup>a</sup> Rejane Pereira Neves – (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr<sup>a</sup>. Oliane Maria Correia Magalhães  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr<sup>a</sup> Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo  
Universidade Federal de Pernambuco

**MEMBRO SUPLENTE**

---

Dr<sup>a</sup> Ana Beatriz Sotero  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr<sup>a</sup> Neiva Tinti de Oliveira  
Universidade Federal de Pernambuco

“Nunca se afaste de seus sonhos, pois se eles forem você  
continuará vivendo, mas terá deixado de existir.”

(Charles Chaplin)

## ***DEDICO***

*À Deus por ter me dado a vida e me guiar pelo caminho certo,  
aos meus pais Cláudia e Carlos, aos meus queridos avós Suely e Carlos,  
à minha irmã Carla e ao meu pequeno Arthur  
por estarem sempre ao meu lado e me ensinarem  
que o maior bem que podemos ter é a família.*

***OFEREÇO***

*A todos os neonatos das Unidades de Terapia  
Intensiva do Instituto de Medicina Integral Professor  
Fernando Figueira e do Hospital Agamenon Magalhães*

## AGRADECIMENTOS

A todos os pequenos pacientes, especialmente queridos que, por causa da doença, fizeram parte deste trabalho. A todos que me ajudaram no desenvolvimento desse trabalho, de forma direta ou indireta. Não posso deixar de agradecer primordialmente a minha família, pois sem seu apoio, com certeza eu não teria chegado onde cheguei hoje, muito obrigada mãe, pai e avós. Também agradeço aos meus amigos e mestres em especial a minha querida orientadora Professora Rejane Pereira Neves por todos os ensinamentos e apoio, à Professora Oliane Maria Correia Magalhães pela amizade e sabedoria, à Mestre Ana Maria Rabelo de Carvalho Parahym por ter me apoiado e acompanhado ao longo de toda esta trajetória, a minha co-orientadora Doutora Rosemary Amorim pelas importantes orientações nos momentos de dificuldade, ao Doutor Moacir Jucá por ter permitido a realização do meu projeto e ter colaborado com este. Cada uma dessas pessoas deixou em mim lembranças, ensinamentos e carinho. Em momentos especiais como este, gostaria de abraçar bem forte um por um e dizer muito obrigada, foi uma honra e um imenso prazer estar ao seu lado. Não poderia deixar de agradecer também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e a Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco por ter me dado a oportunidade de obter essa formação.

## RESUMO

Infecções fúngicas invasivas têm se tornado cada vez mais frequentes em neonatos, principalmente devido ao aumento da sobrevivência de prematuros e a deficiência do sistema imune. Dessa forma, torna-se relevante o conhecimento dos fatores epidemiológicos e susceptibilidade aos antifúngicos, uma vez que permitem o melhor conhecimento dos fatores associados à doença e a resistência dos agentes etiológicos, além da concentração ideal do medicamento a ser administrado para inibir e /ou matar o agente causal da infecção. Nesse contexto, os objetivos deste estudo foram diagnosticar candidemia em neonatos, associando os fatores epidemiológicos predisponentes e o perfil de susceptibilidade às drogas antifúngicas dos agentes etiológicos. No período de março de 2010 a julho de 2011, foram feitas coletas das amostras clínicas em neonatos de Unidades de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital Agamenon Magalhães e do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira. O diagnóstico micológico foi realizado através do exame direto, cultura e identificação dos agentes etiológicos. Foram coletadas amostras de sangue de 301 pacientes e isoladas 30 culturas, sendo identificadas *Candida albicans* (11), *C. parapsilosis* (11), *C. pelliculosa* (5), *C. glabrata* (1), *C. guilliermondii* (1) e *C. tropicalis* (1). Dos 30 pacientes com hemoculturas positivas para fungos, 90% eram pré-termos, 60% do sexo masculino, 93,4% possuíam peso ao nascer inferior a 2,5kg e as condições clínicas mais associadas foram icterícia e síndrome do desconforto respiratório. A grande maioria dos pacientes fazia uso de dispositivo terapêutico invasivo, destacando-se nutrição parenteral (96,7%) e cateterismo umbilical (73,3%). Quanto à susceptibilidade antifúngica todos os isolados de levedura foram sensíveis a anfotericina B, porém foi observada resistência ao fluconazol e voriconazol, principalmente por *C. albicans*, e 7 dos 11 isolados de *C. parapsilosis* foram resistentes a anidulafungina. As infecções fúngicas invasivas são frequentes em neonatos, permanecendo as espécies de *Candida* como as mais isoladas. Pacientes prematuros de baixo peso e que fazem uso de dispositivos invasivos são os mais acometidos, o conhecimento destes dados aliados aos resultados de susceptibilidade antifúngica *in vitro* possibilitam a prevenção e o tratamento mais adequado destas infecções.

**Palavras-chave:** Neonatos, Infecção fúngica invasiva, Susceptibilidade antifúngica

## ABSTRACT

Invasive fungal infections have become increasingly frequent in neonates, due to the increased survival of premature and disability of the immune system. The knowledge of epidemiological factors of these infections, as well as testing susceptibility to antifungal agents is relevant in this group of patients, because they allow a better understanding of the factors associated with the disease, the evaluation of the occurrence of fungal resistance, and the optimal concentration of the drug to be administered to inhibit and / or kill the agent of infection. In this context, the objectives of our study were to detect candidemia in neonates, the epidemiological factors associated with these infections and determine the antifungal susceptibility profile of the isolates. The samples were collected in the Neonatal Intensive Care Units from Agamenon Magalhães Hospital and Institute of Integrative Medicine Fernando Figueira, according to the medical request, from March 2010 to July 2011. The samples were manipulated to perform the direct examination and culture and then purified and identified. Samples were collected from 301 patients and we had isolated yeasts in 30 samples of blood, they were identified as *Candida albicans* (11), *C. parapsilosis* (11), *C. pelliculosa* (5), *C. glabrata* (1), *C. guilliermondii* (1), *C. tropicalis* (1). Of the 30 patients with positive blood cultures for fungi, 90% were preterm, 60% male, 93.4% had birth weight below 2.5 kg and the more usual conditions associated were clinical jaundice and respiratory distress syndrome. The vast majority of patients used invasive therapeutic device, especially parenteral nutrition (96.7%) and umbilical catheterization (73.3%). The antifungal susceptibility showed that all isolates were sensible to amphotericin B but some were resistant to fluconazole and voriconazole, mainly species of *C. albicans*, and 7 of 11 isolates of *C. parapsilosis* were resistant to anidulafungin. Invasive fungal infections are common in neonates, remaining *Candida* species as the most isolated. Preterm infants with low birth weight and use of invasive devices are the most affected and this knowledge combined with the *in vitro* antifungal susceptibility results enables a better prevention and treatment of these infections.

**Key-words:** Neonates, Invasive fungal infections, Antifungal susceptibility

## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
<b>Capítulo 3</b>	
Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR dos isolados de <i>Candida</i> com par de primer espécie-específico <i>Candida pelliculosa</i> . Linhas de 1 a 5 correspondem aos isolados: 6345, 6283, 6281, 6280, 6279 linha B a ATCC 750 <i>C. tropicalis</i> . M: 100-bp marcador de DNA. ....	35
<b>Capítulo 5</b>	
Figura 1 - A – Células de leveduras brotantes, ovais e hialinas em amostra de sangue, observadas ao exame direto; B – Cultura de <i>Candida</i> após cinco dias de crescimento a 35° C.....	56
Figura 2 - Condições clínicas pertinentes aos neonatos com candidemia.....	57

## Lista de tabelas

<b>Capítulo 3</b>	<b>Pág.</b>
Tabela 1 – Concentração inibitória mínima das leveduras isoladas de neonatos hospitalizados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal.....	36
<b>Capítulo 4</b>	
Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (CIM) de isolados de <i>Candida</i> obtidos de hemoculturas de neonatos provenientes de Unidades de Terapia Intensiva frente à anidulafungina .....	45
<b>Capítulo 5</b>	
Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (CIM) de isolados de <i>Candida</i> obtidos de neonatos provenientes de Unidades de Terapia Intensiva frente à anfotericina B, fluconazol, voriconazol e anidulafungina.....	58

## SUMÁRIO

	<b>Pág.</b>
1. INTRODUÇÃO .....	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	15
2.1. Infecções fúngicas invasivas em neonatos .....	15
2.1.1. Candidemias .....	16
2.2. Principais espécies de <i>Candida</i> envolvidas em infecções invasivas .....	17
2.3. Susceptibilidade antifúngica .....	20
2.3.1. Anfotericina B .....	21
2.3.2. Fluconazol .....	22
2.3.3. Voriconazol .....	23
2.3.4. Anidulafungina .....	24
3. FUNGEMIA POR <i>CANDIDA PELLICULOSA (PICHIA ANOMALA)</i> EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL: UMA POSSÍVEL ORIGEM CLONAL .....	25
Resumo.....	27
Abstract .....	28
Introdução .....	29
4. SUSCEPTIBILIDADE DE ISOLADOS DE <i>CANDIDA</i> PROVENIENTES DE NEONATOS HOSPITALIZADOS EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL À ANIDULAFUNGINA .....	37
Resumo .....	39
Abstract .....	40
Introdução .....	41
Materiais e Métodos .....	42
Resultados .....	43
Discussão .....	43
5. CANDIDEMIA EM NEONATOS: EPIDEMIOLOGIA E SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i> .....	46
Resumo .....	48
Abstract .....	49
Introdução .....	50
Materiais e Métodos .....	51

Resultados .....	53
Discussão.....	54
6. CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60
ANEXOS .....	68

## 1. INTRODUÇÃO

A incidência de infecções fúngicas invasivas em infantes, anteriormente consideradas raras, tem se tornado crescente nas últimas décadas, sobretudo, devido ao aumento do número de crianças com imunossupressão tanto primária quanto secundária. Diversos fatores são responsáveis por este aumento, tais como maior sobrevivência de neonatos prematuros, quimioterapia agressiva utilizada em terapia anti-câncer e aumento do número de transplantes de órgãos e medula óssea (Arendrup 2009). O tempo de permanência hospitalar prolongado, destacando-se em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), bem como uso de antibioticoterapia de largo espectro e de dispositivos terapêuticos medico-invasivos, favorece a ocorrência de infecções fúngicas, sobretudo as nosocomiais severas em recém-nascidos (Melo *et al.*, 2009).

Infecções fúngicas invasivas ocorrem entre 5 a 20% dos neonatos de baixo peso, sobretudo nos que recebem tratamentos intensivos. A taxa de mortalidade atribuída é muito alta, alcançando uma taxa de aproximadamente 50% (Rao e Ali 2005).

A maioria dos fatores associados com o aumento do risco a infecções fúngicas está relacionada com as características epidemiológicas, incluindo condições clínica, dados demográficos dos recém-nascidos, prematuridade, status imunológico, dentre outras condições (Manzoni *et al.*, 2006). O conhecimento dos fatores epidemiológicos dessas infecções fúngicas e teste de susceptibilidade *in vitro* com os agentes etiológicos podem auxiliar na terapêutica a ser instituída e assim possibilitar melhores resultados ao tratamento. Assim, torna-se relevante a realização de testes de susceptibilidade antifúngica, uma vez que permitem a documentação do perfil de sensibilidade às drogas, o conhecimento da ocorrência de resistência fúngica e a concentração ideal a ser administrada para inibir e/ ou destruir o agente causal da infecção fúngica (Colombo e Guimarães 2007).

Devido à complexidade dos pacientes pediátricos com risco para infecções e a diversidade de patógenos fúngicos, micoses oportunistas se apresentam como desafios consideráveis para diagnóstico e terapia. Alguns fungos não são susceptíveis às terapias padrões e podem requerer o uso compostos antifúngicos, uma vez que o tratamento continuado com as drogas clássicas induz o desenvolvimento de resistência e alto grau de toxicidade (Walsh *et al.*, 2004a).

A padronização de testes de susceptibilidade a antifúngicos tem sido foco de intensas pesquisas, e atualmente estão sendo disponibilizados métodos de referência

(antifungigrama), tornando os laboratórios aptos a predizer o sucesso do tratamento (NCCLS 2002; Colombo e Guimarães 2007).

Dentro deste contexto os objetivos deste trabalho foram diagnosticar infecções fúngicas em neonatos e definir o perfil epidemiológico e de susceptibilidade antifúngica dos agentes etiológicos.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 INFECÇÕES FÚNGICAS INVASIVAS EM NEONATOS

As infecções nosocomiais são responsáveis por morbidade e mortalidade significativas no período neonatal, sobretudo em UTI. Este ambiente é considerado área crítica, devido às condições clínicas graves dos pacientes, bem como os procedimentos invasivos utilizados. Dentre as infecções frequentes em crianças internadas em UTI, tem sido evidenciada uma preocupação especial com as de etiologia fúngica (David 1998; Colombo *et al.*, 2006).

As infecções por fungos vêm ocorrendo com grande incidência e representam um alto risco para crianças e recém-nascidos portadores de neoplasias e outras condições imunossupressoras (Asmundsdottir *et al.*, 2001).

A sepse fúngica ocorre especialmente nos neonatos de muito baixo peso (até 1,5 kg ao nascer), sendo usualmente uma condição grave que acomete preferencialmente os recém-nascidos e, está relacionada à elevada morbi-mortalidade (Richtmann *et al.*, 2005). Os sinais clínicos são variados e usualmente, podem ser confundidos com os observados em infecções causadas por bactérias (Pedroso e Krebs 2008).

O padrão ouro para o diagnóstico de micoses sistêmicas causadas por fungos oportunistas é a detecção do fungo na cultura de sangue, líquido ou outro material biológico estéril associado aos sinais clínicos de infecção. Em geral esse quadro clínico é diagnosticada por volta da terceira semana de vida (Moreira 2005). Infelizmente, a capacidade de diagnosticado essas infecções é limitada, geralmente os resultados das culturas são conclusivas após uma semana ou até mais tempo (Benjamin *et al.*, 2003a). Em crianças prematuras, a sensibilidade das hemoculturas é bastante baixa. Um dos fatores que pode estar envolvido com essa reduzida sensibilidade é o volume de sangue coletado, o qual deve ser coletado em série, uma vez que a chance de detectar o microorganismo em apenas 1 ml de sangue é cerca de 65% menor. Hemoculturas com ausência de crescimento fúngico não descartam o diagnóstico de infecção (Moreira 2005).

A presença do fungo na corrente sanguínea determinando fungemia pode progredir para quadros septicêmicos. A septicemia é uma infecção severa comum em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN). Até mesmo nos casos não fatais, onde ocorre resposta terapêutica, podem ser constatadas seqüelas irreversíveis (Healy *et al.*, 2008).

Espécies de *Candida* ocupam entre o segundo e o quarto lugar das causas mais frequentes de sepse tardia em neonatos de muito baixo peso, sendo quase sempre procedida por fungemia, que é caracterizada por infecção da corrente sanguínea (Yalaz *et al.*, 2006).

### 2.1.1 Candidemias

Os casos mais freqüentes de fungemia ocorrem por espécies de *Candida*, sendo denominada de candidemia. Essa é uma das leveduroses mais prevalentes, principalmente por determinadas espécies fazerem parte da microbiota da pele e mucosas, favorecendo assim, a ocorrência de diversos quadros clínicos (Squibbs 1998; Carvalho *et al.*, 2003). A pele e mucosas são colonizadas em aproximadamente 60% dos neonatos criticamente doentes, progredindo para uma infecção invasiva (Kaufman *et al.*, 2001).

Fay e colaboradores em 2002 afirmam que a predisposição dos recém nascidos a candidemia ocorre devido ao sistema imune imaturo e pele sensível. Enfatizaram ainda, a importância da restrição de crescimento intra-uterino como fator de risco para candidíase sistêmica, destacando a intensa neutropenia apresentada pelos neonatos nos primeiros dias de vida. O desequilíbrio da microbiota ou lesão da mucosa gastrointestinal pode facilitar a infecção por espécies de *Candida*, uma vez que essas leveduras estão presentes no trato gastrointestinal e cavidade oral, aumentando assim o risco de infecção endógena (Vento e Cainelli 2003; Ribeiro *et al.*, 2004).

O uso de antibióticos de amplo espectro, baixo peso, prematuridade e o uso de dispositivos médico-invasivos, tornam os neonatos susceptíveis a adquirir candidemia (Agarwal *et al.*, 2004). Pedroso e Krebs (2008) ainda destacam a idade gestacional inferior a 28 semanas, uso de ventilação mecânica, nutrição parenteral, infusão de intralipídios por mais de sete dias e uso de drogas como histamina, corticosteróides e vasopressores, além de má-formação congênita e procedimentos cirúrgicos como fatores predisponentes.

Kossoff e colaboradores (1998), em estudo retrospectivo realizado em Norfolk, Estados Unidos da América (EUA), analisando 15 anos de candidemia em UTIN constataram a presença de *Candida* em 6,0% dos episódios de sepse associados a uma taxa de mortalidade de 33,3%. Stoll e colaboradores, em 2002, destacaram o aumento da prevalência de fungos nos casos de septicemia de origem hospitalar em UTIN, estando *Candida* spp. envolvida em 12% dos casos, em um estudo realizado seis anos antes, os mesmos autores destacam uma incidência de 9%. Segundo Benjamin *et al.* (2003b) a mortalidade atribuída a candidemia em neonatos é elevada, variando entre 25 a 54% , podendo chegar até 70% em prematuros de muito baixo peso.

França (2006) afirma que dentre as infecções fúngicas hospitalares, 78,3% correspondem ao gênero *Candida*, predominando *C. albicans*. A apresentação clínica é inespecífica, sendo o estado febril o dado clínico mais comum em quadros de fungemia, estando a mortalidade por esse tipo de infecção estimada entre 40% e 60%.

A ocorrência de infecções por espécies de *Candida* em berçários e UTINs segundo Baradkar *et al.* (2008) tem se tornado crescente, correspondendo de 9 a 13% das infecções hematogênicas na Índia .

Pedroso e Krebs (2008) em um período de dez anos de pesquisa em uma UTIN brasileira observaram a ocorrência de candidíase sistêmica em 26,7% dos recém nascidos com menos de 1,5 kg e uma predominância no sexo masculino (65%). Em outro estudo realizado por Kuzuco e colaboradores (2008) na Turquia, a maioria dos pacientes pediátricos e neonatais que apresentavam sinais de candidemia tinham histórico de uso de antibióticos, 67% receberam ventilação mecânica, 33%, nutrição parenteral e 24% com cateter venoso central implantado. Ainda em 2008 um estudo brasileiro conduzido por Xavier e colaboradores em UTIN constatou que dentre os neonatos acometidos por candidemia 68% tinham peso inferior a 1.500g, 92% eram prematuros, 100% faziam uso de cateter venoso central e 76% dos pacientes foram a óbito

Goel e colaboradores em uma pesquisa realizada em 2009 em UTIN indiana detectaram uma ocorrência de 8,1% de infecções sanguíneas por espécies *Candida*. Sendo a maior ocorrência entre pacientes do sexo masculino. Todos os neonatos eram considerados de muito baixo peso e receberam tratamento profilático com antibióticos. Outra associação relatada foi o uso de cateter venoso central em 71% dos pacientes acometidos.

Em estudo conduzido por Al-Sweih e colaboradores (2009) em uma UTIN do Kuwait, uma variedade de fatores de risco associados com o desenvolvimento de infecção invasiva por *Candida* em prematuros foram identificados, além do baixo peso e idade gestacional, destacando que 87% das crianças fizeram uso de dois ou mais antibióticos de amplo espectro, além disso, 82% recebiam nutrição parenteral, 78% faziam uso de cateter venoso central e 54% tiveram colonização prévia por espécies de *Candida*, principalmente no reto e traquéia.

## 2.2. PRINCIPAIS ESPÉCIES DE *CANDIDA* ENVOLVIDAS EM INFECÇÕES INVASIVAS

De acordo com Mokaddas *et al.* (2000) a incidência de candidemia em pacientes neonatos é freqüente destacando-se as causadas por *C. albicans*. Apesar de esta espécie ser historicamente a mais isolada, infecções causadas por espécies não-*albicans* tem sido comumente diagnosticadas nos últimos anos, com destaque para *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (Agarwal *et al.*, 2004).

Em um estudo coreano conduzido por Lee e colaboradores (2007) entre o período de 2001 a 2006, foi observada a seguinte distribuição de espécies envolvidas em candidemia neonatal: *C. albicans* (56%), *C. parapsilosis* (23%) e *C. glabrata* (15%), sendo *C. albicans* isolada mais frequentemente daqueles submetidos a intervenção cirúrgica, *C. parapsilosis* a partir de recém-nascidos prematuros e *C. glabrata* daqueles que apresentavam neutropenia.

Vendettuoli e colaboradores em 2008 também verificaram que *C. albicans* é a principal espécie capaz de causar infecção hospitalar em UTIN, entretanto, outras espécies não-*albicans* foram detectadas incluindo *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata*. Porém em uma pesquisa multicêntrica realizada por Sastre e colaboradores. na Espanha foi constatada a prevalência de *C. parapsilosis* (42%) dentre os agentes etiológicos de candidemia em recém-nascidos, seguido por *C. albicans* (38,5%), *C. tropicalis* (6,15%) e *C. glabrata* (4,6%).

Blyth *et al.* (2009) em um estudo realizado na Austrália comparando neonatos, crianças e adultos destacaram *C. albicans* e *C. parapsilosis* como espécies mais freqüentemente isoladas de neonatos e crianças. *C. parapsilosis* foi significativamente mais comum em neonatos (42,4%) e crianças (38,3%) contra 14,9% de ocorrência em adultos.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a principal via de transmissão de *C. albicans* é a vertical, de mãe para filho (Saiman *et al.*, 2001), causando rápidas e progressivas infecções da corrente sanguínea (Lupetti *et al.*, 2002).

De acordo com Castro *et al.* (2006) esta espécie é, sem dúvida alguma, a mais freqüentemente isolada de infecções fúngicas superficiais e invasivas em diferentes sítios anatômicos e em casuísticas de todas as partes do mundo. Trata-se de uma levedura com potencial patogênico bastante conhecido, apresentando como principais fatores de virulência a capacidade de aderência a diferentes mucosas e epitélios, o dimorfismo com formação de estruturas filamentosas que auxiliam a invasão tissular, a termotolerância significativa, e a produção de enzimas como proteinases e fosfolipases. Vendettuoli e colaboradores em 2009 destacaram *C. albicans* como sendo a principal espécie capaz de provocar infecção hospitalar em UTIN.

De acordo com Pfaller *et al.* (2008a) *C. parapsilosis* é a espécie não-*albicans* mais comumente isolada de culturas de sangue. Estudos laboratoriais têm demonstrado que *C. parapsilosis* é menos virulenta do que *C. albicans*, no entanto, vários fatores têm contribuído para uma maior distribuição dessa espécie, como a sua capacidade de se aderir a materiais de próteses e de se proliferar rapidamente na presença de altas concentrações de glicose. Além disso, isolados de *C. parapsilosis* formam biofilme com facilidade o que

pode contribuir com sua capacidade de aderir a cateteres e causar infecções sistêmicas em recém-nascidos prematuros que fazem uso de nutrição parenteral ou outros dispositivos invasivos (Shin *et al.*, 2001).

*C. parapsilosis* é encontrada frequentemente na pele, sendo de transmissão predominantemente exógena (Bonassoli *et al.*, 2005). Sua ocorrência é alta em crianças e recém-nascidos prematuros internados em UTIs. Os fatores de risco associados à transmissão são a nutrição parenteral e uso prolongado de cateteres (Cano *et al.*, 2005). É responsável por até um terço das candidíases neonatais na América do Norte (Fridkin *et al.*, 2006) e por mais de um quarto de todas as infecções fúngicas invasivas em neonatos de baixo peso nos EUA (Clerihew *et al.*, 2007).

Trofa e colaboradores (2008) documentaram que *C. parapsilosis* tem sido considerada um patógeno emergente, além de ser uma grande ameaça para o futuro, especialmente entre recém-nascidos internados em UTIN. Os autores afirmaram ainda que a tendência será aumentar o número de infecções por esta espécie, devido à frequente colonização das mãos dos profissionais de saúde e sua alta afinidade pela nutrição parenteral.

*C. pelliculosa* (teleomorfo *Pichia anomala*) é outra espécie de levedura, frequentemente encontrado em frutas, exsudatos de árvores, solo, vegetais e outros compostos orgânicos (De Hoog *et al.*, 2000). Alguns estudos afirmam que *C. pelliculosa* está presente na microbiota transitória da pele humana, garganta e sistema gastrointestinal. Essa espécie apresenta baixa virulência e não é um patógeno comum nos seres humanos. No entanto, pode levar a graves casos de infecções da corrente sanguínea. Ocasionalmente tem sido relatada como agente de fungemia nosocomial em pacientes pediátricos, imunocompetentes e imunocomprometidos (Bakir *et al.* 2004).

Existem relatos de neonatos pré-termos colonizados por essa espécie em unidades hospitalares, porém ainda não há evidências diretas que demonstrem que a infecção esteja relacionada com prévia colonização (Kalkanci *et al.*, 2010).

Alta prevalência em casos de candidemia no Brasil e no mundo também ocorrem por *C. tropicalis*, cujo mecanismo de transmissão é essencialmente endógeno (Cantón *et al.*, 2001). Essa espécie acomete com frequência, pacientes neutropênicos, que apresentam como doenças de base neoplasias e doenças hematológicas ou que sejam receptores de medula óssea (Leung *et al.*, 2002). Considera-se que 50 a 60% dos pacientes colonizados desenvolvam infecções sistêmicas (Colombo e Guimarães 2003). De acordo com Nucci e Colombo (2007) candidemia por *C. tropicalis* é mais frequentemente observada em pacientes com câncer e neutropenia; no entanto, em um estudo realizado pelos mesmos foi

observado um cenário clínico diferente, sendo esta espécie encontrada também como causa de fungemia em neonatos e pacientes não neutropênicos.

A terceira causa de candidemia na maioria dos países da Europa, Ásia e Américas corresponde à *C. glabrata* (Pfaller e Diekema 2007). Caracterizada por uma alta taxa de mortalidade e difícil tratamento devido à reduzida sensibilidade desta espécie aos derivados azólicos, especialmente ao fluconazol. Vários fatores de risco têm sido identificados, como longo tratamento com antibióticos, presença de cateter venoso central, baixo peso ao nascer, prematuridade, síndrome do desconforto respiratório e o uso de ventilação mecânica (Baradkar *et al.*, 2008). O aumento na incidência de infecções invasivas por esta espécie parece ser multifatorial, envolvendo o aumento do uso de fluconazol como profilático, especialmente em unidades de hematologia e transplante de células, além de diferenças geográficas. Vários estudos relatam que estas infecções são mais comum em adultos do que nos indivíduos mais jovens, e raramente são encontradas em recém-nascidos (Malani *et al.*, 2010).

Infecções hematogênicas e disseminadas também têm sido ocasionadas por *C. guilliermondii*, espécie considerada emergente e que tem demonstrado ser intrinsecamente menos susceptível a anfotericina B do que outras espécies do mesmo gênero (Pfaller e Diekema 2004a). Em um estudo envolvendo 11 instituições brasileiras, *C. guilliermondii* representou 2,4% dos 712 casos de candidemia diagnosticados (Colombo *et al.*, 2006).

Investigações de surtos envolvendo *C. guilliermondii*, devem ser avaliadas cuidadosamente, inclusive através de estudos moleculares em virtude desta espécie apresentar características morfológicas e bioquímicas indistinguíveis de *C. famata* (Medeiros *et al.*, 2007).

### 2.3 SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA

O aumento da incidência de micoses oportunistas tem sido acompanhado pelo fenômeno de resistência aos antifúngicos (Balkis *et al.*, 2002), cujo uso através de tratamentos empíricos e profilaxia de pacientes neutropênicos passou a ser um dos principais fatores de seleção de cepas resistentes (Mellado *et al.*, 2002; Sanglard 2002). Como conseqüência, tem emergido a necessidade de se realizar estudos de susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos que permitam prever a evolução clínica dos pacientes com infecção sistêmica. Para algumas drogas, no entanto, dificuldades de detecção de resistência e baixa correlação clínica são as maiores limitações dos métodos disponíveis atualmente (Cuenca-Estrella e Rodríguez-Tudela 2002). A respeito das dificuldades

metodológicas, em geral, os resultados obtidos nas provas de susceptibilidade têm utilidade prática na clínica e epidemiologia das infecções fúngicas invasivas (Perfect 2004).

Há evidências que amostras de *Candida* isoladas de pacientes de UTIN apresentam susceptibilidade diminuída aos agentes antifúngicos, devido ao aumento expressivo do seu uso (Roidiles *et al.*, 2004). Neste contexto, a determinação da susceptibilidade antifúngica dos agentes etiológicos é um passo importante na condução e eficácia do tratamento (Pfaller e Diekema 2004b); no entanto, é necessário um tempo considerável para isolar, identificar os organismos e determinar seu perfil de resistência. O atraso no início do tratamento antifúngico aumenta o risco de morbidade e mortalidade em crianças, inclusive neonatos, e também a probabilidade de contaminação cruzada (Avila-Aguero *et al.*, 2005).

Geralmente as drogas de escolha para o tratamento de recém-nascidos acometidos por candidemia são a anfotericina B pura ou combinada com fluocitosina, formulação lipossomal da anfotericina B ou fluconazol (Würthwein *et al.*, 2005). Contudo, o desenvolvimento de uma nova geração de azóis e equinocandinas tem aumentado as opções terapêuticas para o tratamento (Chapman 2007).

Uma série de novos agentes antifúngicos estão disponíveis para tratar candidemia com base em ensaios clínicos em adultos. Ainda há poucos estudos comparativos de agentes antifúngicos em recém-nascidos e crianças. Na prática médica o tratamento para esses pacientes se baseia em dados de ensaios clínicos de adultos. Os antifúngicos comumente utilizados são anfotericina B, fluconazol, voriconazol e anidulafungina (Blyth *et al.*, 2011).

### **2.3.1 Anfotericina B**

A anfotericina B, um antibiótico poliênico produzido naturalmente pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus*, foi inicialmente isolada em meados de 1955 (Gold *et al.*, 1956) e, desde então, apenas alguns agentes com ação antifúngica descoberta tornaram-se viáveis para o tratamento das infecções fúngicas sistêmicas. Seu mecanismo de ação é baseado na interação específica com o ergosterol, esteróide constituinte exclusivo da membrana celular fúngica, levando à formação de poros através de membranas lipídicas, a alteração da permeabilidade celular permite, portanto, o escape de íons e metabólitos, principalmente íons de potássio, levando eventualmente à morte celular (Bolard *et al.*, 1993).

Mesmo com a sua elevada toxicidade e a introdução de antifúngicos azólicos sistêmicos na década de 1980, a potência, o espectro de ação e os quase 50 anos de experiência clínica têm assegurado que este antifúngico permaneça como fármaco de escolha no tratamento da maioria das micoses sistêmicas (Dismukes 2000). Contudo, o seu

uso fica limitado por problemas de tolerabilidade, salientando-se a nefrotoxicidade e as reações ligadas à infusão. A emergência de resistências a este fármaco também começa a ter relevância clínica. Visando à diminuição da toxicidade deste antifúngico têm sido desenvolvidas formulações lipossomais, porém o custo destas é elevado e a penetração renal pode ser menor (Zaoutiz *et al.*, 2005).

Os limitados estudos de farmacocinética em recém-nascidos têm demonstrado níveis terapêuticos recomendados de anfotericina em regime de administração intravenosa de 0,5 a 1 mg / kg / dia, embora variabilidade individual significativa foi observada (Chapman 2007).

Resistência a anfotericina B é incomum entre as principais espécies associadas com infecção neonatal. Na população adulta tem sido reportada frequentemente resistência por isolados de *C. lusitaniae*, e ocasionalmente por *C. parapsilosis* (Chapman 2007).

Em um estudo utilizando-se cepas isoladas de pacientes hospitalizados em todo o continente americano, *C. albicans* foi a espécie mais suscetível à anfotericina B, verificado pela concentração mínima de 90% de inibição (CIM<sub>90</sub>) de 1,0 mg/mL, seguida de cepas resistentes de *C. glabrata* (CIM<sub>90</sub> 4,0 mg/mL), *C. parapsilosis* (CIM<sub>90</sub> 4,0 mg/mL) e *C. krusei* (CIM<sub>90</sub> 8,0 mg/mL) (Pfaller *et al.*, 2002).

No Rio Grande do Sul, Antunes e colaboradores (2004) avaliaram a suscetibilidade de 120 isolados de candidemia utilizando procedimentos padronizados pelo CLSI (M27-A2). Todos os isolados evidenciaram quanto a anfotericina B CIMs < 1µg/mL, considerados sensíveis. Recentemente, Colombo *et al.* (2006) num estudo multicêntrico sobre candidemias, envolvendo 11 centros médicos do Brasil, avaliaram 712 isolados frente à anfotericina B e não detectaram nenhum achado de resistência.

Na Índia, Sharman e colaboradores (2011) em um estudo com neonatos portadores de candidemia, detectaram que houve 100% de sensibilidade à anfotericina B dentre os 56 isolados obtidos distribuídos entre as seguintes espécies: *C. albicans* (25%), *C. tropicalis* (35,7%), *C. glabrata* (17,8%), *C. parapsilosis* (16%), *C. guillermondii* (3,5%) e *C. krusei* (1,78%).

### **2.3.2 Fluconazol**

Fluconazol é um antifúngico pertencente a família dos triazóis de primeira geração, o qual age através da inibição da enzima 14- $\alpha$ -esterol demetilase, necessária para a produção de ergosterol, um componente importante da membrana celular fúngica. É importante ressaltar que os azóis são fungistáticos, inibindo o crescimento celular, mas não são fungicidas (Chapman 2007).

O fluconazol, em infantes, é bastante utilizado para o tratamento de candidíase orofaríngea e sistêmica, e nos últimos anos também tem sido usado como tratamento profilático em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (Manzoni *et al.*, 2007). Esta droga é atualmente a principal alternativa à anfotericina B no tratamento de candidíase neonatal e tem sido muito bem estudada nesta população. Uma preocupação em relação ao uso desta droga é o surgimento de resistência, principalmente entre as espécies não-*albicans* como *C. krusei* e *C. glabrata*, recentemente também foi relatada a ocorrência de resistência em isolados de *C. parapsilosis* (Chapman 2007).

Krcmery *et al.* (2001) estudaram candidemias em neonatos e crianças durante a terapia com fluconazol, sendo as únicas espécies identificadas *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Não houve relato de resistência ao fluconazol, mas foi observado CIMs ligeiramente maiores entre os isolados obtidos de pacientes, cuja fungemia se desenvolveu seis dias ou mais tarde, após a introdução do tratamento profilático.

Pfaller e colaboradores (2005) em um estudo mundial de 6,5 anos, verificaram dentre os isolados testados que a atividade de fluconazol permanece elevada contra *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, apesar de ter sido observada resistência entre isolados de *C. tropicalis* e a resistência foi considerável entre isolados de *C. glabrata*. Ainda em 2005, Sarvikivi e colaboradores relataram um caso incomum de cepas de *C. parapsilosis* provenientes de neonatos internados em UTIN, resistentes ao fluconazol, sendo a possível causa o uso indiscriminado deste antifúngico como profilático no hospital em estudo.

Em 2011, Sharman e colaboradores, em um estudo indiano envolvendo recém-nascidos com candidemia, relataram a ocorrência de resistência ao fluconazol em 17,8% dos 56 isolados obtidos, ocorrendo dentre as espécies: *C. tropicalis* (5), *C. albicans* (2), *C. glabrata* (1), *C. parapsilosis* (1), *C. krusei* (1).

### 2.3.3 Voriconazol

O voriconazol pertence a segunda geração dos triazóis que foi desenvolvida com o objetivo de ampliar o espectro de atividade (Pfaller *et al.*, 2000). A farmacocinética têm sido estudada em crianças de 2 a 11 anos, mas ainda não estão disponíveis para a população neonatal (Walsh *et al.*, 2004b).

Apesar de mostrar uma boa eficácia contra espécies de *Candida*, recentemente vários pesquisadores têm alertado em relação ao uso em pacientes expostos previamente aos azóis, devido ao potencial de resistência cruzada, especialmente com cepas de *C. glabrata* resistentes ao fluconazol (Alexander *et al.*, 2005). A relevância clínica desta resistência cruzada tem sido documentada em uma série de casos. Embora a maioria dos

isolados resistentes sejam de *C. glabrata*, também foi verificada a ocorrência de resistência cruzada em *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (Alexander *et al.*, 2005; Panackal *et al.*, 2006).

Pfaller e colaboradores (2005), em um estudo mundial, verificaram que voriconazol continua bastante ativo contra espécies de *Candida*. É notável, no entanto, que a resistência a esta droga tem aumentado entre isolados de *C. glabrata*.

#### **2.3.4 Anidulafungina**

A anidulafungina faz parte de uma nova classe de agentes antifúngicos, as equinocandinas, que atuam ao nível de parede celular, por inibição específica do (1,3)- $\beta$ -D-glucana sintase, complexo enzimático que forma polímeros glucano, um dos principais componentes da parede celular de fungos. Como os mamíferos não possuem parede celular o risco de toxicidade é menor em relação aos polienos e azólicos. Resistência a anidulafungina parece ser rara, mesmo entre os isolados resistentes ao fluconazol ou anfotericina B. Esta droga foi bem estudada na população adulta, mas os estudos de farmacocinética e de tratamento ainda estão em andamento e / ou em desenvolvimento na população neonatal (Odio *et al.*, 2004).

Pfaller e colaboradores em 2005 avaliaram 2.500 isolados de *Candida* frente à anidulafungina, que se mostrou muito eficaz contra as espécies deste gênero. *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. kefyr* foram as espécies mais susceptíveis, enquanto *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, e *C. guilliermondii* foram as que apresentaram menor sensibilidade. Em um estudo conduzido por Reboli e colaboradores (2007) anidulafungina mostrou eficácia de 15,4% maior contra espécies de *Candida* do que o fluconazol.

A administração segura da anidulafungina em crianças menores de dois anos ainda está sob investigação. Devido a falta de estudos de seu uso em infantes, até o momento a sua utilização não é recomendada nesta população (Cohen-Wolkowicz *et al.*, 2009).

**3. FUNGEMIA POR *CANDIDA PELLICULOSA* (*PICHIA ANOMALA*) EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL: UMA POSSÍVEL ORIGEM CLONAL<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Fungemia by *Candida pelliculosa* (*Pichia anomala*) in a Neonatal Intensive Care Unit: A Possible Clonal Origin. Artigo publicado na Mycopathologia - 2013.

**FUNGEMIA POR *CANDIDA PELLICULOSA (PICHIA ANOMALA)* EM UNIDADE  
DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL: UMA POSSÍVEL ORIGEM CLONAL**

Fungemia por *Candida Pelliculosa (Pichia Anomala)*

Carolina Maria da Silva<sup>a</sup>, Ana Maria Rabelo de Carvalho Parahym<sup>a</sup>, Mariele Porto  
Carneiro Leão<sup>a</sup>, Neiva Tinti de Oliveira<sup>a</sup>, Rosemary de Jesus Machado Amorim<sup>b</sup>; Rejane  
Pereira Neves<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Nelson Chaves, s/nº- Cidade Universitária, 50670-420 Recife, Brasil

<sup>b</sup> Departamento Materno Infantil, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Nelson Chaves, s/nº- Cidade Universitária, 50670-420 Recife, Brasil

\*Autor correspondente:

Rejane P. Neves

Endereço: Av. Prof. Nelson Chaves, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil. 51030-390

e-mail: rejadel@yahoo.com.br

Fax +55-8121268480; Tel: +55-81212684

**RESUMO**

Candidemia neonatal pode ocorrer, no entanto, infecções por *Candida pelliculosa* são raras. Nós descrevemos um surto de candidemia causado *C. pelliculosa* entre recém-nascidos hospitalizados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal.

**Palavras-chave:** *Candida pelliculosa*, *Pichia anomala*, Candidemia, Neonatos, Susceptibilidade antifúngica.

**ABSTRACT**

Neonatal candidemia can occur, however, infections caused by *Candida pelliculosa* are rare. Here, we describe an outbreak of candidemia caused by *C. pelliculosa* among babies hospitalized in a neonatal intensive care unit.

**Key words:** *Candida pelliculosa*, *Pichia anomala*, Candidemia, Neonates, Antifungal Susceptibility.

## INTRODUÇÃO

A incidência de candidíase sistêmica neonatal é associada a significativa morbidade e mortalidade [1]. Estudos epidemiológicos de candidemia neonatal têm relatado altos índices de mortalidade (30-60%), principalmente nos pacientes com baixo peso [2]. Além da prematuridade, o uso comum de antibióticos de amplo espectro e de cateteres intravenosos tornam os neonatos particularmente predispostos ao desenvolvimento de candidemia. [3].

Dentre as espécies de *Candida* patogênicas aos humanos, *C. albicans* tem sido a mais comumente associada com infecção neonatal. No entanto, relatos recentes têm indicado um aumento no número de surtos de infecções atribuídas a outras espécies de *Candida*, incluindo *Candida pelliculosa*, teleomorfo *Pichia anomala* [4].

Infecções causadas por esta levedura são raras, mas tem ocorrido em crianças prematuras e pacientes imunocomprometidos [5]. Este fungo é frequentemente encontrado em frutos, solo e outros compostos orgânicos [6].

*C. pelliculosa* tem sido identificada como causa de infecções invasivas, sendo fungemia a manifestação mais presente em alguns países [7, 8]. Usualmente os pacientes são tratados com anfotericina B ou fluconazol com bons resultados. Porém, falhas na terapia podem ocorrer bem como casos de resistência aos antifúngicos em pacientes que fizeram profilaxia com fluconazol. As terapias antifúngicas atuais utilizadas em neonatos são associadas com crescente resistência, notável toxicidade, interações medicamentosas e limitado espectro de atividade. Neste contexto, determinar a susceptibilidade antifúngica do patógeno é um importante passo para o tratamento efetivo [9]. O início tardio do tratamento adequado pode aumentar o risco de morbidade e mortalidade em infantes [10].

Nós descrevemos um surto de fungemia em neonatos por *C. pelliculosa*, uma possível infecção de origem clonal e a atividade *in vitro* dos isolados.

## PACIENTES E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada após a aprovação do comitê de ética em pesquisas do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira sobre o registro CAAE0246.0.099.000-10.

### CASO 1

Lactente do sexo masculino nascido em fevereiro de 2010 com idade gestacional de 37,2 semanas e peso de 3.460 gramas apresentando malformação congênita, colestase neonatal, icterícia e anemia, foi hospitalizado na UTIN após o nascimento. Em abril de

2010 teve hemocultura positiva para fungemia, sendo o agente etiológico identificado como *C. pelliculosa*. Inicialmente foi tratado com fluconazol (6mg/kg) e posteriormente com anfotericina B (0,5 mg/kg) por mais 15 dias. Após o tratamento a sepse fúngica foi superada e o paciente recebeu alta hospitalar.

#### **CASO 2**

Recém-nascido gêmeo (segundo na ordem de nascimento), sexo masculino nascido em abril de 2010 com a idade gestacional de 26 semanas e 4 dias, e peso de 830 gramas. Apresentava icterícia e síndrome do desconforto respiratório e permaneceu de abril a setembro de 2010 na UTIN, apresentando no terceiro mês de internação crescimento de *C. pelliculosa* em hemocultura. O tratamento foi então, instituído com 28 dias de fluconazol(6mg/kg) e por mais 21 dias com anfotericina B (0,5 mg/kg). A sepse fúngica foi superada, mas o bebê permaneceu internado até setembro de 2010, devido à desnutrição grave, recebendo alta no referido mês.

#### **CASO 3**

Neonato do sexo feminino nasceu prematuro em junho de 2010 com a idade gestacional de 34 semanas e peso de 1390 gramas, com doença cardíaca congênita, icterícia e anemia foi internado na UTIN por 10 dias após o nascimento. No mesmo mês teve uma hemocultura positiva para fungo sendo identificada *C. pelliculosa* como agente etiológico da fungemia. Foi tratada com fluconazol (6 mg/kg). A infecção foi superada e o paciente recebeu alta em agosto de 2010.

#### **CASO 4**

Recém-nascido prematuro do sexo feminino nascido em junho de 2010, pesando 1.690 gramas e com idade gestacional de 31 semanas e três dias foi internado na UTIN com icterícia, pneumotórax, síndrome do desconforto respiratório e meningoencefalite. No mesmo mês teve um diagnóstico positivo para candidemia causada por *C. pelliculosa* sendo tratado com fluconazol (6 mg/kg) por 24 dias, apresentando resposta clínica satisfatória e alta em julho de 2010.

#### **CASO 5**

Neonato prematuro do sexo feminino nasceu em junho de 2010, com a idade gestacional de 29 semanas e peso de 840 gramas, apresentando um baixo índice de Apgar, sendo então, internado na UTIN após o nascimento. Apresentava meningoencefalite, icterícia e síndrome do desconforto respiratório. Após 23 dias de internamento apresentou em hemocultura crescimento de *C. pelliculosa* sendo tratado com fluconazol (6 mg/kg) durante 20 dias, apresentou boa resposta.

Uma visão geral dos casos e possíveis fatores de risco estão apresentados na tabela 1.

Em todos os casos, duas amostras de sangue foram coletadas assepticamente por punção arterial dos pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (NICU) de um hospital público brasileiro entre abril/2010 – setembro/2012 (culturas de diagnóstico e controle de cura). A análise microbiológica foi conduzida no Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. As amostras foram processadas por métodos padronizados (exame direto e cultura) de diagnóstico micológico.

O exame direto das amostras clínicas foram realizados sem clarificante ou coloração de Giemsa. Concomitantemente foram preparadas culturas em placas de Petri contendo Agar Sabouraud adicionado de cloranfenicol. As placas foram incubadas a 30 e 37°C, em atmosfera aeróbica por até 15 dias.

A identificação dos agentes etiológicos foi realizada após a purificação das culturas através de características macroscópicas (bordos, textura e coloração da frente e verso da colônia, produção de pigmentos e tempo de crescimento), microscópicas (estruturas reprodutivas e somáticas), fisiológicas (formação de ascósporos) e bioquímicas (assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, fermentação de fontes de carbono e produção de ácido acético) [11] bem como por técnicas moleculares através primers espécie-específicos (P. Anom-F 5'-GAG GGT GGT GGC TTA CCTCT-3' and P. anom-R 5'-AAA ATA CCT CTT CTA AAC CTG AG-3') [12].

O exame direto revelou inúmeras células de levedura brotantes, ovais e hialinas em todas as amostras avaliadas. O crescimento da cultura ocorreu em ambas as temperaturas (30 e 37°C). Os agentes etiológicos foram identificados de acordo com as características morfofisiológicas como *C. pelliculosa*, a taxonomia foi confirmada através de técnicas moleculares como mostrado na figura 1.

Para avaliação da similaridade foram utilizados marcadores ISSR: (GTG) 5(5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') e M13 (5'-AGTCAGCCAAC-3'). A matriz de similaridade binária foi preparada utilizando o coeficiente de Jaccard pelo programa de computador NTSYS (Numerical Taxonomy System of multivariate program) [13]. Dendogramas foram contruídos pelo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetical average).

Para todos os ensaios moleculares a cepa *C. tropicalis* ATCC750, recomendada internacionalmente, foi utilizada como controle. Todos os isolados de *C. pelliculosa* foram agrupados igualmente quando o primer GTG5 foi utilizados. Com o primer M13 a cepa do

caso 4 foi agrupada separadamente das demais. O perfil de bandas e dendogramas estão apresentados na figura 2.

Os testes de susceptibilidade frente à anfotericina B (UnitedMedical), fluconazol (Pfizer), voriconazol (Pfizer) e anidulafungina (Pfizer) foram realizados pelo método de microdiluição em caldo proposto pelo CLSI (Clinical Laboratories and Standards Institute) de acordo com o documento M27-A3 (CLSI 2008). O controle de qualidade conduzido através da inclusão ao teste da cepa *C. parapsilosis* ATCC 22019 recomendada pelo CLSI. Os resultados dos teste de susceptibilidade antifúngica estão demonstrados na tabela 2.

Os isolados foram estocados na Coleção de Culturas URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, com os seguintes números: 6345, 6283, 6281, 6280 e 6279.

## DISCUSSÃO

Existem vários relatos de infecção nosocomial cruzada atribuída a espécies de *Candida* em UTINs (Kalkanci *et al.*, 2010), no entanto, infecções invasivas por *C. pelliculosa* têm sido raramente relatadas (Choi *et al.*, 2010) e nosso estudo contribui com importantes dados.

Kalkanci et al em 2010 relataram um surto de fungemia por *C. pelliculosa* em um hospital turco entre quatro bebês hospitalizados na mesma UTIN; nosso relato possui algumas similaridades já que reportamos um surto de cinco casos de fungemia por *C. pelliculosa* em neonatos da mesma UTIN. Todos os pacientes adquiriram a infecção após a admissão na UITN; a transmissão nosocomial de *C. pelliculosas* sugere que a rota de transmissão pode ter vindo das mãos dos profissionais de saúde, do próprio ambiente hospitalar araves da inalção de propágulos fúngicos, ou por métodos invasivos como nutrição parenteral.

Métodos moleculares são requeridos para demonstrar a possível relação clonal entre os isolados (Ergon *et al.*, 2005). Análises genéticas mostraram que todos os cinco isolados foram positivos para o marcador GTG<sub>5</sub> e quatro foram positivos para o M13. O que sugere que em nosso estudo, quatro dos cinco isolados possuem a mesma origem clonal.

Quatro dos cinco bebês afetados eram prematuros: um deles com peso ao nascer menor que 2,500g e três com muito baixo peso ao nascer menor que 1,500g. Em um estudo conduzido em uma UTIN indiana baixo peso ao nascer foi o fator de risco mais comum para candidemia (79.09 %), seguido por prematuridade (67.27 %) [16]. Uma outra pesquisa para fatores de risco em infecções por *C. pelliculosa* em neonatos conduzida por

Chakrabarti et al. [7] demonstrou que baixa idade gestacional, muito baixo peso ao nascer e longo tempo de permanência em hospitais eram significativamente associados ao desenvolvimento de fungemia.

Apesar de *C. pelliculosa* ser considerado um fungo emergente em infecções hematogênicas, pesquisas sobre a sensibilidade às drogas antifúngicas para esta espécie são escassas (Maxwell *et al.*, 2003; Barchiesi *et al.*, 2005). Usualmente os pacientes são tratados com fluconazol ou anfotericina B obtendo boa resposta terapêutica (Pfaller e Diekema, 2004b).

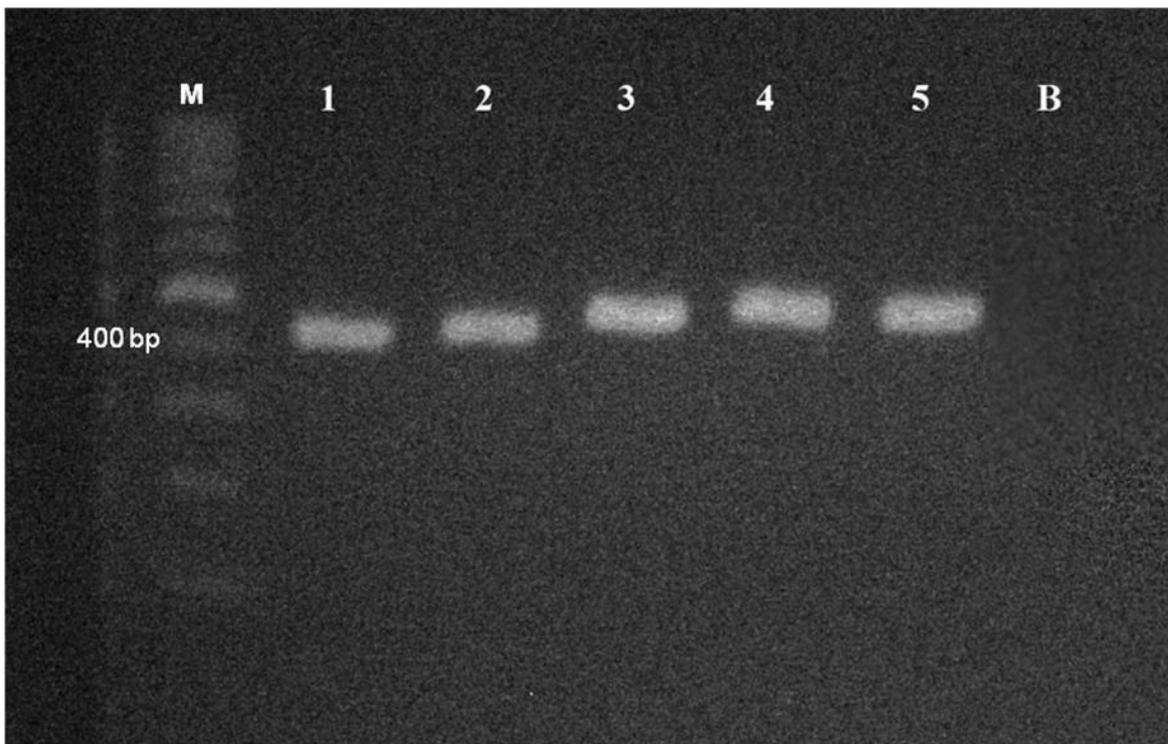
Em um estudo anterior isolados de *C. pelliculosa* apresentaram boa sensibilidade a anfotericina B, fluconazol e voriconazol (Matta *et al.*, 2007), o que difere de nossos resultados onde foi observada resistência ao voriconazol.

Os isolados frente à anidulafungina também apresentaram bom perfil de sensibilidade, porém os estudos de farmacocinética desta droga ainda estão em andamento e / ou em desenvolvimento na população neonatal (Odio *et al.*, 2004).

As infecções nosocomiais em neonatos por *C. pelliculosa* tem se mostrado com grave curso clínico, contudo, o tratamento instituído após testes de susceptibilidade antifúngica tem apresentado bons resultados, como observado em nosso estudo. Anfotericina B e fluconazol foram capazes de promover cura dos nossos pacientes que apresentaram fungemia por *C. pelliculosa*.

**AGRADECIMENTOS**

Agradecemos ao Conselho Nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa, a Pfizer e Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) por disponibilizarem a infraestrutura e material para realização deste trabalho.



**Figura 1** – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR dos isolados de *Candida* com par de primer espécie-específico para *Candida pelliculosa*. Linhas de 1 a 5 correspondem aos isolados: 6345, 6283, 6281, 6280, 6279 linha B a ATCC 750 *C. tropicalis*. M: 100-bp marcador de DNA.

**Tabela 1-** Concentração inibitória mínima das cepas de *Candida pelliculosa* isoladas de hemoculturas de neonatos hospitalizados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal

CASO (ISOLADO)	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)			
	Anfotericina B	Fluconazol	Voriconazol	Anidulafungina
CASO 1 (6345)	0,12 µg/ml (S)	4 µg/ml (S)	4 µg/ml (R)	0,06 µg/ml (S)
CASO 2 (6283)	0,03 µg/ml (S)	4 µg/ml (S)	4 µg/ml (R)	0,12 µg/ml (S)
CASO 3 (6281)	0,03 µg/ml (S)	4 µg/ml (S)	4 µg/ml (R)	0,01 µg/ml (S)
CASO 4 (6280)	0,03 µg/ml (S)	4 µg/ml (S)	4 µg/ml (R)	0,01 µg/ml (S)
CASO 5 (6279)	0,03 µg/ml (S)	4 µg/ml (S)	4 µg/ml (R)	0,03 µg/ml (S)

(S) Sensível; (R) Resistente

**4. SUSCEPTIBILIDADE DE ISOLADOS DE *CANDIDA*  
PROVENIENTES DE HEMOCULTURAS DE NEONATOS  
HOSPITALIZADOS EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA À  
ANIDULAFUNGINA<sup>2</sup>**

---

<sup>2</sup> Susceptibility of *Candida* isolates from bloodcultures of neonates hospitalized in Intensive Care Units to anidulafungin. Artigo a ser submetido a Medical Mycology – USA.

**SUSCEPTIBILIDADE DE ISOLADOS DE *CANDIDA* PROVENIENTES  
DE HEMOCULTURAS DE NEONATOS HOSPITALIZADOS EM  
UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA À ANIDULAFUNGINA**

**C.M. Silva<sup>1</sup>; A.M. R. Carvalho Parahym<sup>1</sup>; R.G. Lima-Neto<sup>1</sup>; M.B. Jucá<sup>2</sup>; R.P. Neves<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

<sup>2</sup>Hospital Agamenon Magalhães, Recife, Brasil.

\*Autor correspondente:

Rejane P. Neves

Endereço: Av. Prof. Nelson Chaves, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil. 51030-390

e-mail: rejadel@yahoo.com.br

Tel: +55-8121268480; fax: +55-81212684

## RESUMO

Candidemia tem se tornado frequente durante o período neonatal. Este aumento na incidência tem levado a mudanças nas estratégias de terapia antifúngica. Assim uma nova classe de drogas, as equinocandinas, incluindo a anidulafungina tem sido desenvolvida. Avaliamos a atividade antifúngica *in vitro* da anidulafungina frente a espécies de *Candida* obtidas a partir de hemoculturas provenientes de pacientes hospitalizados em unidades de terapia intensiva neonatal. A concentração inibitória mínima foi determinada seguindo o método de microdiluição indicado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Os dados obtidos mostraram que todos os isolados foram sensíveis à anidulafungina, exceto algumas cepas de *C. parapsilosis*. Anidulafungina pode ser uma alternativa de tratamento para candidiases invasivas em pacientes internados em unidades de terapia intensiva. No entanto, é preciso considerar a ocorrência de resistência por *C. parapsilosis*.

**Palavras-chave:** *Candida* spp; Candidemia; Neonatos; Susceptibilidade antifúngica; Anidulafungina.

**ABSTRACT**

Fungal sepsis is becoming increasingly frequent during the neonatal period. This rising incidence has led to major changes in strategies for antifungal therapy. For example, a new class of drugs, the echinocandins, including anidulafungin has been developed. We evaluated the *in vitro* activity of anidulafungin against *Candida* spp. obtained from blood cultures of patients hospitalized in neonatal intensive care units. The minimal inhibitory concentration of the isolates was determined using the microdilution method described by the Clinical and Laboratory Standards Institute. The data obtained showed that all isolates were susceptible to anidulafungin, except some strains of *C.parapsilosis*. Anidulafungin can be used as an alternative treatment against invasive candidiases in patients from neonatal intensive care units. Although is relevant to consider the occurrence of *C. parapsilosis* resistance.

**Key words:** *Candida* spp.; Candidemia; Neonates; Antifungal susceptibility; Anidulafungin.

## INTRODUÇÃO

A sepsé fúngica vem se tornando freqüente no período neonatal, principalmente entre os recém-nascidos (RN) de muito baixo peso ao nascer. A incidência é inversamente proporcional à idade gestacional e ao peso de nascimento. Além destes, outros fatores estão associados com a ocorrência de fungemia como colonização fúngica prévia (especialmente de trato gastrointestinal), presença de cateteres vasculares centrais e uso anterior de nutrição parenteral e soluções lipídicas (Moreira 2005).

A candidemia apresenta impacto significativo em neonatos em relação ao aumento de morbidade, do período de internação e custo. A incidência crescente das infecções fúngicas invasivas nas últimas duas décadas, conduziu a alterações importantes nas estratégias de terapêutica antifúngica (Cunha *et al.*, 2011).

Atualmente uma nova classe de drogas têm se destacado, as equinocandinas, sob três versões: a caspofungina, a anidulafungina e a micafungina. Estes fármacos apresentam algumas modificações estruturais; contudo, todos têm exibido respostas similares quando empregados no tratamento da candidemia (Cunha *et al.*, 2011).

Ghannoum e colaboradores (2009) evidenciaram que as equinocandinas, caspofungina e micafungina se comportam de forma similar entre si; porém, diferentemente das demais, a anidulafungina possui uma cadeia lateral substituída por outra de origem sintética a qual potencializou a atividade antifúngica. Em geral, as equinocandinas exibem uma potente atividade fungicida *in vitro* e *in vivo* contra espécies de *Candida*, incluindo patógenos resistentes aos azólicos (Chen *et al.*, 2010).

Anidulafungina é recomendada para o tratamento de candidemia e candidíase esofágica em adultos neutropênicos. Esta é a única equinocandina que não sofre metabolismo hepático, sendo lentamente degradada no plasma humano; não sendo, portanto, necessário o ajuste da dosagem para prevenir insuficiência renal ou hepática (Arnold *et al.*, 2010). No entanto, existem poucos estudos sobre esta droga entre pacientes neonatais e pediátricos, muitas recomendações sobre o seu uso derivam de experiências em adultos (Almirante e Rodríguez 2007).

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antifúngico *in vitro* da anidulafungina frente a 30 isolados de diferentes espécies de *Candida* provenientes de hemoculturas de neonatos internados em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTINs).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Isolados fúngicos

Trinta isolados de espécies de *Candida* obtidos de hemoculturas provenientes de recém-nascidos hospitalizados em UTINs foram analisados. As amostras clínicas oriundas de pacientes internados em UTINs de dois hospitais públicos da cidade de Recife foram encaminhadas ao Laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) onde foram processadas para exame direto que foi procedido a fresco e contrastado com tinta Nakin e cultura em meio ágar Sabouraud (Difco) adicionado de cloranfenicol (50 mg/l), sendo posteriormente incubadas a 30 e 35°C por até 15 dias. As colônias purificadas foram identificadas através da taxonomia clássica (Barnett *et al.*, 2000; De Hoog *et al.*, 2000) e automação pelo VITEK 2, totalizando onze isolados de *Candida albicans*, onze *C. parapsilosis*, cinco *C. pelliculosa*, uma *C. glabrata*, uma *C. guilliermondii* e uma *C. tropicalis*. Todas as cepas testadas foram preservadas sob óleo mineral (Sherf 1943) e estocadas na Coleção de Culturas URM - UFPE.

### Atividade antifúngica *in vitro*

Para a análise *in vitro* da atividade antifúngica da anidulafungina foi utilizado o método de microdiluição em caldo de acordo com as instruções do documento M27-A3 (CLSI 2008). No ensaio foram incluídas linhagens do American Type Culture Collection (ATCC), *C. krusei* ATCC6528 e *C. parapsilosis* ATCC22019, recomendadas pelo método.

O meio de cultura utilizado nos experimentos foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, e o pH ajustado com ácido morfolino-propulsulfônico (MOPS; Sigma-Aldrich). O meio foi filtrado e esterelizado utilizando membrana de filtração de 0,22 µm (Millipore, Darmstadt, Germany).

A droga comercial, anidulafungina (Pfizer) foi diluída em dimetil-sulfóxido (DMSO), sendo utilizadas dez concentrações diferentes variando de 0,015 µg/ml a 8 µg/ml. Os isolados de *Candida* foram mantidos em meio ágar Sabouraud a temperatura de 30° C por 24 horas. Suspensões dos isolados foram preparadas e as densidades foram ajustadas de acordo com a escala 0.5 de Mc Farland e obtenção de 90% de transmitância em espectrofotômetro a 530 nm de comprimento de onda. O volume do inóculo foi ajustado em 5 ml de salina esterilizada e posteriormente diluído em RPMI 1640 para uma concentração de  $5 \times 10^3$  células/ml<sup>-1</sup>.

Para os testes de susceptibilidade foram utilizadas placas de microtitulação esterilizadas contendo noventa e seis poços (TPP; Trasadingen, Switzerland). O inóculo foi adicionado aos poços com a droga a ser testada e as placas foram incubadas a 35° C por 24 horas, sendo realizada a leitura visual da concentração inibitória mínima (CIM)

considerada como a concentração do poço em que ocorreu 100% de inibição relativa ao crescimento do poço controle positivo. O isolado foi considerado resistente quando apresentou CIM > 2 µg/ml.

## RESULTADOS

Os resultados da avaliação da atividade antifúngica estão contidos na Tabela 1. Todos os isolados de *C. albicans*, *C. pelliculosa*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis* foram susceptíveis a anidulafungina com concentrações variando de 0,01 a 1 µg/ml. Foi observada resistência em sete dos onze isolados de *C. parapsilosis* que apresentaram CIM > 2 µg/ml e dentre estes quatro apresentaram CIM = 8 µg/ml.

## DISCUSSÃO

Anidulafungina tem mostrado eficácia no tratamento de adultos com candidíase esofágica ou sistêmica apresentando atividade fungicida contra *Candida* spp. Os estudos que avaliam a farmacocinética da anidulafungina em neonatos são raros, e os resultados mostram-se similares aos dos obtidos com pacientes adultos (Cohen-Wolkowicz *et al.*, 2009). A utilização deste antifúngico em pacientes pediátricos e neonatais ainda está em fase de pesquisas. Desta forma a nossa pesquisa contribui com um maior conhecimento sobre a atividade *in vitro* da anidulafungina frente a isolados fúngicos provenientes de neonatos com candidemia.

Um grande número de isolados testados foi sensível a anidulafungina, incluindo um isolado de *C. glabrata*, que é uma espécie que tem sido relatada como resistente a drogas azólicas. De acordo com Chapman (2007) resistência a esta droga é incomum, até mesmo em isolados resistentes ao fluconazol e anfotericina B.

No entanto, neste estudo foi verificada a ocorrência de resistência a anidulafungina pela maioria dos isolados de *C. parapsilosis*, o que corrobora com os dados de Moudgal e colaboradores (2005), que afirmam que anidulafungina apresenta uma reduzida atividade antifúngica *in vitro* contra *C. parapsilosis* quando comparada com outras espécies de *Candida*.

Resistência a anidulafungina em *Candida* spp. tem sido associada a CIMs elevados, mutações no gene FKS1 e falhas terapêuticas (Pfaller *et al.*, 2008b). Porém, a reduzida sensibilidade *in vitro* de *C. parapsilosis* não está clara, pois alguns pacientes infectados por esta espécie obtiveram boa resposta terapêutica através da terapia com anidulafungina (Bennett e Johnson 2006).

Existem poucos estudos sobre a resistência de *C. parapsilosis* a anidulafungina, porém acredita-se que a baixa sensibilidade possa estar relacionada com a baixa virulência desta espécie (Espinell-Ingroff *et al.*, 2010). Este dado é bastante relevante visto que, vários autores têm relatado o aumento da ocorrência de infecções por esta espécie em neonatos provenientes de UTINs (Trofa *et al.*, 2008; Pfaller *et al.*, 2008a).

Anidulafungina pode ser uma alternativa para o tratamento de recém nascidos portadores de candidíases invasivas, mas ainda são necessários mais estudos para assegurar uma correta administração deste antifúngico. A susceptibilidade antifúngica *in vitro* foi capaz de apontar resistência por isolados de *C. parapsilosis*, porém testes *in vivo* também devem ser levados em consideração para análises futuras.

### **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos ao Conselho Nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq) pelo financiamento, a Pfizer por disponibilizar materiais e a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) por disponibilizar a infraestrutura para realização deste trabalho.

**Tabela 1.** Concentração inibitória mínima (CIM) de isolados de *Candida* obtidos de hemoculturas de neonatos provenientes de Unidades de Terapia Intensiva frente à anidulafungina.

Registro	Espécie	CIM* (µg/ml) Anidulafungina
6395	<i>Candida albicans</i>	0,01
6394	<i>C. albicans</i>	0,12
6396	<i>C. albicans</i>	0,12
6397	<i>C. albicans</i>	0,03
6399	<i>C. albicans</i>	0,01
6410	<i>C. albicans</i>	0,06
6400	<i>C. albicans</i>	0,12
6401	<i>C. albicans</i>	0,12
6402	<i>C. albicans</i>	0,06
6414	<i>C. albicans</i>	0,06
6431	<i>C. albicans</i>	0,01
6392	<i>C. glabrata</i>	0,03
6407	<i>C. parapsilosis</i>	2
6408	<i>C. parapsilosis</i>	0,25
6409	<i>C. parapsilosis</i>	8
6406	<i>C. parapsilosis</i>	8
6398	<i>C. parapsilosis</i>	4
6404	<i>C. parapsilosis</i>	4
6405	<i>C. parapsilosis</i>	2
6429	<i>C. parapsilosis</i>	4
6430	<i>C. parapsilosis</i>	0,12
6411	<i>C. parapsilosis</i>	8
6412	<i>C. parapsilosis</i>	8
6345	<i>C. pelliculosa</i>	0,06
6283	<i>C. pelliculosa</i>	0,12
6281	<i>C. pelliculosa</i>	0,01
6280	<i>C. pelliculosa</i>	0,01
6279	<i>C. pelliculosa</i>	0,03
6413	<i>C. tropicalis</i>	0,06
6403	<i>C. guilliermondii</i>	1

\*CIM – Concentração Inibitória Mínima

## 5. CANDIDEMIA EM NEONATOS: EPIDEMIOLOGIA E SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*<sup>3</sup>

---

<sup>3</sup> Candidemia among neonates: Epidemiology and *in vitro* antifungal susceptibility a ser submetido a Mycopathologia – Albany, NY, USA.

**CANDIDEMIA EM NEONATOS: EPIDEMIOLOGIA E  
SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO***

**C.M. Silva<sup>1</sup>; A.M. R. Carvalho Parahym<sup>1</sup>; I.F. Domingos<sup>3</sup>; T. Duque<sup>2</sup>; M.B. Jucá<sup>3</sup>;  
R.J.M. Amorim<sup>1</sup>; R.P. Neves<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

<sup>2</sup>Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira, Recife, Brasil.

<sup>3</sup>Hospital Agamenon Magalhães

\* Autor correspondente

Rejane P. Neves

Endereço: Av. Prof. Nelson Chaves, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil. 51030-390

e-mail: rejadel@yahoo.com.br

Te: +55-8121268480; fax: +55-81212684

## RESUMO

Nas últimas décadas a incidência de candidíases invasivas em neonatos tem aumentado de forma alarmante. Este aumento é devido a vários fatores, dentre estes: idade gestacional inferior a 32 semanas, baixo peso ao nascer, utilização de cateteres venosos centrais, uso de nutrição parenteral, bem como condições inerentes ao paciente. O conhecimento dos fatores epidemiológicos associados a esta infecção e do perfil de susceptibilidade antifúngica torna-se importante para uma melhor prevenção, tratamento e prognóstico. Dessa forma os objetivos deste estudo foram diagnosticar candidemia em neonatos provenientes de Unidades de Terapia Intensiva (UTINs), avaliar as características epidemiológicas e o comportamento dos isolados frente a antifúngicos. Foram obtidas amostras de sangue provenientes de neonatos internados em UTINs e posteriormente foi procedido exame direto e cultura. As colônias puras foram identificadas de acordo com as características taxonômicas clássicas e moleculares. Testes de susceptibilidade *in vitro* foram realizados utilizando o método de microdiluição em caldo, segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Foi diagnosticada candidemia em 30 dos 301 pacientes avaliados. As espécies mais frequentes foram *C.albicans* e *C. parapsilosis*. Entre os acometidos 90% eram pré-termos, 60% do sexo masculino, 93,4% possuíam baixo peso ao nascer e as condições clínicas mais associadas foram icterícia e síndrome do desconforto respiratório. A grande maioria dos pacientes fazia uso de dispositivo terapêutico invasivo, destacando-se nutrição parenteral e cateterismo umbilical . Quanto à susceptibilidade antifúngica todos os isolados foram sensíveis a anfotericina B, porém foi observada resistência ao fluconazol e voriconazol, principalmente por espécies de *C. albicans*, e alguns isolados de *C. parapsilosis* foram resistentes a anidulafungina. O conhecimento destes dados aliado aos resultados de susceptibilidade antifúngica *in vitro* possibilitam uma melhor prevenção e tratamento de fungemia neste grupo de pacientes.

**Palavras-chave:** Candidemia; Neonatos; Epidemiologia; Susceptibilidade antifúngica.

**ABSTRACT**

In recent decades the incidence of invasive candidiasis in neonates has increased, this incidence is due to several factors, including: gestational age less than 32 weeks, low birth weight, use of central venous catheters, parenteral nutrition, as well as conditions attached to the patient. The knowledge of epidemiological factors associated with these infections and the antifungal susceptibility profile are important for better prevention, treatment and prognosis. Thus the objectives of this study were to detect candidemia in neonates from intensive care units (NICUs), evaluate the epidemiological characteristics and the behavior of the isolates front of antifungal agents. Clinical samples were obtained from neonates hospitalized in NICUs, after were preceded the direct examination and culture. The pure colonies were identified according to taxonomic features. *In vitro* susceptibility tests were performed using the broth microdilution method, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute. The diagnosis of candidemia was found in 30of 301 patients. The most frequent species were *C. albicans* and *C. parapsilosis*. Among the affected neonates 90% were preterm, 60% male, 93.4% had birth weight below 2.5 kg and the more commonly associated conditions were jaundice and respiratory distress syndrome. The majority of patients used invasive therapeutic device, especially parenteral nutrition and umbilical catheterization. In the antifungal susceptibility all isolates were sensitive to amphotericin B, but some resistance were observed to fluconazole and voriconazole, mainly by species of *C. albicans*, and some isolates of *C. parapsilosis* were resistant to anidulafungin. The knowledge of these factors combined with the results of *in vitro* antifungal susceptibility allows better prevention and treatment of fungemia in this group of patientes.

**Key words:** Candidemia; Neonates; Epidemiology; Antifungal susceptibility.

## INTRODUÇÃO

A frequência de candidemia em recém nascidos tem aumentado dramaticamente nas últimas décadas, correspondendo de 8 a 10% das infecções sanguíneas nosocomiais (Pfaller, *et al.*, 2006). Os principais fatores de risco associados à candidíase sistêmica em neonatos são: idade gestacional menor que 32 semanas, colonização fúngica prévia (especialmente de trato gastrointestinal), presença de cateteres vasculares centrais, uso anterior de nutrição parenteral e soluções lipídicas, Apgar < 5 no quinto minuto (Moreira, 2005). O tempo de permanência hospitalar prolongado, destacando-se na Unidade de Terapia Intensiva (UTI), bem como uso de antibioticoterapia de largo espectro e de dispositivos terapêuticos medico-invasivos, também favorecem a ocorrência de infecções fúngicas nosocomiais severas em recém-nascidos (Melo *et al.*, 2009).

A mortalidade atribuída a sepse por espécies de *Candida* é alta, variando de 25 a 54% dos casos, podendo chegar a 70% em recém-nascidos de muito baixo peso (Pedroso e Krebs, 2008).

A maioria dos fatores associados com o aumento do risco a infecções fúngicas está relacionada com as características epidemiológicas, incluindo clínica, dados demográficos dos recém-nascidos, prematuridade, condição imunológica entre outras condições (Manzoni *et al.*, 2006). O conhecimento dos fatores epidemiológicos destas infecções fúngicas e teste de susceptibilidade *in vitro* com os agentes etiológicos podem auxiliar na terapêutica a ser instituída.

No passado, as terapias disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas invasivas em neonatos eram limitadas, no entanto a expansão de novas opções terapêuticas pode trazer novas perspectivas (Chapman, 2007). Devido à complexidade dos pacientes pediátricos com risco para infecções, sobretudo as de etiologia fúngica e a diversidade de patógenos fúngicos, micoses oportunistas se apresentam como desafios consideráveis para diagnóstico e terapia. Alguns fungos não são susceptíveis às terapias padrões e podem requerer o uso de compostos antifúngicos alternativos, uma vez que o tratamento continuado com as drogas clássicas induz o desenvolvimento de resistência e alto grau de toxicidade (Walsh *et al.*, 2004a).

Existem quatro classes de drogas antifúngicas disponíveis no mercado para o tratamento da candidíase sistêmica: os polienos incluindo anfotericina B, os azóis (fluconazol e voriconazol), as pirimidinas fluorinadas (5-fluocitosina) e as equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina) (Frattarelli, *et al.*, 2004).

Desta forma os objetivos de nosso trabalho foram diagnosticar precocemente infecções fúngicas em neonatos, definir o perfil epidemiológico e de susceptibilidade antifúngica dos agentes etiológicos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Obtenção e manipulação das amostras clínicas**

As amostras de sangue foram coletadas de 301 neonatos internados nas UTINs de dois hospitais públicos do estado de Pernambuco entre o período de março de 2010 a julho de 2011. O projeto passou pela aprovação do comitê de ética em pesquisa do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP).

O material biológico a ser analisado foi coletado pelos profissionais de saúde dos referidos hospitais mediante solicitação médica. Em seguida as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), onde foram processadas para exame direto a fresco e contrastados com Nankin., e para cultura em meio ágar Sabouraud e ágar “Brain Heart Infusion” (BHI) adicionados de 50 mg/L de cloranfenicol contido em placas de Petri e mantidas à temperatura de 30° C e 35° C por um período de até 30 dias. Após o surgimento das colônias, estas foram purificadas e, posteriormente, identificadas.

### **Purificação das culturas**

As leveduras foram purificadas a partir de fragmentos da colônia suspensos em água destilada esterilizada adicionada de 50 mg/L cloranfenicol. Desta suspensão 0,2mL foi semeado por esgotamento na superfície do meio ágar Sabouraud com antibiótico contido em placas de Petri. Posteriormente, as colônias foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio ágar Sabouraud com extrato de levedura (Barnnet *et al.*, 2000; De Hoog *et al.*, 2000).

### **Identificação dos agentes etiológicos**

A identificação foi realizada com base na análise de parâmetros quanto às características macroscópicas (bordos, textura e coloração do verso e reverso das colônias, produção de pigmentos e tempo de crescimento), microscópicas (estruturas somáticas e reprodutivas), fisiológicas, bioquímicas (assimilação de compostos de carbono e nitrogênio, fermentação de fontes de carbono e produção de ácido acético) (Barnett *et al.*, 2000; De Hoog *et al.*, 2000) e produção de urease, (Lacaz *et al.*, 2002) . Quando necessário também foram utilizadas técnicas de biologia molecular utilizando primers espécie-específico para confirmação taxonômica.

### **Aspectos epidemiológicos**

Os parâmetros epidemiológicos avaliados foram: idade gestacional, sexo, peso ao nascer, condições clínicas associadas, uso de dispositivos terapêuticos medico-invasivos, agentes etiológicos identificados, e número de óbitos entre os portadores de candidemia.

### **Susceptibilidade antifúngica *in vitro***

Os testes de susceptibilidade *in vitro* foram realizados segundo o método de microdiluição em caldo, de acordo com a padronização publicada nos documentos M27-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI (2008).

No ensaio foram incluídas linhagens do American Type Culture Collection (ATCC), recomendadas pelo método: *Candida krusei* ATCC6528 e *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Dois poços controles, isentos de antifúngico e fungos, foram incluídos no ensaio, sendo um controle positivo (com adição do isolado) e outro controle negativo (sem adição dos isolados).

Soluções estoque de anfotericina B e anidulanfungina foram preparadas utilizando como diluente o dimetilsulfóxido (DMSO). A diluição de fluconazol e voriconazol foi preparada com água deionizada.

O meio de cultura utilizado foi o RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) com L-glutamina, 2,0g/L de glicose, sem bicarbonato de sódio e tamponado com ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS) a concentração final de 0,165 mol/L e pH 7,0.

### **Preparação do inóculo**

Das colônias de leveduras crescidas por um período de 24 horas em meio ágar Sabouraud, foram preparadas suspensões em 5mL de solução salina estéril 0,145 mol/L (8,5g/L NaCl; salina a 0,85%) cuja concentração final obtida foi de  $10^6$  cels/mL, cuja densidade celular foi ajustada em espectrofotômetro com comprimento de onda a 530 nm. A suspensão de trabalho foi ajustada na diluição 1:100 seguida de uma diluição de 1:20 da suspensão-padrão em meio RPMI 1640, resultando na concentração de  $5,0 \times 10^2$  a  $2,5 \times 10^3$  células por mL.

### **Teste de susceptibilidade *in vitro***

Para o teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi utilizado 0,1 mL de cada droga nas concentrações: anfotericina B (0,03 a 16  $\mu$ g/mL), anidulanfungina (0,01 a 8  $\mu$ g/ml) , voriconazol (0,03 a 16  $\mu$ g/ml) e fluconazol (0,12 a 64  $\mu$ g/mL). As placas foram

mantidas a 35°C e a determinação da concentração inibitória mínima dos antifúngicos foi realizada por observação visual a cada 24h durante dois dias.

O CIM para a anfotericina B e anidulafungina foi representado pelo poço onde ocorreu 100% na inibição do crescimento fúngico, para o voriconazol e o fluconazol pelo poço que correspondeu a inibição de 50% do crescimento, em relação ao controle. Na leitura o fungo foi considerado resistente quando apresentou CIM > 1 µg/ml para anfotericina B, CIM > 32 µg/mL para o fluconazol, CIM ≥ 1 µg/mL para voriconazol e CIM > 2 µg/mL para anidulafungina.

## RESULTADOS

Foram obtidas amostras de sangue provenientes de 301 neonatos internados em UTINs. Destas amostras foram obtidas 30 culturas positivas para espécies de *Candida* provenientes de 30 pacientes diferentes, o que implica numa ocorrência de aproximadamente 10%, dentre estes 23,3% foram a óbito.

O diagnóstico micológico foi baseado na presença de estruturas em parasitismo nas amostras de sangue ao exame direto e no isolamento de *Candida* em cultura pura (Figura 1). Dos isolados identificados, onze foram *C. albicans*, contudo dentre as espécies não *albicans* a mais prevalente foi *C. parapsilosis* com onze isolados, seguida por *C. pelliculosa* (5 isolados), *C. glabrata* (1 isolado), *C. guilliermondii* (1 isolado) e *C.tropicalis* (1 isolado).

Entre os acometidos, 90% eram prematuros (idade gestacional inferior a 37 semanas) com idade gestacional média de 31,4 semanas. O sexo mais acometido foi o masculino com 60% das ocorrências.

A maioria dos neonatos com candidemia eram considerados de baixo peso, sendo a média de 1,5 kg. As condições clínicas mais frequentemente associadas foram icterícia e síndrome do desconforto respiratório, porém outras condições foram relatadas como apresentado na Figura 2.

O uso de alimentação parenteral esteve presente em 99,6% dos neonatos com candidemia, cateterismo umbilical em 73,3%, cateter venoso central (CVC) em 56,7% e cateter central de inserção periférica (PICC) em 53,3%.

Foram avaliadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos 30 isolados frente a quatro antifúngicos (anfotericina B, fluconazol, voriconazol e anidulafungina), segundo a metodologia de microdiluição em caldo, os resultados estão demonstrados na Tabela 1. Todos os isolados foram sensíveis a anfotericina B. Os isolados de *C. albicans* foram

aqueles que apresentaram CIM mais elevados para fluconazol e voriconazol. *C. parapsilosis* em alguns casos, se mostrou resistente a anidulafungina.

## DISCUSSÃO

De acordo com o estudo apresentado candidemia esteve presente em aproximadamente 10% dos neonatos internados em UTINs. Stoll e colaboradores, em 2002, destacaram o aumento da prevalência de fungos nos casos de septicemia de origem hospitalar em UTIN, estando *Candida* spp. envolvida em 12% dos casos. Contudo, em um estudo realizado seis anos antes, os mesmos autores destacaram uma incidência de 9%. A mortalidade observada dentre os portadores de candidemia em nossa pesquisa foi de 23,3%, um pouco inferior a relatada por Benjamin, *et al.* (2003b) que afirmaram que esta pode variar entre 25 e 54%.

Pedroso e Krebs (2008) em um período de dez anos de pesquisa em uma UTIN observaram a ocorrência de candidíase sistêmica em 26,7% dos recém nascidos com menos de 1,5 kg e uma predominância no sexo masculino (65%). Em nossas pesquisas também houve uma predominância do sexo masculino (60%). De acordo com Stevenson, *et al.*, (2000) nascem mais meninos deprimidos do que meninas, o que é evidenciado por escores de Apgar mais baixos e maior ocorrência de síndrome do desconforto respiratório. Especula-se que a maior sobrevivência de meninas seja devido a seleção natural, que poupa a linhagem mais importante na perpetuação da espécie.

Em um estudo conduzido por Al-Sweih e colaboradores (2009) em uma UTIN do Kuwait, uma variedade de fatores de risco associados com o desenvolvimento de infecção invasiva por *Candida* em prematuros foi identificada, além do baixo peso e idade gestacional, destacando que 82% recebiam nutrição parenteral e 78% faziam uso de cateter venoso central, o que também está de acordo com resultados obtidos em nossa pesquisa.

Em relação a susceptibilidade antifúngica, todos os isolados foram sensíveis a anfotericina B. Resistência a esse antifúngico é incomum entre as principais espécies associadas com infecção neonatal (Chapman, 2007). Na Índia, Sharman e colaboradores (2011) em um estudo com neonatos portadores de candidemia, detectaram que houve 100% de sensibilidade à anfotericina B.

Algumas cepas de *C. albicans* foram resistentes simultaneamente ao fluconazol e ao voriconazol. Alguns autores afirmam que em pacientes que são expostos ao fluconazol,

possuem potencial de desenvolver resistência cruzada ao voriconazol (Alexander, *et al.*, 2005).

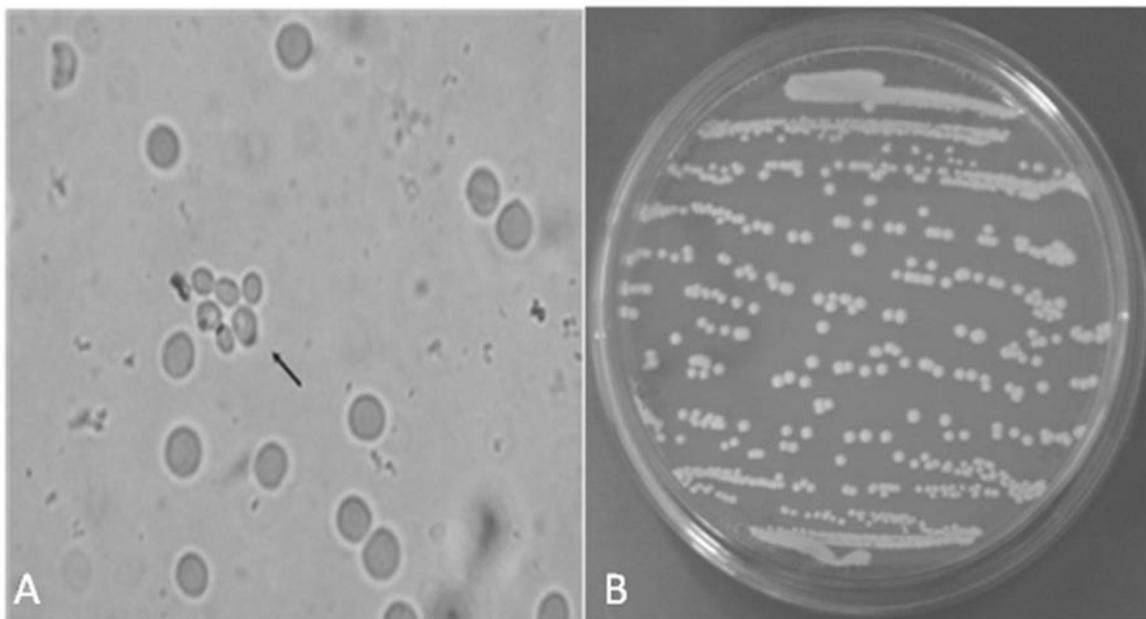
*Candida parapsilosis* e *C. guilliermondii* foram as espécies que apresentaram CIMs mais elevados frente a anidulafungina, sendo sete das onze cepas de *C. parapsilosis* consideradas resistentes. Este fato já tinha sido relatado na literatura por Pfaller e colaboradores em 2005 em uma avaliação com 2.500 isolados de *Candida* frente à anidulafungina, que se mostrou muito eficaz contra as espécies deste gênero. *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. kefyr* foram as espécies mais susceptíveis, enquanto *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* foram as que apresentaram menor sensibilidade.

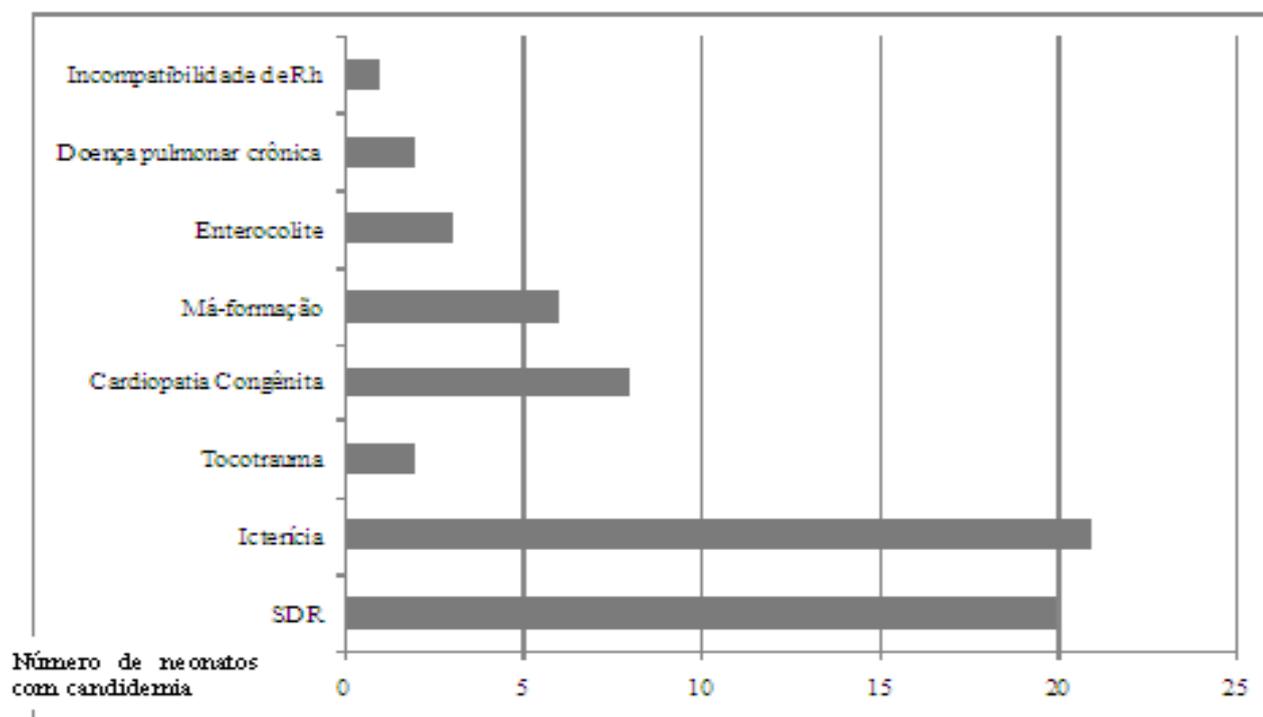
A partir dos resultados obtidos inferimos que pacientes prematuros, de baixo peso e que fazem uso de dispositivos invasivos são os mais acometidos. O conhecimento desses dados aliados aos resultados de susceptibilidade antifúngica *in vitro* possibilitam uma melhor prevenção e tratamento destas infecções.

#### **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos ao Conselho Nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq) pelo financiamento e a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) por disponibilizar a infraestrutura para realização deste trabalho.

**Figura 1.** A – Células de leveduras brotantes, ovais e hialinas em amostra de sangue, observadas ao exame direto; B – Cultura de *Candida* após cinco dias de crescimento a 35° C.





**Figura 2.** Condições clínicas pertinentes aos neonatos com candidemia diagnosticados em Unidades de Terapia Intensiva na cidade do Recife-PE.

- SDR = Síndrome do desconforto respiratório

**Tabela 1.** Concentração inibitória mínima (CIM) de isolados de *Candida* obtidos de hemoculturas de neonatos provenientes de Unidades de Terapia Intensiva frente à anfotericina B, fluconazol, voriconazol e anidulafungina.

CIM* (µg/ml)					
Registro	Espécie	Anfotericina B	Fluconazol	Voriconazol	Anidulafungina
6395	<i>Candida albicans</i>	0,12	64	16	0,01
6396	<i>C. albicans</i>	0,12	64	16	0,12
6394	<i>C. albicans</i>	0,06	64	4	0,12
6399	<i>C. albicans</i>	0,03	64	16	0,01
6397	<i>C. albicans</i>	0,03	8	4	0,03
6410	<i>C. albicans</i>	0,06	64	16	0,06
6400	<i>C. albicans</i>	0,03	4	16	0,12
6401	<i>C. albicans</i>	0,03	4	16	0,12
6414	<i>C. albicans</i>	0,12	0,25	0,03	0,06
6431	<i>C. albicans</i>	0,06	4	16	0,01
6402	<i>C. albicans</i>	0,25	64	16	0,06
6392	<i>C. glabrata</i>	0,03	0,5	0,5	0,03
6407	<i>C. parapsilosis</i>	0,03	4	2	2
6408	<i>C. parapsilosis</i>	0,03	1	0,25	0,25
6406	<i>C. parapsilosis</i>	0,03	4	4	8
6403	<i>C. guilliermondii</i>	0,03	0,5	0,5	1
6409	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	2	1	8
6398	<i>C. parapsilosis</i>	0,03	0,12	0,03	4
6404	<i>C. parapsilosis</i>	0,03	0,25	1	4
6405	<i>C. parapsilosis</i>	0,06	0,25	1	2
6429	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	0,25	0,12	4
6430	<i>C. parapsilosis</i>	0,03	0,5	0,03	0,12
6411	<i>C. parapsilosis</i>	0,06	0,12	0,03	8
6412	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,12	8
6283	<i>C. pelliculosa</i>	0,03	4	4	0,12
6281	<i>C. pelliculosa</i>	0,03	4	4	0,01
6280	<i>C. pelliculosa</i>	0,03	4	4	0,01
6279	<i>C. pelliculosa</i>	0,03	4	4	0,03
6345	<i>C. pelliculosa</i>	0,12	4	4	0,06
6413	<i>C. tropicalis</i>	0,12	4	16	0,06

\*CIM – Concentração Inibitória Mínima

## 6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

As infecções fúngicas invasivas são frequentes em neonatos, permanecendo as espécies de *Candida* como as mais isoladas. Pacientes prematuros, de baixo peso e que fazem uso de dispositivos invasivos são os mais acometidos. Frequentemente as condições clínicas associadas com o desenvolvimento de candidemia são icterícia e síndrome do desconforto respiratório. Desta forma, o conhecimento destes dados epidemiológicos é de grande relevância para possibilitar prevenção e um prognóstico mais favorável da doença.

Testes de susceptibilidade antifúngica *in vitro* possibilitam uma melhor prevenção e tratamento destas infecções, uma vez que direcionam a escolha do tratamento mais indicado, no entanto como foi verificado nesta pesquisa, resistência á antifúngicos por espécies de *Candida* pode ocorrer.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, J., Bansal, S., Mailk, G.K., Jain, A. 2004. Trends in neonatal septicemia: Emergence of non-albican *Candida*. *Indian Pediatr* 41:712-715.
- Alexander, B.D., Schell, W.A., Miller, J.L., Long, G.D., Perfect, J.R. 2005. *Candida glabrata* fungemia in transplant patients receiving voriconazole after fluconazole. *Transplantation* 80:868–871.
- Almirante, B., Rodriguez, D. 2007. Antifungal Agents in Neonates: Issues and Recommendations. *Pediatric Drugs* 9 (5): 311-321.
- Al-Sweih, N., Khan, K. Khan, S., Devarajan, L.V. 2009. Neonatal candidaemia in Kuwait: a 12-year study of risk factors, species spectrum and antifungal susceptibility. *Mycoses* 52(6): 518–523.
- Antunes, A.G.V., Pasqualotto, A.C., Díaz, M.C., d' Azevedo, P.A., Severo, L.C. 2004. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 46: 239-241.
- Arendrup, M. C., Fisher B. T., Zaoutis T. E. 2009. Invasive fungal infections in pediatrics and neonatal population: diagnostics and management issues. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 15: 613–624.
- Arnold, T.M., Dotson, E., Sarosi, G.A., Hage, C.A. 2010. Traditional and Emerging Antifungal Therapies. *Proceedings of The American Thoracic Society* 7: 222-228.
- Asmundsdottir, L.R., Guethnason, T., Elvarsson, F., Erlendsdottir, H., Johannsson, J.H., Hilmarsdottir, I., Gottfrethsson, M. 2001. Fungemia and other invasive fungal infections in Icelandic children. A nationwide study. *Laeknabladid* 87: 783-790.
- Avila-Aguero, M. L., Canas-Coto, A., Ulloa-Gutierrez, R., Caro, M. A., Alfaro, B., Paris, M. M. 2005. Risk factors for *Candida* infections in a neonatal intensive care unit in Costa Rica, *International Journal of Infectious Diseases* 9:90-95.
- Bakır, M., Çerikcioğlu, N., Tırtır, A., Berrak, S., Özek, E. Canpolat, C. 2004. *Pichia anomala* fungaemia in immunocompromised children. *Mycoses* 47: 231-235.
- Balkis M.M., Leidich S.D., Mukherjee, P.K., Ghannoum, M.A. 2002. Mechanisms of Fungal Resistance: An Overview. *Drugs* 62: 1025-1040.
- Baradkar, V.P., Mathur, M., Kumar, S., Rathi, M. 2008. *Candida glabrata* emerging pathogen in neonatal sepsis. *Ann Trop Med Public Health* 1:5-8.
- Barchiesi, F., Tortorano, A.M., Di Francesco Rigoni, L.F., Giacometti, A., Spreghini, E., et al. 2005. Genotypic variation and antifungal susceptibilities of *Candida pelliculosa* clinical isolates. *J. Med. Microbiol.* 54 (3): 279-285.

- Barnett, J.A., Paine, R.W., Yarrow, D. 2000. *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Benjamin, D.K., DeLong, E.R., Steinbach, W.J., Cotton, C.M., Walsh, T.J., Clarck, R.H. 2003a. Empirical therapy for neonatal candidemia in very low birth weight infants. *Pediatrics* 112 (3): 543-547.
- Benjamin Jr, D.K., Garges, H., Steinbach, W.J. 2003b. *Candida* bloodstream infection in neonates. *Semin. Perinatol* 27: 375-583.
- Bennett, R. J., Johnson, A. D. 2006. The role of nutrient regulation and the Gpa2 protein in the mating pheromone response of *C. albicans*. *Mol. Microbiol.* 62: 100-119.
- Blyth, C.C., Chen, S.C.A., Slavin, M.A., Serena, C., Nguyen, Q., Marriott, D., Ellis, D., Meyer, W., Sorrell, T.C. 2011. *Pediatrics* 123,1360.
- Bolard, J., Joly, V., YenI, P. 1993. Mechanism of action of amphotericin B at the cellular level. It's modulation by delivery system. *J. Liposome Res.* 3: 409-427.
- Bonassoli, L.A., Bertoli, M., Svidzinski, T.I. 2005. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *J. Hosp. Infect.* 59 (2): 159-162.
- Cano, M.V., Perz, J.F., Craig, A.S., et al. 2005. Candidemia in pediatric outpatients receiving home total parenteral nutrition. *Med. Mycol.* 43 (3): 219-22.
- Cantón, E.; Viudes, A.; Pemán, J. 2001. Infección sistémica nosocomial por levaduras. *Rev. Iberoam. Micol.* 18 (2): 51-55.
- Carvalho, L.P., Bacellar, O., Neves, N., Carvalho, E.M., Jesus, A.M. R. Avaliação da resposta imune celular em pacientes com candidíase recorrente. 2003. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36: 571-576.
- Castro, T.L., Coutinho, H.D.M., Gedeon, C.C., Santos, J.M., Santana, W.J., Souza, L.B.S. 2006. Mecanismos de resistência da *Candida* sp wwa antifúngicos. *Infarma* 18: 30-36.
- Chapman, R.L. 2007. Prevention and Treatment of *Candida* Infections in Neonates. *Seminars in Perinatology* 31:39-46.
- Chen, S.C.A., Slavin,, M.A.; Sorrell, T.C. 2011. Echinocandin Antifungal Drugs in Fungal Infections: A Comparison. *Drugs* 71 (1): 11-41.
- Choi, S., Lee, T., Kim, M., Lee, M., Jung, J. 2010. A Case of Fungal Arthritis Caused by *Hansenula anomala*. *Clin Orthop Surg.* 2 (1): 59-62.
- Clerihew, L., Lamagni, T.L., Brocklehurst, P., McGuire, W. 2007. *Candida parapsilosis* infection in very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 92: 127-129.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, 3rd ed. *CLSI document M27-A3*, Wayne, PA.

- Cohen-Wolkowicz, M., Moran, C., Benjamin, D.K., Smith, P.B. 2009. Pediatric Antifungal Agents. *Curr Opin Infect Dis.* 22(6): 553–558.
- Colombo, A.L., Guimarães, T. 2003. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36 (5): 599-607.
- Colombo, A.L., Nucci, M. Park, B.J, Nouér, S.A., Arthington-Skaggs, B., Matta, D.A., *et al.* 2006. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J. Clin. Microbiol.* 44: 2816-2823.
- Colombo, A.L.; Guimarães, T. 2007. Candiduria: a clinical and therapeutic approach. *Revista Brasileira de Medicina Tropical* 40 (3): 332-337.
- Cuenca-Estrella M., Rodríguez-Tudela, J.L. 2002. [Should antifungal treatments be based upon results of antifungal susceptibility testing?]. *Rev Iberoam Micol* 19 (3):133-8.
- Cunha, A., Queiroz Telles, F., Ribeiro, J. 2011. Antifúngicos e Infecções Fúngicas Junho 2011. *Apuabrasil.*
- David, C.M. 1998. Infecção em UTI. *Medicina* 31: 337-348.
- De Hoog, G.S., Guarro, J., Gene, J., Figueras, M.J. 2000. *Atlas of Clinical Fungi* (2<sup>nd</sup> edition). Holland: CBS; 215-216.
- Dismukes, W.E. 2000. Introduction to antifungal drugs. *Clin. Infect. Dis.* 30: 653-657.
- Ergon, M.C., Yucesoy, M. 2005. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from urine at an intensive care unit. *Mycoses* 48:126-131.
- Espinel-Ingroff, A., Canton, E., Peman, J., Martín-Mazuelo, E. 2010. Comparison of Anidulafungin MICs Determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute Broth Microdilution Method (M27-A3 Document) and Etest for *Candida* Species Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (3):1347–1350.
- Fay, E.M., Neal, N.J., Subhedar, N.V. 2002. Risk factors for invasive fungal infection in neonates. *Acta paediatrica* 91:198-202.
- França, J.C.B. 2006. Estudo das candidemias no Hospital de Clínicas no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2004. *Dissertação de Mestrado em Medicina Interna.* Universidade federal do Paraná, Curitiba.
- Frattarelli, D.A., Reed, M.D., Giacoia, G.P., Aranda, J.V. 2004. Antifungals in systemic neonatal candidiasis. *Drugs* 64:949-968.
- Fridkin, S.K., Kaufman, D., Edwards, J.R., Shetty, S., Horan, T. 2006. Changing incidence of *Candida* bloodstream infections among NICU patients in the United States: 1995–2004. *Pediatrics.* 117:1680–1687.
- Ghannoum, M.A., Chen, A., Buhari, M., Chandra, J., Mukherjee, P.K., Baxa, D., Golembieski, A., *et al.* 2009. Differential in vitro activity of anidulafungin,

casposfungin and micafungin against *Candida parapsilosis* isolates recovered from a burn unit. *Clinical Microbiology and Infection* 15: 274–279.

- Goel, N., Ranjan, P.K., Aggarwal, R., Chaudhary, U., Sanjeev, N. 2009. Emergence of Nonalbicans *Candida* in neonatal septicemia and antifungal susceptibility: Experience from a tertiary care center. *J Lab Physicians* 1:53-55.
- Gold, N., Stout, H.A., Pagano, I.F.; Donovan, R. 1956. Amphotericin A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. *In vivo* studies. *Antibiot. Annu.* 1955-1956: 579-586.
- Healy, C.M., Campbell, J.R., Zaccaria, E., Baker, C.J. 2008. Fluconazole Prophylaxis in Extremely Low Birth Weight Neonates Reduces Invasive Candidiasis Mortality Rates Without Emergence of Fluconazole-Resistant *Candida* Species. *Pediatrics* 121: 703–7010.
- Kalkanci, A., Dizbay, M., Turan, O., Fidan, I., Yalçın, B., Hirfanoglu, I., et al. 2010. Nosocomial transmission of *Candida pelliculosa* fungemia in a pediatric intensive care unit and review of the literature. *The Turkish Journal of Pediatrics* 52: 42-49.
- Kaufman, D., Boyle, R., Hazen, K.C., Patrie, J.T., Ronbinson, M., Donowitz, L.G. 2001. Fluconazole prophylaxis against fungal colonization and infection in preterm infants. *N. Engl. J. Med* 345: 1660-1666.
- Kossoff, E.H., Buescher, E.S., Karlowicz, M.G. 1998. Candidemia in a neonatal intensive care unit: trends during fifteen years and clinical features of 111 cases. *Pediatr Infect Dis J.* 17(6):504- 508.
- Krcmery, V., Huttova, M., Mateicka, F., Laho, L., Jurga, L., Ondrusova, A., et al. 2001. Breakthrough fungaemia in neonates and infants caused by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* susceptible to fluconazole in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* 48:521-525.
- Kuzucu, C., Durmaz, R., Otlu, B., Aktaş, E., Gulcan, E., Cizmeci, Z. 2008. Species distribution, antifungal susceptibility and clonal relatedness of *Candida* isolates from patients in neonatal and pediatric intensive care units at a medical center in Turkey. *New Microbiologica* 31: 401-408.
- Lacaz, C.S. Porto, E.; Martins, J.E.C.; Heins-vaccari, E.M.; Melo, N.T. 2002. *Tratado de Micologia Médica*, 9 ed., São Paulo, Sarvier.
- Lee, T.J.; Chun, J.K.; Kim, D.S. 2007. Epidemiology of Candidemia in Neonates and Children: A Single Center Experience from 2001 to 2006 39(5):248-254.
- Leung, A.Y., Chim, C.S., Ho, P.L., et al. 2002. *Candida tropicalis* fungemia in adult patients with haematological malignancies: clinical features and risk factors. *J. Hosp. Infect.* 50 (4): 316-319.
- Lupetti, A., Tavanti, A., Davini, P., Ghelardi, E., Corsini, V., Merusi, I., et al. 2002. Horizontal Transmission of *Candida parapsilosis* Candidemia in a Neonatal Intensive Care Unit. *J. Clin. Microbiol.* 2363–2369.

- Malani, A.N., Psarros, G., Malani, P.N., Kauffman, C.A. 2010. Is age a risk factor for *Candida glabrata* colonisation? *Mycoses*. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0507.2010.01941.x/full>.
- Manzoni, P., Farina, D., Leonessa, M., Antonielli d'Oulx, E., Galletto, P., Mostert, M., Miniero, R., Gomirato, G. 2006. Risk Factors for Progression to Invasive Fungal Infection in Preterm Neonates with Fungal Colonization. *Pediatrics* 118(6): 2359-2364.
- Manzoni, P., Stolfi, I., Pugini, L., Decembrino, L., Magnani, C., Vetrano, G., et al. 2007. A multicenter, randomized trial of prophylactic fluconazole in preterm neonates. *N Engl J Med*. 14 (24):2483–2495.
- Matta, V.L.R., Melhem, M.S.C., Colombo, A.L., Moretti, M.L., Rodero, L., Almeida, G.M. D., et al. 2007. Susceptibility profile to antifungal drugs of *Pichia anomala* isolated from patients presenting nosocomial fungemia. *Antimicrob. Agents Chemother*. 51(4):1573-1576.
- Maxwell, M.J., Messer, S.A., Hollis, R.J., Boyken, L., Tendolkar, S., Diekema, D.J., et al. 2003. Evaluation of Etest method for determining fluconazole and voriconazole MICs for 279 clinical isolates of *Candida* species infrequently isolated from blood. *J. Clin. Microbiol*, 41 (3): 1087-1090.
- Medeiros, E.A.S., Lott, T.J., Colombo, A.L., Godoy, P., Coutinho, A.P., Braga, M.S., et al. 2007. Evidence for a Pseudo-Outbreak of *Candida guilliermondii* Fungemia in a University Hospital in Brazil. *J. Clin. Microbiol.*45(3): 942-947.
- Mellado, E., Cuenca-Estrella M., Rodriguez-Tudela, J.L. 2002 Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clín* 20: 523-530.
- Melo L. L. S., Lima A. M. C., Damasceno C. A. V., Vieira A. L. P. 2009. Flora fúngica no ambiente da Unidade de Terapia. *Rev Paul Pediatr.*27(3):303-308.
- Mokaddas, E.M., Ramadan, S.A., Abo el Maaty, S.H., Sanyal, S.C. Candidemia in pediatric surgery patients. 2000. *Journal of chemotherapy* 12: 332-338.
- Moreira, M.E.L. 2005. Controvérsias a respeito da sepse fúngica no pré-termo extremo: profilaxia e esquemas terapêuticos. *Jornal de Pediatria* 81 (1): 52-58.
- Moudgal ,V., Little, T., Boikov, D., Vazquez, J.A. 2005. *Multi-echinocandin- and multiazole-resistant Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 767–769.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2002. Reference method for broth dilution testing of yeasts: Approved standard-second edition M27-A2. Wayne, PA.

- Nucci, M., Colombo, A.L., 2007. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 58: 77–82.
- Odio, C. M., Araya, R., Pinto, L. E. *et al.* 2004. Caspofungin therapy of neonates with invasive candidiasis. *Pediatr Infect Dis J.* 23 :1093– 1097.
- Panackal, A.A., Gribskov, J.L., Staab, J.F., Kirby, K.A., Rinaldi, M., Marr, K.A. 2006. Clinical significance of azole antifungal drug cross-resistance in *Candida glabrata*. *J. Clin. Microbiol.* 44:1740–1743.
- Pedroso, C.P.A., Krebs, V.L.J. 2008. Complications of systemic candidiasis in NICU. *Revista de Ciências médicas biológicas* 7(3): 280 – 288.
- Perfect, J.R. 2004. Antifungal resistance: the clinical front. *Oncology* 18:15-22.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Jones, R.N., Messer, S.A., Hollis, R.J. 2002. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 to 2000. *J. Clin. Microbiol.* 40: 852-856.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J. 2004a. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4419–4431.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J. 2004b. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clinical Microbiology and Infection* 1:11-23.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Rinaldi, M.G., Barnes, G., Hu, B., Veselov, A.V., *et al.* 2005. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* and Other Yeast Species to Fluconazole and Voriconazole by Standardized Disk Diffusion Testing. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (12): 5848-5859.
- Pfaller, M.A., Pappas, P.G., Wingard, J.R. 2006. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin Infect Dis* , 43: 3-14.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20: 133–163.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Gibbs, D.L., Newell, V.A., Ng, K.P., Colombo, A.L., Finkelstein, J., Barnes, R., *et al.* 2008a. 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. *Journal of Clinical Microbiology* 46(3): 842-849.
- Pfaller, M.A., Boyken, L., Hollis, L.J., Kroeger, J., Messer, S.A., Tendolkar, S., Diekema, D.J. 2008b. In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J. Clin. Microbiol.* 46:150–156.

- Rao S, Ali U. 2005. Systemic fungal infections in neonates. *J Postgrad Med.* 51:27-9.
- Reboli, C.M., Rotstein, C., Pappas, P.G., Chapman, S.W., Kett, D.H., Kumar, D., et al., 2007. Anidulafungin versus Fluconazole for Invasive Candidiasis. *N Engl J Med.* 356:2472-82.
- Ribeiro, E.L., Guimarães, I.I., Cardoso, M.C., Ferreira, Cardoso, C.G., Dias, S.M.S., Naves, P.L.F. 2004. Aspectos das leveduras de *Candida* vinculadas as infecções nosocomiais. *NewsLab*, ed. 64.
- Richtmann, R., Takagi, N.B., Valcilotto, E., Kusano, E., Marques, M.R.M., Baltieri, S.R., Arriero, G.D., Amaro, E.R. 2005. Candidemia em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal: onde Estamos? *Revista da Sociedade Paulista de Infectologia* 1:5-9.
- Roilides, E., Farmaki, E., Evdoridou, J., Dotis, J., Hatziionnidis, E., Tsivitanidou, M., et al. 2004. Neonatal candidiasis: analysis of epidemiology, drug susceptibility, and molecular typing of causative isolates. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 23:745-750.
- Saiman, L., Ludington, E., Dawson, J.D., Patterson, J.E., RANGEL-FRAUSTO, S., Wiblin, R., et al. 2001. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients, *Pediatr Infect Dis J* 20: 1119–1124.
- Sanglard, D. 2002. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeast. *Enferm Infec Microbiol Clín* 20 (9): 462-470.
- Sarvikivi, E., Lyytikäinen, O., Soll, D.R., Pujol, C., Pfaller, M.A., Richardson, M., et al. 2005. Emergence of Fluconazole Resistance in a *Candida parapsilosis* Strain That Caused Infections in a Neonatal Intensive Care Unit 43 (6): 2729-2735.
- Sastre, J.L., Cotallo, G.D.C., Colomer, B.F. 2009. Neonatal Invasive Candidiasis in Spain. An epidemiological study from the “Grupo de Hospitales Castrillo”. *Early human development* 85: 100.
- Sharman, M., Yadav, S. Aparna, Chaudhary, U. 2011. *Candida* Blood Stream Infections In Neonates. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2: 338-340.
- Sherf, A.F. 1943. A method for maintaining *Phytophthora sepedomica* for long periods without transference. *Phytopathology* 3: 30–32.
- Shin, J. H., Shin, D.H., Song, J.W., Kee, S.J., Suh, S.P., Ryang, D.W. 2001. Electrophoretic karyotype analysis of sequential *Candida parapsilosis* isolates from patients with persistent or recurrent fungemia. *J. Clin. Microbiol.* 39:1258–1263.
- Squibbs, B.M. 1998. Nosocomiais, Infecções. Educação médica continuada. *Brasil.* n. 6.
- Stevenson, D.K, Verter, J., Fanaroff, A.A., Oh, W., Ehrenkranz, R.A., Shankaran, S., Donovan, E.F. 2000. Sex differences in outcomes of very low birthweight infants: the newborn male disadvantage. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 83:182–185.

- Stoll, B.J., Hanssen, L., Fanaroff, A.A., Wright, L.L., Carlo, W.A., Ehrenkranz, R.A., Lemons, J.A., *et al.* 2002. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 110: 285-29.
- Trofa, D., Gacser, A., Nosanchuk, J.D. 2008. *Candida parapsilosis*; an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiology Rev.* 21(4): 606-625.
- Vendettuoli, V., Tana, M., Tirone, C., Posteraro, B., La Sorda, M., Fadda, G., Romagnoli, C., Vento, G. 2008. The role of *Candida* surveillance cultures for identification of a preterm subpopulation at highest risk for invasive. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 27: 114-116.
- Vendettuoli, V., Vento, G., Tirone, C., Posteraro, B., Romagnoli, C. 2009. Antifungal prophylaxis: identification of preterm neonates at highest risk for invasive fungal infection. *Pediatrics* 123: 368-369.
- Vento, S., Cainelli, F. 2003. Infections in patients with cancer undergoing chemotherapy: etiology, prevention, and treatment. *The Lancet Oncology* 4: 595-604.
- Walsh, T. J. *et al.* 2004a. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clinical Microbiology and Infection.* 10 (1): 48-66.
- Walsh, T.J., Karlsson, M.O., Driscoll, T. *et al.* 2004b. Pharmacokinetics and safety of intravenous voriconazole in children after single- or multiple-dose administration, *Antimicrob Agent Chemother* 48: 2166-2172.
- Wurthwein, G., Groll, A.G., Hempel, G., Adler-Shohet, F.C., Lieberman, J.M., Walsh, T.J. 2005. Population Pharmacokinetics of Amphotericin B Lipid Complex in Neonates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 5092-5098.
- Yalaz, M., Cetin, H., Akisu, M., Aydemir, S., Tunger, A., Kultursay, N., 2006. Neonatal nosocomial sepsis in a level-III NICU: evaluation of the causative agents and antimicrobial susceptibilities. *Turk. J. Pediatrics* 48: 13-18.
- Xavier, P.C.N. Chang, M.R. Nunes, M.O., Palhares, D.B., Silva, R.A.; Bonfim, G.F, *et al.* 2008. Neonatal candidemia in a public hospital in Mato Grosso do Sul. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41 (5): 450-463,
- Zaoutis T.E., Foraker, E., McGowan K.L., *et al.* 2005. Antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric patients: A survey of 4 children's hospitals. *Diag Microbiol Infect Dis* 52:295-298.
- Zaoutis, T.E., Heydon, K., Locali, O.R., Walsh, T.J., Feudtner, C. 2007. Outcomes attributable to neonatal candidiasis. *Clin Infect Dis.* 44 (9): 1187-1193.

## **ANEXOS**

## Formulário Epidemiológico

**Registro:**

**Data de nascimento:**

**Idade Gestacional:**

**Peso:**

**Tipo de parto:**

**Doença de base:**

- Apnéia
- Cardiopatia
- Distúrbio metabólico
- Enterocolite necrotizante
- Hemorragia intra-craniana
- Icterícia
- Má formação
- Sepsis precoce
- Sepsis tardia
- Síndrome do desconforto respiratório
- Síndrome genética
- Tocotraumatismo
- Outra: \_\_\_\_\_

**Uso de dispositivos medico-terapêuticos**

1. Ventilação mecânica –  Sim  Não

Data de início: \_\_\_\_\_

2. Cateter venoso central –  Sim  Não

Data de início: \_\_\_\_\_

3. Nutrição parenteral –  Sim  Não

Data de início: \_\_\_\_\_

4. Infusão de Intralipídeos  Sim  Não

Data de início: \_\_\_\_\_

**Uso de medicações:** Não  Sim  Qual? \_\_\_\_\_

### Dados maternos

**Idade:**

**Relato de aborto:** Não  Sim

**Doença materna crônica:** Não  Sim  Qual? \_\_\_\_\_

**Uso de medicamentos durante a gestação:** Não  Sim  Qual? \_\_\_\_\_

**Uso de drogas lícitas ou ilícitas durante a gestação:** Não  Sim  Qual? \_\_\_\_\_

**Ruptura prematura da membrana:** Não  Sim

**Febre intraparto:** Não  Sim  Temperatura? \_\_\_\_\_

**Candidíase materna:** Não  Sim

