

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

**CAROLINA MARIA DA SILVA**

**CANDIDEMIA EM NEONATOS: EPIDEMIOLOGIA, PERFIL DE  
SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA E AVALIAÇÃO DOS FATORES DE  
VIRULÊNCIA DOS AGENTES ETIOLÓGICOS**

**RECIFE**

**2015**

**CAROLINA MARIA DA SILVA**

**CANDIDEMIA EM NEONATOS: EPIDEMIOLOGIA, PERFIL DE  
SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA E AVALIAÇÃO DOS FATORES DE  
VIRULÊNCIA DOS AGENTES ETIOLÓGICOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Biologia de Fungos.

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

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

**RECIFE**

**2015**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Silva, Carolina Maria da**  
**Candidemia em neonatos: epidemiologia, perfil de susceptibilidade antifúngica e avaliação dos fatores de virulência dos agentes etiológicos/ Carolina Maria da Silva– Recife: O Autor, 2015.**

**119 folhas : il., fig., tab.**

**Orientadora: Rejane Pereira Neves**

**Coorientadora: Rosemary Machado de Jesus Amorim**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Biologia de Fungos, 2015.**

**Inclui bibliografia, apêndices e anexos**

- 1. Candidíase 2. Epidemiologia 3. Recém-nascidos I. Neves, Rejane Pereira (orientadora) II. Amorim, Rosemary Machado de Jesus (coorientadora) III. Título**

**616.969**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2016-009**

**CAROLINA MARIA DA SILVA**

**CANDIDEMIA EM NEONATOS: EPIDEMIOLOGIA, PERFIL DE  
SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA E AVALIAÇÃO DOS FATORES DE  
VIRULÊNCIA DOS AGENTES ETIOLÓGICOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 19/02/2015

**COMISSÃO EXAMINADORA**

\_\_\_\_\_  
Dr<sup>a</sup>. Rejane Pereira Neves (orientador) - Universidade Federal de Pernambuco

\_\_\_\_\_  
Dr. Guilherme Chaves - Universidade Federal do Rio Grande do Norte

\_\_\_\_\_  
Dr<sup>a</sup>. Danielle Patrícia Cerqueira Macedo - Universidade Federal de Pernambuco

\_\_\_\_\_  
Dr<sup>a</sup> Eulália Camelo Pessoa Azevedo Ximenes – Universidade Federal de Pernambuco

\_\_\_\_\_  
Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto – Universidade Federal de Pernambuco

***DEDICO***

*À Deus por ter me dado a vida e me guiar pelo caminho certo,  
aos meus pais Cláudia e Carlos, aos meus avós Suely e Carlos (in memoriam),  
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.*

## AGRADECIMENTOS

A todos os pequenos pacientes, especialmente queridos que, por causa da doença, fizeram parte deste trabalho. A todos que me ajudaram no desenvolvimento dessa pesquisa, de forma direta ou indireta. À todos os neonatologistas e residentes do Hospital das Clínicas-PE, em especial a Dr<sup>a</sup>. Maria de Fátima Gonçalves e Dr<sup>a</sup> Lindacir Sampaio que sempre contribuíram e deram apoio ao desenvolvimento de meu trabalho, bem como ao Dr. Moacir Jucá, infectologista do Hospital Agamenon Magalhães, por sua colaboração e constante preocupação com os pacientes. Não posso deixar de agradecer primordialmente a minha família (mãe, pai e avós) e a Pedro Borba, por sempre estarem ao meu lado e me apoiarem, com certeza eu não teria chegado aonde cheguei sem eles. Também agradeço 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, a minha co-orientadora Dra. Rosemary Amorim pelas importantes orientações até mesmo em momentos de dificuldade. Teço meus agradecimentos também aos meus queridos amigos Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Rabelo de Carvalho Parahym, Prof. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto e Prof<sup>a</sup>. Danielle Patrícia de Cerqueira Macêdo por terem me apoiado, aconselhado e acompanhado ao longo de toda esta trajetória, além de proporcionarem momentos de alegria e descontração tornando meu dia-a-dia mais tranquilo. 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. Por fim, não poderia deixar de agradecer também à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos e à Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) por terem me dado a oportunidade de obter essa formação.

## RESUMO

Infecções fúngicas hematológicas em neonatos ocorrem comumente associadas a diversos fatores. Dentre estas infecções destaca-se candidemia, a qual tem se tornado cada vez mais frequente. Os fatores relacionados incluem prematuridade e uso de dispositivos terapêuticos invasivos, determinando altos índices de morbi-mortalidade. Neste contexto, medidas preventivas às infecções fúngicas e instituição do tratamento adequado podem melhorar o cenário atual. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi diagnosticar infecções fúngicas em neonatos, definir o perfil epidemiológico e caracterizar os agentes etiológicos quanto a virulência e susceptibilidade antifúngica. Assim, amostras de sangue foram coletadas e processadas para exame direto e cultura. A virulência das leveduras foi avaliada através da capacidade de adesão dos agentes às células HeLa e produção de biofilme. Os testes de susceptibilidade antifúngica foram procedidos de acordo com o *Clinical Laboratory and Standards Institute* (CLSI) utilizando anfotericina B, voriconazol, fluconazol e as equinocandinas. Também foram incluídas nos testes cepas controle (ATCC) de *Candida tropicalis* e *C. parapsilosis*. No diagnóstico, foram verificadas estruturas fúngicas em parasitismo compatíveis com leveduras, sendo isoladas *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. haemulonii*, *C. guilliermondii*, *C. famata* e *C. glabrata*. A espécie mais isolada foi *C. parapsilosis* superando a ocorrência de *C. albicans*. Os dados epidemiológicos indicam como fatores associados aos casos de candidemia a prematuridade, baixo peso ao nascer, uso de dispositivos médico-invasivos e maior acometimento do sexo masculino. Com relação à virulência, isolados de *C. albicans* e *C. glabrata* foram os que apresentam maior capacidade de adesão às células HeLa e cepas de *C. albicans* e *C. parapsilosis* produziram biofilmes fortes. Também foi possível detectar raros casos de resistência aos antifúngicos testados. Os resultados obtidos ressaltam a importância do acompanhamento micológico em neonatos para minimizar o índice de morbi-mortalidades por infecções fúngicas, particularmente, candidemia.

**Palavras-chave:** Candidemia, Neonatos, Epidemiologia, *Candida* sp., Virulência, Susceptibilidade antifúngica.

## ABSTRACT

Hematologic fungal infections in newborns occur commonly associated with many factors. Among these infections stands out candidemia, which has become increasingly common. Related factors including prematurity and use of invasive therapeutic devices, determining high levels of morbidity and mortality. In this context, preventive measures to fungal infections and institution of appropriate treatment can improve the current situation. Thus, the objective of this study was to diagnose fungal infections in neonates, set the epidemiological profile and characterize the etiologic agents in virulence and antifungal susceptibility. Blood samples were collected and processed for direct examination and culture. The virulence of yeast was assessed by the ability of agents adhere to HeLa cells and biofilm production. The antifungal susceptibility testing was proceeded according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) using amphotericin B, voriconazole, fluconazole and echinocandins. Also were included in the test control strains (ATCC) of *Candida tropicalis* and *C. parapsilosis*. At diagnosis, fungal structures were observed in parasitism compatible with yeast, being isolated *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. haemulonii*, *C. guilliermondii*, *C. famata* and *C. glabrata*. The most frequent species was *C. parapsilosis* surpassing the occurrence of *C. albicans*. Epidemiological data indicate some factors associated with cases of candidemia as prematurity, low birth weight, use of invasive medical devices and greater prevalence of males. Regarding the virulence isolates of *C. albicans* and *C. glabrata* were those with greater ability to adhere to HeLa cells and strains of *C. albicans* and *C. parapsilosis* produced strong biofilms. It was possible to detect rare cases of antifungal resistance. The results highlight the importance of mycological monitoring in neonates to minimize the morbidity and mortality rate due to fungal infections, particularly candidemia.

**Key-words:** Candidemia, Neonates, Epidemiology, *Candida* sp., Virulence, antifungal susceptibility.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	<b>Pág.</b>
Figura 1 - A – Exame direto de amostra de sangue evidenciando células de leveduras brotantes, ovais e hialinas; B – Cultura de <i>Candida</i> sp. após 24 horas de semeio de hemocultura e incubação a 37°C.	64
Figura 2 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) evidenciando células de leveduras esféricas ou ovóides, com brotamento e isoladas de <i>Candida haemulonii</i> .	65
Figura 3 – Gel de agarose obtido através dos produtos da RAPD-PCR utilizando o RP4-2. M: Marcador de pares de base 10kb; os isolados de <i>Candida parapsilosis stricto sensu</i> (6411, 6429, 89, 83, 145); <i>Candida orthopsilosis</i> (57, 87); <i>Candida metapsilosis</i> (76); C: Controle negativo; B: Branco.	66
Figura 4 – Adesão de leveduras às células HeLa. A: Fraca aderência por isolado de <i>Candida guilliermondii</i> ; B: Moderada aderência por isolado de <i>C. parapsilosis</i> ; C: Forte aderência por isolado de <i>C. albicans</i> .	68
Figura 5 - Formação de biofilme com diferentes intensidades expressas por espécies de <i>Candida</i> isoladas em hemocultura de neonatos. Fraca capacidade de formação de biofilme: 63, 86; capacidade moderada: 76, 89, 91, 87, 83; forte capacidade: 57, 85.	70

## LISTA DE TABELAS

	<b>Pág.</b>
Tabela 1 - Interpretação de testes de susceptibilidade antifúngica <i>in vitro</i> de isolados de <i>Candida</i> frente às equinocandinas	62
Tabela 2 - Interpretação de testes de susceptibilidade antifúngica <i>in vitro</i> de isolados de <i>Candida</i> spp. frente ao fluconazol e ao voriconazol	63
Tabela 3 – Agentes etiológicos de candidemia de recém-nascidos hospitalizados em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal	65
Tabela 4 – Dados epidemiológicos associados aos neonatos diagnosticados com candidemia em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal de Recife-PE.	67
Tabela 5 - Capacidade de adesão às células HeLa por isolados de <i>Candida</i> proveniente de hemoculturas de neonatos internados em Unidades de Terapia Intensiva.	69
Tabela 6 - Formação de biofilme por isolados de <i>Candida</i> proveniente de hemoculturas de neonatos.	70
Tabela 7 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos isolados provenientes de amostras sanguíneas de neonatos internados em Unidades de Terapia Intensiva frente à anfotericina B, voriconazol e fluconazol.	72
Tabela 8 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos isolados provenientes de amostras sanguíneas de neonatos internados em Unidades de Terapia Intensiva frente às equinocandinas.	73

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABCD	Anfotericina B dispersão coloidal
ABLC	Anfotericina B complexo lipídico
ALT	Alanina amino transferase
AST	Aspartato amino transferase
BHI	Ágar “Brain Heart Infusion”
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIM <sub>50</sub>	Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir o crescimento de 50% dos isolados
CIM <sub>90</sub>	Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir o crescimento de 90% dos isolados
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHC	2,5-Ácido dihidroxibenzóico
DMSO	Dimetil sulfóxido
ITS	Espaçador ribossomal interno transcrito
L-amb	Anfotericina B lipossomal
LB	Ágar Luria-Bertani
LCR	Líquido céfalo-raquidiano
MALDI TOF-MS	Espectometria de massa por tempo de voo
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NPT	Nutrição parenteral total
PK	Farmacocinética
RAPD	Ampliação Randômica de DNA Polimórfico
RN	Recém-nascido
SADH	Enzima álcool secundário desidrogenase
SAD	Sabouraud dextrose ágar
SNC	Sistema nervoso central
TFA	Ácido trifluoroacético
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UTIN	Unidade de Terapia Intensiva Neonatal

YEPD

Meio dextrose peptona extrato de levedura

## SUMÁRIO

	Pág.
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 OBJETIVOS .....	16
<b>1.1.1 Objetivos Gerais</b> .....	16
<b>1.1.2 Objetivos Específicos</b> .....	16
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	17
2.1 INFECÇÕES FÚNGICAS INVASIVAS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL .....	17
<b>2.1.1 Candidemia</b> .....	18
2.1.1.1 Fatores de risco .....	20
2.1.1.2 Principais espécies de <i>Candida</i> .....	23
2.2 COMPLEXO <i>CANDIDA PARAPSILOSIS</i> .....	29
2.3 IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO <i>CANDIDA</i> ATRAVÉS DA ESPECTOMETRIA DE MASSA POR TEMPO DE VOO (MALDI-TOF MS) .....	32
2.4 FATORES DE VIRULÊNCIA ASSOCIADOS A INFECÇÕES POR ESPÉCIES DE <i>CANDIDA</i> .....	34
<b>2.4.1 Adesão às células epiteliais</b> .....	35
2.4.1.1 Adesão de <i>Candida</i> às células HeLa .....	37
<b>2.4.2 Formação de biofilme por espécies de <i>Candida</i></b> .....	38
2.5 SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i> .....	40
<b>2.5.1 Poliênicos</b> .....	42
<b>2.5.2 Azólicos</b> .....	44
<b>2.5.3 Equinocandinas</b> .....	49
<b>3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b> .....	53
3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS .....	53
3.2 MANIPULAÇÃO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS .....	53
3.3 PURIFICAÇÃO DAS CULTURAS .....	53
3.4 IDENTIFICAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS .....	54
<b>3.4.1 Identificação clássica</b> .....	54
<b>3.4.2 Identificação proteômica por MALDI-TOF MS</b> .....	55
<b>3.4.3 Identificação molecular</b> .....	56
3.5 DIFERENCIAÇÃO DE LEVEDURAS DO COMPLEXO <i>CANDIDA PARAPSILOSIS</i> ....	

	58
3.6 ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS .....	59
3.7 ANÁLISE DA VIRULÊNCIA .....	59
<b>3.7.1 Cultura de células HeLa</b> .....	59
<b>3.7.2 Formação de biofilme</b> .....	60
3.8 SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i> .....	60
<b>4. ANÁLISE DE RESULTADOS</b> .....	64
4.1 DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO E IDENTIFICAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS .....	64
4.2 DIFERENCIAÇÃO DE LEVEDURAS DO COMPLEXO <i>CANDIDA PARAPSILOSIS</i> ....	66
4.3 ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS .....	67
4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS QUANTO A VIRULÊNCIA ...	68
4.5 SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i> .....	71
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	74
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	80
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	81
<b>8. APÊNDICES</b> .....	103
<b>9. ANEXOS</b> .....	118

## 1 INTRODUÇÃO

A incidência de infecções fúngicas invasivas em neonatos, 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 pelo aumento destas enfermidades, tais como, maior sobrevivência de neonatos prematuros, quimioterapia abrasiva utilizada em terapia anticâncer e aumento do número de transplante de órgãos e medula óssea (Arendrup, 2009).

O tempo de permanência hospitalar prolongado, sobretudo em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), prematuridade e baixo peso ao nascer, bem como uso de antibioticoterapia de largo espectro e de dispositivos terapêuticos invasivos, favorecem a ocorrência de infecções fúngicas nosocomiais graves em recém-nascidos (Spiliopoulou *et al.*, 2012).

Espécies de *Candida* são os principais agentes etiológicos das infecções fúngicas invasivas em UTIs Neonatais (UTIN), destacando-se *Candida albicans*. Contudo, em prematuros, *C. parapsilosis* tem sido a espécie de *Candida* não-*albicans* mais frequente, com incidência comparada a *C. albicans* (Hammoud *et al.*, 2013). Isolados de *C. parapsilosis* foram reclassificados em três espécies distintas, morfologicamente indistinguíveis, com base na heterogeneidade genética, na qual esta espécie foi então denominada *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (Tavanti *et al.*, 2005).

A maioria dos fatores associados ao aumento do risco às infecções fúngicas invasivas está relacionada com as características epidemiológicas, incluindo, aspectos clínicos, dados demográficos, prematuridade, estado imunológico entre outras condições (Bermagasco *et al.*, 2012; Diekema *et al.*, 2012).

Contudo, a ocorrência destas infecções possui outros fatores importantes relacionados, dentre eles a capacidade dos fungos em aderir, infectar e causar a doença que é definido como potencial de virulência, sendo o evento inicial na patogênese destas infecções a adesão às células do tecido hospedeiro, bem como a capacidade de formar biofilmes ou agregados multicelulares (Weinberg, 2008).

Alguns micro-organismos não invasivos permanecem aderidos à superfície hospedeira, enquanto outros, como as leveduras do gênero *Candida* utilizam essa adesão como primeira etapa para a invasão tecidual (Weinberg, 2008).

Além da capacidade de adesão às células epiteliais, a capacidade de formar biofilmes, agregados unicelulares gerando estruturas multicelulares que se aderem a

superfícies, está associada com alto nível de resistência aos antifúngicos e às defesas do hospedeiro. Infecções causadas por *Candida* estão, em grande parte, relacionadas com a formação de biofilme na superfície de dispositivos médico-terapêuticos, tais como sondas e cateteres venosos (Hasan *et al*, 2009).

O conhecimento dos fatores epidemiológicos e de virulência dos agentes etiológicos aliados à realização de testes de susceptibilidade antifúngica *in vitro* pode auxiliar na conduta terapêutica a ser instituída, 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 matar o agente causal da infecção fúngica (Colombo; Guimarães, 2007).

O impacto de uma micose invasiva em um neonato pode ser devastador. Desta forma, a prática de um diagnóstico micológico precoce e preciso aliado à investigação de dados epidemiológicos e de características patogênicas que influenciam na aquisição de fungemia facilitam na escolha de um tratamento específico, bem como o planejamento de estratégias de redução do número de casos de infecções em neonatos.



## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Diagnosticar infecções fúngicas em neonatos, definir o perfil epidemiológico e de virulência dos agentes através da capacidade de adesão a células HeLa e produção de biofilme, além de definir o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Detectar estruturas fúngicas em amostras clínicas de sangue de neonatos internados em unidades hospitalares;
- Isolar e identificar os agentes etiológicos das infecções fúngicas hematogênicas, determinando as espécies fúngicas de maior ocorrência;
- Relacionar dados epidemiológicos referentes às infecções fúngicas hematogênicas;
- Verificar a capacidade de aderência às células HeLa dos isolados de fungos provenientes das amostras de sangue de neonatos internados;
- Detectar a capacidade de formação de biofilmes das culturas de fungos isoladas das amostras de sangue;
- Avaliar atividade antifúngica *in vitro* e correlacionar a concentração inibitória e fungicida dos fármacos comercialmente disponíveis.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 INFECÇÕES FÚNGICAS INVASIVAS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL

As infecções nosocomiais são responsáveis por morbidade e mortalidade expressivas no período neonatal, sendo a Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) considerada área crítica, devido às condições clínicas graves dos pacientes, bem como os procedimentos invasivos necessários no tratamento e frequentes comorbidades como as infecções por micro-organismos. Dentre as infecções mais frequentes tem sido evidenciada uma preocupação especial com as de etiologia fúngica que muitas vezes determina uma piora clínica no estado geral do paciente, sobretudo quando o fungo se encontra presente na circulação sanguínea (Colombo *et al.*, 2006).

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

A septicemia neonatal classifica-se em sepse precoce, aquela que ocorre nas primeiras 48 a 72 horas de vida e sepse tardia, que ocorre após as primeiras 48 a 72 horas de vida (Silveira e Procianoy, 2011). A sepse fúngica ocorre especialmente nos neonatos de muito baixo peso (até 1,5 kg ao nascer), sendo usualmente uma condição grave relacionada a uma elevada morbi-mortalidade. Os sinais clínicos são variados e usualmente, podem ser confundidos com os observados em infecções causadas por bactérias (Pedroso; Krebs, 2008).

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, uma vez que a chance de detectar o micro-organismo em apenas 1 mL de sangue é bastante reduzida. Contudo, hemoculturas com ausência de crescimento fúngico não descarta o diagnóstico de infecção (Borges *et al.*, 2009).

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 de sítio estéril associado aos sinais clínicos de infecção. Em geral esse quadro clínico é diagnosticado por volta da terceira semana de vida. A capacidade de

diagnosticar essas infecções é limitada e os resultados das culturas geralmente são conclusivos após uma semana ou até mais tempo (Couto *et al.*, 2011).

Espécies de *Candida* são um dos principais e mais prevalentes agentes etiológicos de sepse em recém-nascidos (RNs), sendo a candidemia reconhecida como grave problema de saúde pública nas regiões subdesenvolvidas, mas também é preocupante nos países desenvolvidos. A gravidade da doença, associada a condições debilitantes, leva a um aumento do tempo de internação hospitalar, acarretando elevação nos custos socioeconômicos. Adicionalmente, outro fator relevante é que as complicações clínicas decorrentes da candidemia são graves, refletindo em altas taxas de morbimortalidade (Giolo e Svidzinski, 2010; Lucignano *et al.*, 2011).

### **2.1.1 Candidemia**

A candidemia é caracterizada por espécies do gênero *Candida* na corrente sanguínea. Este gênero é composto por espécies ubíquas que podem integrar a microbiota normal da mucosa oral, pele, trato genito-urinário e tubo digestório. Apesar de apenas uma pequena percentagem dos isolados causarem doenças em seres humanos, são responsáveis por um grande espectro de manifestações clínicas que vão desde infecções superficiais a invasivas, como a candidemia. A infecção pode ocorrer por via endógena, a partir da colonização do trato gastro-intestinal ou mucocutânea, ou por via exógena, através das mãos de trabalhadores de saúde, infusões contaminadas e fômites (Pfaller e Diekema, 2007; Tragiannidis *et al.*, 2013).

Em pacientes graves, sobretudo prematuros, o diagnóstico de candidíase invasiva é um desafio, pois os sinais e sintomas são variáveis e inespecíficos. Os principais indícios de fungemia seriam febre e leucocitose, porém 20% dos pacientes não desenvolvem hipertermia e apenas 50% apresentam leucocitose. O diagnóstico de candidíase sistêmica vai exigir do neonatologista um elevado grau de suspeita clínica. Alguns autores consideram que qualquer paciente que apresente deterioração clínica na vigência de antibioticoterapia de amplo espectro e sem causa aparente detectável deve estar sob suspeita de infecção fúngica, especialmente se fatores de risco estiverem presentes (Moreira, Lopes e Carvalho, 2004; Mikulska *et al.*, 2010).

Adicionalmente, os procedimentos diagnósticos existentes apresentam inconvenientes. As hemoculturas possuem baixa sensibilidade (30% -50%) e necessitam de um longo tempo de incubação. Além disso, podem ocorrer casos falso-negativos

quando há profilaxia com fluconazol (Mikulska *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2012). Além disso, a suscetibilidade a antifúngicos pode variar entre as diferentes espécies de *Candida*. Portanto, a sobrevivência de pacientes críticos com candidemia associa-se diretamente à precoce identificação da espécie envolvida no processo infeccioso. Assim, a utilização de metodologia rápida que resulte na precisa identificação da espécie e do perfil de sensibilidade é fundamental para o tratamento clínico (Mímica *et al.*, 2009).

A taxonomia de leveduras é baseada em várias provas que avaliam as características morfológicas e bioquímicas desses micro-organismos. Essas provas fazem parte dos métodos fenotípicos tradicionais para a identificação de leveduras usadas em laboratórios do mundo todo, considerados métodos clássicos e padrão ouro para essa finalidade (Giolo; Svidzinsk, 2010).

Ademais novos métodos automatizados, imunológicos e moleculares têm sido desenvolvidos visando obter um diagnóstico seguro de forma mais rápida e precisa, conseqüentemente melhor prognóstico (Giolo; Svidzinsk, 2010).

A incidência de infecções hematogênicas por espécies de *Candida* em RNs aumentou significativamente nas últimas décadas, sendo este o terceiro micro-organismo mais isolado de hemoculturas em casos de sepse neonatal tardia (Hammoud *et al.*, 2013), sendo também considerado como a segunda maior causa de morte relatada por sepse em UTIN (Panackal, 2013).

Stoll e colaboradores, em 2002, destacaram o aumento da prevalência de fungos como causa 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% (Stoll *et al.*, 1996). Segundo Benjamin *et al.* (2003) a mortalidade atribuída a candidemia em neonatos é elevada, variando entre 25 a 54% , podendo chegar até 70% em prematuros de muito baixo peso.

Agarwal *et al.* (2004) em pesquisa prospectiva, entre 2002 e 2003, avaliaram a ocorrência de candidemia em neonatos hospitalizados em UTI de um hospital indiano, e verificaram uma alta taxa de mortalidade, onde 50,2% das crianças infectadas foram a óbito.

França (2006) afirma que dentre as infecções fúngicas hospitalares, 78,3% dos agentes etiológicos 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 candidemia em 26,7% dos recém-nascidos com menos de 1.500g.

No Canadá, em um estudo prospectivo realizado em 13 UTINs, foi detectada uma taxa de mortalidade atribuída a candidemia equivalente a 30% dos casos (Robison *et al.*, 2009). Blyth *et al.* (2009), afirmam que as fungemias por espécies de *Candida* frequentemente complicam o curso clínico de RNs prematuros, principalmente os que possuem alguma doença de base.

Benjamim *et al.* (2010) destacam que as candidíases hematogênicas aumentam o risco de morte em RNs. Em estudo desenvolvido por estes autores foi constatado que 47 crianças das 137 (34%) que apresentavam candidemia foram a óbito, enquanto entre os neonatos que não possuíam candidíase invasiva 197 de 1378 (14%) faleceram.

Celebi e colaboradores (2012) destacam candidemia como a segunda maior causa de morte relacionada à doença infecciosa em RN prematuros, correspondendo a 10% de todos os casos de sepse e sendo a maior causa de infecção tardia em neonatos prematuros com incidência variável e taxa de mortalidade elevada. Atualmente outros autores sustentam a afirmação de que a mortalidade decorrente da candidemia em RNs prematuros é elevada, variando de 20 a 50% (Cahan *et al.*, 2011.; Greenberg *et al.*, 2012; Ben Abdeljelil *et al.*, 2012).

Associado aos danos advindos da candidemia, a dificuldade de um diagnóstico precoce e o alto custo dos medicamentos mais recentes, agravam ainda mais o quadro clínico do paciente, sobretudo quando associado a alguns fatores de risco (Bicanic e Harrison, 2014).

#### 2.1.1.1 Fatores de risco

O recém-nascido crítico é colonizado muito cedo por *Candida*, cerca de 10% destes se tornam colonizados na primeira semana de vida, e mais de 64% estão colonizados após quatro semanas de hospitalização. A ocorrência desta colonização tem sido mostrada em alguns estudos como um fator de risco independente para candidemia (Borges *et al.*, 2009).

A predisposição para candidemia em UTIN inclui: baixo peso ao nascer, prematuridade, sistema imunológico deficitário, uso de cateter venoso central e arterial, cateter umbilical, nutrição parenteral total (NPT), uso de antibióticos de amplo espectro, administração de terapia imunossupressora, aplicação de emulsão lipídica intravenosa, queimaduras extensas, entubação endotraqueal, sonda nasogástrica em procedimentos cirúrgicos e hospitalização prolongada (Fernandez *et al.*, 2007; Gondim *et al.*, 2009; Baradkar *et al.*, 2009; Becerra *et al.*, 2010). Também são relatados o contato direto entre pacientes, presença de micro-organismos patogênicos nas mãos de profissionais de saúde, assepsia indevida de instrumentos cirúrgicos e materiais hospitalares além do uso de ventilação mecânica por período superior a sete dias (Ariff *et al.*, 2011).

Wu e Mu (2012) afirmam que todos os cateteres são fontes potenciais de infecções hospitalares, especialmente cateteres centrais por facilitarem a adesão do micro-organismo mantendo-o em contato direto com a corrente sanguínea, sendo o gênero *Candida* o mais associado a estas infecções.

Manzoni e colaboradores (2012) ainda destacam que o alto número de pacientes na UTIN, baixa proporção enfermeiro/paciente e práticas precárias de higiene, bem como outros fatores de risco independentes, como o parto vaginal e ruptura da pele que intensificam o desenvolvimento de colonização por *Candida*.

A candidíase invasiva pode ser de origem endógena ao ocorrer a partir de uma colonização da mucosa gastrintestinal, sendo a boca porta de entrada para infecções fúngicas oportunistas e a candidíase bucal uma possível fonte primária para a colonização da mucosa gastrintestinal e disseminação sistêmica da infecção fúngica através dos capilares mesentéricos. Nos casos de candidemia de origem exógena a transmissão perinatal de leveduras do gênero *Candida* pode ser vertical, quando a mãe transmite para o filho durante o nascimento, ou horizontal, a partir de contaminação do ambiente (Ben Abdeljelil *et al.*, 2012).

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 Kuzucu 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 (NPT) 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*. 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, 87% das crianças fizeram uso de dois ou mais antibióticos de amplo espectro, além disso, 82% recebiam NPT, 78% faziam uso de cateter venoso central e 54% tiveram colonização prévia por espécies de *Candida*, principalmente na traqueia e no reto.

Pesquisas sobre vigilância epidemiológica em UTIN no Hospital de Uberlândia (Brasil), entre os anos de 2007 e 2008, evidenciaram que colonização e sepse por *Candida* spp. estavam relacionadas com idade gestacional entre 26 e 30 semanas, uso prévio de antibióticos e de cateter vascular central umbilical (Borges *et al.*, 2009).

Wang *et al.* (2011) realizaram um estudo retrospectivo em Hospital pediátrico dos Estados Unidos do período de 1990 a 2008, onde foram diagnosticados 103 casos de candidíase invasiva em recém-nascidos. Os autores destacaram como os mais importantes fatores de risco a doença cardíaca congênita, uso de NPT, e cirurgia abdominal. Sendo este o primeiro estudo a incluir a doença cardíaca congênita como importante fator predisponente para candidemia.

Em uma pesquisa em UTIN grega, dentre os 40 casos de candidemia diagnosticados todos os pacientes apresentaram pelo menos um dos fatores de risco identificados, dentre eles, baixo peso ao nascer (85%), baixa idade gestacional (82.5%), uso prévio de esteroides e antibióticos (90%), uso de cateter venoso central (75%), intubação endotraqueal (80%), NPT (95%), bacteremia prévia (100%), patologia gastrointestinal (12.5%), síndrome do desconforto respiratório (47.5%), anemia (25%), desordens do sistema nervoso central (10%), má-formação cardíaca (15%), má-formação do trato digestório (7.5%), bem como falência hepática e renal (7.5%) (Spiliopoulou *et al.*, 2012).

Tinoco-Araújo e colaboradores (2013), em estudo brasileiro, afirmam que a ocorrência de candidíase sistêmica em RNs tem uma direta correlação com o tempo prolongado de internação hospitalar, com o maior risco de infecção variando da segunda até a quarta semana de vida. Quanto mais prolongado o tempo de internação, maior o tempo de uso de cateter venoso central e de medicamentos, assim como é maior o tempo de exposição a fatores ambientais. No mesmo ano Soares e colaboradores (2013) avaliaram 36 casos de candidemia neonatal na região Norte do Brasil, dos quais 31 ocorreram em UTIN e cinco em Unidade de Cuidados Intensivos (UCI), com coeficientes de incidência de 15,1 e 0,9 casos a cada mil admissões, respectivamente. Dentre os pacientes, 61,1% eram do sexo masculino, 80,6% prematuros e 58,3% nasceram com muito baixo peso. O intervalo de tempo entre a internação e o diagnóstico laboratorial de candidemia foi, em média, de 17 dias e o tempo médio de internação de 56 dias (desvio padrão =  $\pm 32$ ). Aproximadamente metade dos casos evoluiu para óbito.

Juyal *et al.* (2013) relatam um surto de candidemia em UTIN indiana, todos os neonatos afetados faziam uso de cateter venoso central e estavam em uso de antibióticos de amplo espectro e NPT, aproximadamente 67% eram prematuros de muito baixo peso, sendo estes fatores citados considerados os de maior risco para a ocorrência das infecções.

Batista e colaboradores (2014) ainda destacam a previa colonização da mucosa oral como importante fator de risco para disseminação hematogênica. Estes autores avaliaram que em uma UTIN brasileira a maioria dos RNs com candidemia por *C. albicans* possuíam colonização oral, sendo verificada similaridade genética entre os isolados em 83,4% dos casos. No entanto, fungemia por *C. parapsilosis* não ocorreu associação com colonização previa o que indica que o provável foco da infecção ocorreu do meio externo, como por exemplo, pelas mãos dos profissionais de saúde.

Para Giolo *et al.*, (2010) a identificação das espécies envolvidas em casos de candidemia é de extrema relevância visto que, as diferenças fenotípicas e genotípicas de cada espécie geram diferentes padrões de infecção, virulência, ocorrência e susceptibilidade antifúngica

#### 2.1.1.2 Principais espécies de *Candida*

De acordo com Mokaddas *et al.* (2000) a incidência de candidemia em pacientes neonatos é frequente, destacando-se as causadas por *C. albicans*. Apesar desta espécie



ser historicamente a mais isolada, infecções causadas por espécies de *Candida* não-*albicans* tem sido comumente diagnosticadas, 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 as espécies envolvidas em candidemia neonatal foram *C. albicans* (56%), complexo *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* das que apresentavam neutropenia.

Vendettuoli e colaboradores em 2008 verificaram que *C. albicans* é a principal espécie capaz de causar infecção hospitalar em UTIN; entretanto, outras espécies de *Candida* não-*albicans* foram detectadas incluindo *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata*. Porém em uma pesquisa multicêntrica realizada por Sastre e colaboradores (2009) na Espanha foi constatada que dentre os agentes etiológicos de candidemia neonatal a prevalência foi de *C. parapsilosis* (42%), seguida por *C. albicans* (38,5%), *C. tropicalis* (6,15%) e *C. glabrata* (4,6%).

Apesar de uma prevalência mundial de *C. albicans*, alguns autores dão destaque a regiões como Brasil, Portugal e Espanha, onde muitas vezes a incidência de candidemia por *C. parapsilosis* se torna maior (Costa-de-Oliveira *et al.*, 2008; Neu *et al.*, 2009). Blyth *et al.* (2009) em um estudo realizado na Austrália comparando neonatos, crianças e adultos destacaram *C. albicans* e *C. parapsilosis* como espécies mais frequentemente isoladas de neonatos e crianças. *C. parapsilosis* foi significativamente mais comum em neonatos (42,4%) e em crianças (38,3%); os adultos corresponderam a 14,9% dos casos que ocorreram foram por esta espécie.

Gondim e colaboradores (2009) avaliaram as taxas de sepse por *C. albicans* e *Candida* não-*albicans* na UTIN do Hospital de Clínicas de Uberlândia, durante janeiro de 2002 a dezembro de 2007. Foram detectados 19 casos com 47,4% por *C. albicans*, 26,3% por *C. krusei*, 10,53% por *C. parapsilosis*, 5,3% por *C. tropicalis* e 10,5% por *C. glabrata*.

Nos Estados Unidos Benjamin e colaboradores (2010) diagnosticaram 137 casos de candidemia em recém-nascidos, dentre os agentes etiológicos foram identificados *C. albicans* (87), *C. parapsilosis* (41), *C. glabrata* (5), *C. lusitaniae* (1), *C. tropicalis* (1), *C. guilliermondii* (1), não foram identificadas quatro culturas e foram constatados três casos de sepse simultânea por *C. albicans* e *C. parapsilosis*.

Cahan e Deville (2011) relataram a ocorrência de 63 casos de candidemia neonatal no período de 1998 a 2002 em um centro hospitalar americano e verificaram que *C. albicans* foi a espécie mais isolada correspondendo a 57% dos casos, seguida por *C. parapsilosis* (27%), *C. tropicalis* (5%), *C. lusitaniae* (3%) e *C. glabrata* (2%). Em outro estudo norte americano Wang e colaboradores (2011) também identificaram *C. albicans* como o agente mais frequente de candidemia neonatal (42%), seguida por *C. parapsilosis* (38%).

Um estudo grego retrospectivo teve uma maior ocorrência em UTIN de infecção sistêmica por *C. albicans*, que correspondeu a 67,5% dos casos, seguida por *C. parapsilosis* (25%), *C. tropicalis* (5%) e *C. glabrata* (2,5%) (Spiliopoulou *et al.*, 2012). Em estudo brasileiro em UTIN de Hospital da Bahia, constatou-se que dentre os 73 agentes etiológicos de candidemia isolados e identificados houve predominância de *C. parapsilosis* (38%), seguida por *C. albicans* (33%), *C. tropicalis* (27,5%) e *C. guilliermondii* (1,5%) (Arraes, 2012). Hammoud *et al.* (2013) destacam que o número de casos de candidemia persistente em UTIN do Kuwait ocasionada por *C. parapsilosis* superou o número dos ocasionados por *C. albicans*.

Soares *et al.* (2013) isolaram espécies envolvidas em candidemia neonatal no Brasil, e verificaram como agentes etiológicos *C. albicans* (27,8%), *C. parapsilosis* (25%), *C. famata* (22,2%) e *C. glabrata* (2,8%). Os autores afirmam que *C. albicans* é 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. A candidemia por esta levedura está principalmente associada à colonização prévia, transmitida verticalmente no momento do parto.

Na epidemiologia alterações das infecções por *Candida* têm sido observadas concomitantemente em países da América Latina. No Chile, a prevalência de *C. albicans* mudou, e um aumento progressivo de infecções por espécies de *Candida* não-*albicans* foi observado; sendo *C. parapsilosis* a espécie mais frequente, seguida por *C. tropicalis* (Ajenjo *et al.*, 2011).

Apesar de algumas casuísticas apresentarem predominância de *C. parapsilosis* em casos de candidemia neonatal, Castro *et al.* (2006) afirmam que *C. albicans* ainda é a espécie mais frequentemente isolada de infecções fúngicas superficiais e invasivas em diferentes sítios anatômicos e em estudos epidemiológicos de todas as partes do mundo.

Além disto, possui elevada importância médica e econômica, representando um sério desafio à saúde pública devido às altas taxas de mortalidade e aumento dos custos com cuidados e duração da hospitalização (Lai *et al.*, 2012).

Em países da América Latina, *C. parapsilosis* tem sido reconhecida como a segunda principal causa de infecção fúngica invasiva (Godoy *et al.*, 2003). Caracteristicamente, prolifera-se em soluções contendo glicose, tem grande capacidade de produzir biofilme e frequentemente coloniza a pele. Vários estudos estabelecem claramente uma associação entre a utilização de cateter venoso em posição central e maior ocorrência de fungemia por esse patógeno (Colombo e Guimarães, 2003).

*C. parapsilosis* é encontrado frequentemente na pele, sendo de transmissão predominantemente exógena. A ocorrência é alta em crianças e recém-nascidos prematuros internados em UTIs e os fatores de risco associados à transmissão são 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).

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 capacidade de se aderir a materiais de próteses e de proliferar rapidamente na presença de altas concentrações de glicose. Além disso, isolados de *C. parapsilosis* formam biofilme com facilidade o que pode contribuir com a capacidade de aderir a cateteres e causar infecções sistêmicas em recém-nascidos prematuros que fazem uso de nutrição parenteral ou outros dispositivos invasivos (Pfaller *et al.*, 2008).

Trofa e colaboradores (2008) documentaram que *C. parapsilosis* tem sido considerada um patógeno emergente, além de ser um importante agente etiológico, 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 a alta afinidade pela nutrição parenteral. Cuidados com materiais e equipamentos hospitalares, bem como a higienização correta das mãos são medidas que podem prevenir a infecção por esse patógeno (Soares *et al.*, 2013).

Atualmente, três novas espécies foram propostas para substituir a denominação de *C. parapsilosis* grupo I, II e III, formando o complexo “psilosis”, com as três espécies *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (Tavanti *et al.*, 2005). A

diferenciação foi realizada com base em diversos critérios, incluindo análise de DNA, eletroforese de isoenzimas, eletroforese de cariótipos, morfotipos, sequências de DNA mitocondrial e habilidade de produção de biofilmes (Asadzadeh *et al.*, 2009; Tavanti *et al.*, 2010).

No Brasil e no mundo alta prevalência em casos de candidemia também ocorre por *C. tropicalis*, cujo mecanismo de transmissão é essencialmente endógeno. 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. Esta levedura é raramente encontrada em recém-nascidos, ao contrário dos adultos e crianças com doenças hematológicas malignas, nas quais causa infecções com alta taxa de mortalidade (Benjamin *et al.*, 2010). Roilides (2011) enfatiza que *C. tropicalis* é um patógeno incomum entre neonatos e que a colonização e posterior infecção, pode ocorrer por via cruzada ou associada a intervenções terapêuticas, como uso de cateter venoso e nutrição parenteral. Além disso, sugerem que a epidemiologia em recém-nascidos não está clara, mas, o potencial para transmissão nosocomial deve ser considerado.

A terceira causa de candidemia na maioria dos países da Europa, Ásia e Américas corresponde à *C. glabrata* (Pfaller e Diekema, 2007). Caracterizada por 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 comuns em adultos que nos indivíduos mais jovens, e raramente são encontradas em RNs (Malani *et al.*, 2010).

Infecções hematogênicas e disseminadas também têm sido ocasionadas por *Pichia guilliermondii*, esta espécie considerada emergente tem demonstrado ser intrinsecamente

menos susceptível a anfotericina B do que outras espécies do mesmo gênero (Pfaller e Diekema, 2004). Em um estudo envolvendo 11 instituições brasileiras, *P. guilliermondii* representou 2,4% dos 712 casos de candidemia diagnosticados (Colombo *et al.*, 2006). Investigações de surtos envolvendo *P. guilliermondii*, devem ser avaliadas cuidadosamente, inclusive através de estudos moleculares em virtude desta espécie apresentar características morfológicas e bioquímicas semelhantes a *C. famata* (Medeiros *et al.*, 2007).

*C. krusei* é outra espécie considerada como patógeno hospitalar ocasional, particularmente, em pacientes portadores de doenças hematológicas malignas e/ou submetidos a transplante de medula óssea, além de pacientes idosos (Bonatti *et al.*, 2009; Leroy *et al.*, 2009). A ocorrência em neonatos é rara, no entanto relevante devido a sua resistência intrínseca ao fluconazol. O fenótipo de resistência exibido por este fungo é um problema para o tratamento de pacientes em geral (Porte *et al.*, 2012). Amaral-Lopes e Moura (2012) relataram a ocorrência de três casos de sepse neonatal por esta levedura em hospital brasileiro.

Em infecções graves da corrente sanguínea ainda há o surgimento de outras espécies de leveduras emergentes, a exemplo de *C. pelliculosa* (teleomorfo *Pichia anomala*), frequentemente encontrada 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 e sistema gastrointestinal. Essa espécie apresenta baixa virulência e não é um patógeno comum nos seres humanos. No entanto, pode levar a cursos clínicos importantes. 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 *C. pelliculosa* em unidades hospitalares, porém ainda não há evidências diretas que demonstrem que a infecção esteja relacionada com colonização prévia (Kalkanci *et al.*, 2010). Silva *et al.* (2013) relatam a ocorrência de um surto de fungemia por *C. pelliculosa* em UTIN do Nordeste brasileiro, destacando uma possível semelhante origem clonal entre os isolados provenientes de cinco pacientes diferentes.

Em 1984, Lavarde e colaboradores relataram *C. haemulonii* como patógeno nosocomial e descreveram o primeiro caso de isolamento desta levedura em hemocultura e cateter venoso central. Desde então, alguns casos tem sido reportados no mundo, dentre eles um surto de candidemia em neonatos pré-termos no Kuwait (Kim *et*

*al.*, 2009). Contudo, até então não foi relatado nenhum caso de infecção hematogênica por este patógeno em UTIN brasileira. A identificação de *C. haemulonii* é complicada devido à semelhança fenotípica com *C. famata* e *C. guilliermondii*. Seus isolados demonstram um aumento na resistência para fluconazol, itraconazol e anfotericina B (Kim *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011).

## 2.2 COMPLEXO *CANDIDA PARAPSILOSIS*

Em 1928, em Porto Rico, foi isolada *C. parapsilosis* pela primeira vez a partir das fezes de um paciente com diarreia (Ashford, 1928). A espécie foi primeiramente denominada *Monilia parapsilosis* para distinguir do isolado mais comum, *Monilia psilosis*, hoje conhecido como *C. albicans*. Em 1932, *M. parapsilosis* passou a ser denominada *C. parapsilosis* (Silva, 2012).

Quando comparada com outras espécies de *Candida*, esta levedura possui uma distribuição mais ubíqua na natureza. Não é um patógeno humano obrigatório, tendo sido isolada de outras fontes, como animais domésticos, insetos, solo e ambientes marinhos. No entanto, este fungo é um comensal comum ao homem, sendo considerado um dos mais frequentes isolados do espaço sub-ungueal das mãos, especialmente em pesquisas com profissionais da área de saúde, o que sugere que estas sejam potenciais reservatórios e vias de transmissão (Kojic; Darouiche, 2004).

Esta espécie tem sido relatada como importante causa de infecções hematogênicas, particularmente em neonatos e pacientes imunocomprometidos, sendo comumente associada com o uso de dispositivos intravasculares, contaminação em água de hemodiálise e nutrição parenteral (Almirante *et al.*, 2006; Pfaller; Diekema, 2007; Trofa *et al.*, 2008; Pires *et al.*, 2013).

Baseado em resultados de métodos genotípicos, incluindo Ampliação Randômica de DNA Polimórfico (RAPD) (Lehmann *et al.*, 1992), cariotipagem (Lott *et al.*, 1993), eletroforese de enzimas ribossomais e sequências de espaçadores ribossomais interno transcritos (ITS) (Roy e Meyer, 1998), sequência do gene que codifica a DNA topoisomerase II (Kato *et al.*, 2001), análises de DNA por Southern blotting (Enger *et al.*, 2001) e diferenças em sequência de DNA mitocondrial (Nosek *et al.*, 2002), *C. parapsilosis* passou a ser considerada um complexo constituída por três grupos distintos (I, II e III).

Em 2005 Tavanti e colaboradores (2005) com base em diferenças observadas por RAPD, sequenciamento de DNA de genes diferentes e morfotipagem, sugeriu a reclassificação dos grupos do complexo *C. parapsilosis* em três espécies diferentes denominadas *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Apesar das espécies apresentarem características fenotípicas e bioquímicas idênticas, a sua reclassificação ocorreu após o sequenciamento de grandes frações dos genomas, a qual demonstrou a existência de diferenças significativas que influenciam em fatores como susceptibilidade antifúngica e virulência (Tavanti *et al.*, 2007).

Para facilitar a distinção entre as três espécies Tavanti *et al.* (2007) propuseram a análise do polimorfismo do gene que codifica a enzima álcool desidrogenase secundário (SADH), a qual é comum às três espécies.

Apesar da descoberta de novas técnicas, promover uma identificação confiável e rápida tem sido um grande desafio para os laboratórios de diagnóstico, especialmente para agentes etiológicos morfologicamente e fisiologicamente idênticos como as leveduras do complexo *C. parapsilosis*. No entanto, a taxonomia correta é necessária principalmente para avaliação de fatores epidemiológicos. Diante disto, novas metodologias para diferenciação têm sido estudadas, incluindo a espectrometria de massa por tempo de voo (MALDI-TOF MS) que tem trazido resultados favoráveis para separação das espécies do complexo que condizem com os obtidos por genotipagem (De Carolis *et al.*, 2014).

Pesquisas demonstram que dentre as espécies do complexo, *C. parapsilosis stricto sensu* é a predominante em isolados clínicos, o que pode ser explicado por sua elevada capacidade de formação de biofilmes e *C. orthopsilosis*, bem como *C. metapsilosis* correspondem a aproximadamente 10% do número total de espécimes oriundo de infecções em humanos (Lokhart *et al.*, 2008). Apesar disso, em algumas regiões *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* chegam a ser, respectivamente, a quinta e sexta espécie mais frequentemente isoladas de hemoculturas (Gomez-Lopez *et al.*, 2008).

Posteriormente outros estudos epidemiológicos confirmaram uma pequena proporção de *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* em hemoculturas, com uma significativa variação geográfica (Asadzadeh *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009b; Gonçalves *et al.*, 2010).

Tay, Na e Chong (2009) realizaram, em hospital da Malásia, a diferenciação de *C. parapsilosis* isolada de pacientes com fungemia através da análise molecular das regiões

ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA, detectando que alguns isolados pertenciam a duas novas espécies *C. orthopsilosis* (23,8%) e *C. metapsilosis* (4,8%).

Um estudo chinês tentou relacionar a distribuição de espécies do complexo ao longo do país, dentre 57 isolados coletadas de quatro cidades, Nanjing (22), Nanchang (20), Xangai (12) e Jinan (3), *C. parapsilosis stricto sensu* representou 71,9% de todos os isolados, enquanto que *C. metapsilosis* representou os 28,1 % restante e *C. orthopsilosis* não foi identificada. A significativa alta prevalência de *C. metapsilosis* foi observada em cepas de Nanchang, onde 60% dos isolados pertencem a esta espécie (Ge *et al.*, 2012).

Cantón *et al.* (2011), em um período de 13 anos, obtiveram 346 isolados de leveduras do complexo *C. parapsilosis* provenientes de infecções hematogênicas de pacientes distribuídos em 44 hospitais espanhóis. Os agentes foram identificados por meio de métodos moleculares: *C. parapsilosis stricto sensu* (90,7 %), *C. orthopsilosis* (8,2%) e *C. metapsilosis* (1,1 %). Destacando que nenhum caso de candidemia por *C. orthopsilosis* ou *C. metapsilosis* ocorreu em neonatos. Resistência foi verificada por algumas cepas de *C. parapsilosis stricto sensu* à caspofungina (0,3 %), anidulafungina (1,9 %) e micafungina (2,5 %).

Silva (2012) desenvolveu um estudo com pacientes admitidos em um hospital universitário Português, dentre os isolados clínicos identificados como *C. parapsilosis* por métodos convencionais foi demonstrado por métodos moleculares que 91,4% eram *C. parapsilosis stricto sensu*, 2,3% *C. orthopsilosis*, 2,9% *C. metapsilosis* e 3,4% outras espécies de *Candida*. A avaliação do perfil de suscetibilidade demonstrou que 5,6% isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* eram resistentes ou dose-dependente ao fluconazol, 1,3% resistentes à anfotericina B e todos os isolados de *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* foram sensíveis aos azólicos e anfotericina B.

Em relação à susceptibilidade às equinocandinas Spreghini *et al.* (2012) avaliaram três cepas de *C. parapsilosis stricto sensu*, quatro de *C. orthopsilosis* e três de *C. metapsilosis*, todas provenientes de amostras clínicas, e verificaram que todos os isolados foram sensíveis aos antifúngicos testados, porém com CIMs mais elevados para anidulafungina.

Quanto ao perfil de virulência Bertini e colaboradores (2013) avaliaram a adesão às células epiteliais por isolados do complexo “psilosis”, verificando que *C. metapsilosis* é a que possui mais fraca capacidade de aderência. Outros estudos também trazem esta espécie como a menos virulenta, inclusive com pouca capacidade de formação de biofilme (Tosun, *et al.*, 2013).



Ruiz *et al* (2013), em um estudo desenvolvido em hospital infantil brasileiro encontrou a seguinte distribuição de espécies do complexo *C. parapsilosis* isoladas a partir de hemoculturas: *C. parapsilosis stricto sensu* (83,7 %), *C. orthopsilosis* (10,2%) e *C. metapsilosis* (6,1 %). Todas as cepas apresentaram capacidade de formação de biofilme, no entanto *C. parapsilosis stricto sensu* foi a que apresentou maior caráter de virulência, seguida por *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Todos os isolados demonstraram susceptibilidade semelhante para o fluconazol, caspofungina, voriconazol, cetoconazol e 5-fluocitosina. Entretanto, *C. parapsilosis stricto sensu* foi menos susceptível a anfotericina B, caspofungina e fluconazol.

Um estudo desenvolvido por Németh *et al.* (2013) caracterizou as propriedades de virulência do complexo *C. parapsilosis* através dos efeitos destes sobre macrófagos. Isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* mostraram uma resistência significativamente maior aos macrófagos humanos primários, induzido um maior dano celular, contudo as linhagens de *C. metapsilosis* foram as que apresentaram menor toxicidade. Além disso, foi avaliado o impacto das três espécies sobre a sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella*. A taxa de mortalidade das larvas infectadas com *C. metapsilosis* foi notavelmente menor do que aqueles infectados com *C. parapsilosis stricto sensu* ou *C. orthopsilosis*. Os resultados em conjunto corroboram com estudos anteriores que afirmam que *C. metapsilosis* é de fato o membro menos virulento do complexo *psilosis*.

Apesar do avanço das pesquisas no que tange ao complexo *C. parapsilosis*, ainda há uma carência de estudos mais amplos, principalmente que envolvam a epidemiologia em crianças e neonatos, para um eficiente monitoramento do ambiente hospitalar. Além disso, a discriminação correta entre espécies pode ajudar na instituição de um tratamento mais adequado, uma vez que estas podem apresentar comportamentos diferentes frente aos antifúngicos e a depender dos fatores relacionados a virulência, desta forma, a introdução de novas técnicas de identificação como a espectrometria de massa se torna a cada dia mais relevante (Ruiz *et al.*, 2013).

### 2.3 IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO *CANDIDA* ATRAVÉS DA ESPECTOMETRIA DE MASSA POR TEMPO DE VOO (MALDI-TOF MS)

A identificação do gênero *Candida* através da taxonomia clássica, apesar de possuir boa sensibilidade, permanece como um método trabalhoso e demorado (Yaman; Akiar; Can, 2012). Entretanto, outras abordagens de diagnóstico capazes de identificar um

grande número de espécies de *Candida* estão disponíveis tais como novos métodos moleculares os quais são onerosos, requerem uma considerável experiência do manipulador e não são adequados para diagnóstico de rotina; e a espectrometria de massa por ionização de dessorção a laser assistida por tempo-de-voo (MALDI-TOF MS), que emergiu como uma ferramenta poderosa para melhorar a qualidade de identificação microbiológica (Putignani *et al.*, 2011).

Dentro deste contexto, o MALDI-TOF MS tem sido introduzido em procedimentos laboratoriais de rotina e é utilizado como uma nova técnica para a identificação rápida de bactérias, bem como leveduras (Veen *et al.*, 2010; Putignani *et al.*, 2011). Esta nova abordagem apresenta o potencial de melhorar o diagnóstico de leveduras, economizando tempo, reduzindo os custos de internação do paciente e minimizando a seleção de fungos resistentes aos medicamentos com a supressão do tratamento empírico prejudicial (Pulcrano *et al.*, 2013).

Esta metodologia promove a identificação das espécies por análise de espectro de massa do extrato celular bruto constituído principalmente por proteínas ribossomais. Os espectros obtidos são comparados com os padrões de referência específicos para cada espécie armazenados no banco de dados do equipamento (De Carolis *et al.*, 2014).

Em um estudo conduzido por Yaman e colaboradores (2012), o desempenho de MALDI TOF-MS foi avaliado, sendo comparado com métodos convencionais e automatizados (VITEK 2) para a identificação de um total de 281 cepas de *Candida* provenientes de culturas de sangue. Os autores detectaram que houve 94% de concordância entre a identificação pela espectrometria de massa e o VITEK 2, os resultados discrepantes foram validados pela biologia molecular e o MALDI-TOF MS permitiu a identificação correta de espécies para os 281 (100%) isolados.

Já Lacroix *et al.* (2014) avaliaram 1383 isolados clínicos de *Candida* e os resultados da identificação por MALDI-TOF MS foram comparados com aqueles obtidos utilizando métodos fenotípicos convencionais. A análise de sequências de genes de rDNA foi considerada como o padrão de referência para a identificação. O MALDI-TOF MS foi capaz identificar com precisão 98,3% dos isolados, inclusive caracterizando corretamente espécies raras ou emergentes, que não foram identificados pela taxonomia clássica.

## 2.4 FATORES DE VIRULÊNCIA ASSOCIADOS A INFECÇÕES POR ESPÉCIES DE *CANDIDA*

A capacidade dos fungos causarem infecções está associada a alguns fatores de virulência, os quais são determinados geneticamente, porém expressos pelos micro-organismos quando submetidos a certas condições, tais como teor nutricional, atmosfera de oxigênio e temperatura. Essas condições são específicas para cada micro-organismo e podem variar intra e interespecificamente (Lacaz *et al.*, 2002).

Fungos patógenos interagem com uma variedade de células hospedeiras durante a indução da doença. Para atravessar os tecidos e causar doença invasiva, estes organismos devem invadir as células não fagocitárias, como células epiteliais e endoteliais. Estratégias específicas irão favorecer a colonização das células hospedeiras e passagem pelas barreiras dos mesmos, causando doença (Filler, 2006).

Durante algumas décadas acreditava-se que as leveduras participavam passivamente do processo de patogênese no estabelecimento da infecção fúngica. Assim, a debilidade orgânica ou imune do hospedeiro era considerada único mecanismo responsável para o estabelecimento da infecção oportunista. Atualmente esse conceito vem sendo modificado, e assim há consenso que esses micro-organismos participam ativamente do processo fisiopatogênico da doença, utilizando-se de mecanismos de agressão denominados de fatores de virulência (Tamura *et al.*, 2007)

Certamente, condições do hospedeiro também estão envolvidas nos processos infecciosos, entretanto, a interação com o fungo é, sem dúvida de extrema relevância, sendo sua virulência controlada pela expressão de genes que codificam a adesão, formação de biofilmes e produção de enzimas favorecendo a adaptação e a patogenicidade (Brown *et al.*, 2007). Desta forma, a infecção pelo gênero *Candida* é facilitada por uma série de fatores de virulência, sendo a aderência aos tecidos do hospedeiro e formação de biofilmes em superfícies vivas ou inanimadas, alguns dos mais importantes (Silva *et al.*, 2011).

### 2.4.1 Adesão às células epiteliais

A capacidade dos micro-organismos de aderirem a células, tecidos ou outro tipo de superfície, é um pré-requisito para a colonização de um determinado sítio e causa de uma subseqüente infecção. Nesse contexto, de acordo com Calderoni e Fonzi (2001) a

adesão parece ter papel inicial e fundamental no estabelecimento e desencadeamento do processo infeccioso.

A adesão às células do hospedeiro é considerada uma propriedade de virulência essencial para o desenvolvimento da candidíase, especialmente em pacientes imunocomprometidos, sendo esta uma característica importante de sobrevivência e/ou patogenicidade do fungo. Desta forma, a análise *in vitro* da propriedade de aderência das espécies de *Candida* pode contribuir para a compreensão do comportamento destes organismos em um processo de infecção específico. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos de adesão ao epitélio, sobretudo em espécies de *Candida não-albicans*, ou cerca dos fatores que afetam este processo (Henriques, Azeredo e Oliveira, 2006; Menezes *et al.*, 2013).

O processo de adesão é controlado e induzido por várias cascatas de sinalização celular. A fixação inicial de células de *Candida* é mediada por fatores inespecíficos (hidrofobicidade e forças eletrostáticas) e promovido por fatores específicos como adesinas que são proteínas presentes na superfície da parede celular fúngica que reconhecem ligantes presentes nas células do hospedeiro, como proteínas, fibrinogênio e fibronectina (Li, Yan e Xu, 2003; Verstrepen e Klis, 2006).

Em casos graves, a levedura pode até mesmo penetrar, através das camadas epiteliais, em tecidos mais profundos, alcançar a corrente sanguínea e, a partir daí, causar infecções sistêmicas com significativas taxas de mortalidade. A forma como a transição de um comensal para um patógeno agressivo é acionada ainda é desconhecida, entretanto a adesão às células epiteliais é claramente um evento essencial tanto para o crescimento como comensal quanto como patógeno (Wächtler *et al.*, 2011).

Estudos mostram que a capacidade de aderência nas diversas espécies de *Candida* é diferente (Tamura *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011). Este fato explica por que alguns isolados colonizam mais frequentemente superfícies mucosas do que outros sítios anatômicos (Silva *et al.*, 2011). Adicionalmente podem ser observadas diferenças de adesão dentro de cepas da mesma espécie, pois a possibilidade de mudar o próprio fenótipo tem sido descrita em relação ao gênero *Candida* e pode modular alguns fatores de virulência, inclusive a aderência. Entretanto, para vários autores, os mecanismos que possibilitam esta mudança fenotípica ainda necessitam ser esclarecidos, é provável que estejam associados à riqueza de nutrientes e expressão de genes de adesinas ou de outras proteínas (Costa, 2009; Jacobsen *et al.*, 2012).

Esforços consideráveis foram dedicados aos estudos sobre a capacidade de aderência do gênero *Candida*, sobretudo em relação à *C. albicans*. Sabe-se que a família do gene *ALS* codifica grandes glicoproteínas da superfície celular e que os genes *SAP* são outro exemplo de família de genes que codifica a aspartil protease secretada, que está associada com os mecanismos de patogenicidade. Além disso, há Hwpl, uma adesina presente na parede celular de tubos germinativos e hifas, se liga às células epiteliais por intermédio de um mecanismo de adesão não convencional mediado por transglutaminases (Monod e Borg-Von, 2002; Sundstrom, Cutler e Staab, 2002).

Tamura *et al.* (2007), relatam *C. glabrata* como a espécie com maior capacidade de adesão às células epiteliais, por outro lado, Costa (2009) mostra isolados de *C. tropicalis* significativamente mais aderentes do que os de *C. albicans*. Moreno *et al.* (2009) também observaram que *C. tropicalis* é a espécie que apresenta maior capacidade de aderência.

Os estudos de Tamura *et al.* (2007) e Negri *et al.* (2010) destacam *C. glabrata* como a espécie de *Candida* não-*albicans* mais aderente, o que pode ser notado pela elevada habilidade desta levedura se aderir às células da mucosa oral, alta síntese de fosfolipases e atividade desencadeante de citocinas. Estes autores propõem uma nova metodologia com baixo custo e de fácil execução para quantificação da capacidade de aderência, através da coloração com cristal violeta das células fúngicas aderidas às células epiteliais. Kuhn e Vyas (2012) demonstraram que a adesina Epa1p de *C. glabrata*, além de mediar a ligação às células epiteliais, são capazes de interagir com células do sistema imune inato de mamíferos, como macrófagos, induzindo a fagocitose.

Em 2011, Lima-Neto e colaboradores verificaram que isolados de *C. albicans* possuem maior capacidade de adesão às células da cavidade oral do que cepas de *C. parapsilosis*. Estes autores ainda destacam que a presença de componentes fucosilados na superfície da parede celular das leveduras estudadas pode ser indicativa de alta capacidade de aderência.

Em 2013, Menezes e colaboradores avaliaram a capacidade de adesão de 118 isolados clínicos de espécies diferentes de *Candida*, incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Em um total de 93 (79%) isolados foi identificada a propriedade de aderência, sendo as cepas de *C. tropicalis* as que apresentaram maiores níveis de adesão.

Estudos experimentais de aderência de *Candida* spp relatam a utilização de uma ampla variedade de tipos celulares, principalmente células da mucosa oral, vaginal, e uroepiteliais. Além de células de voluntários humanos ou de animais, que produzem resultados muito variáveis, no entanto, estudos com o uso de linhagens celulares estabelecidas, como a cultura de células HeLa, ainda têm sido pouco empregados (Pires, *et al.*, 2001).

#### 2.4.1.1 Adesão de *Candida* às células HeLa

A primeira linhagem celular aneuplóide e de característica epitelial, derivada de tecido humano, a ser mantida continuamente em cultura celular em série foram as células HeLa, isoladas em 1951 de carcinoma de cérvix uterino. Esta linhagem vem sendo utilizada em diversas linhas de pesquisa, com poucos estudos incluindo aderência de células fúngicas (Weinberg, 2008).

A utilização desses tipos de células apresenta algumas vantagens em relação ao uso de células não estabelecidas, como por exemplo, as células da cavidade oral que são inevitavelmente colonizadas com micro-organismos comensais além de ocorrer alterações relacionadas a idade e viabilidade (Pires *et al.*, 2001).

Silva, Silveira e Pires (2007) observaram a adesão às células HeLa por isolados de *C. dubliniensis*. Apenas uma cepa apresentou forte aderência, as demais apresentaram fraca capacidade de adesão.

Um estudo comparativo conduzido por Negri *et al.* (2011), avaliou a adesão e danos causados por isolados de *C. tropicalis* a três linhagens celulares diferentes (células HeLa, TCC SUP e Caco-2), sendo observado que as cepas se aderiram menos e causaram poucos danos às células HeLa, quando comparado à invasão das outras linhagens testadas.

Após a levedura aderir à superfície, novos micro-organismos costumam interagir, promovendo a formação de uma comunidade plural de seres microscópicos, em que há dependência metabólica de grau variável entre seus constituintes, caracterizando, assim, a estrutura conhecida como biofilme (Giolo e Svindzinski, 2010).

## 2.4.2 Formação de biofilme por espécies de *Candida*

Nas últimas décadas, bacteriologistas e mais recentemente, micologistas têm observado que os micro-organismos praticamente não existem na sua forma livre, planctônica nos tecidos do hospedeiro, mas se agrupam formando uma comunidade multicelular, denominada biofilme, tanto sob os tecidos quanto em próteses, cateteres e outras superfícies. Os biofilmes representam o mais prevalente tipo de crescimento microbiano na natureza e são importantes para o desenvolvimento de infecções fúngicas, estando associados com alto nível de resistência aos antifúngicos e às defesas do hospedeiro. Infecções causadas por *Candida* em grande parte estão relacionadas com a formação de biofilme na superfície de dispositivos médico-terapêuticos (Ramage *et al.*, 2001; Kuhn *et al.*, 2002; Douglas, 2004; Soll, 2008).

Após a aproximação da levedura com o substrato, inúmeros acontecimentos físico-químicos tornam possível a adesão inicial do micro-organismo a esta superfície. Ao ocorrer a completa adesão, o biofilme sofre um processo de maturação. Em um biofilme maduro coexistem muitas microcolônias, constituídas por distintas espécies de leveduras, que são envolvidas por uma matriz extracelular na qual ocorre a passagem de água e nutrientes. Os biofilmes maduros, com um crescimento de 24 a 48 horas, consistem em uma rede densa de células sob a forma de leveduras, de hifas e pseudo-hifas, a depender da espécie fúngica, além da possível presença de bactérias (Douglas, 2004).

Entre os benefícios desta comunidade destacam-se a maior proteção contra as defesas imunes do hospedeiro e a ação de antimicrobianos, o que acaba por favorecer o estabelecimento do processo patogênico. Além disto, os biofilmes podem se formar em uma grande variedade de superfícies, incluindo tecidos vivos, dispositivos médicos diversos, como implantes, tubo endotraqueal, marca-passos cardíacos e vários tipos de cateteres. Ainda podem ser encontrados em sistemas de tubulação de água potável, ambientes industriais e sistemas aquáticos naturais (Douglas, 2004; Ramage *et al.*, 2006; Santana *et al.*, 2013).

A matriz é uma das características mais distintivas de biofilmes microbianos. Possui aspecto tridimensional e hidratado. Em geral a matriz do biofilme compreende hidratos de carbono, proteínas, fósforo e hexosaminas, no entanto, fatores ambientais como composição e pH do meio, disponibilidade de oxigênio, bem como a linhagem de fungos podem interferir na formação e composição da matriz, a exemplo dos biofilmes

de *C. parapsilosis* contêm grandes quantidades de hidratos de carbono e apresentam baixo teor de proteínas, quando comparado com agregados de *C. glabrata* e *C. tropicalis* (Silva *et al.*, 2009a; Silva *et al.*, 2011).

A formação destes agregados de micro-organismo sobre os dispositivos médicos representa um grave problema na medicina. Nas últimas décadas, a incidência de infecções microbianas correlacionadas com a formação de biofilme chega a 65% dos casos. Todas as variantes morfológicas conhecidas como leveduras, pseudo-hifas e hifas verdadeiras podem crescer em biofilme e geralmente expressam propriedades diferentes das suas respectivas células isoladas. A produção de proteases é maior durante a formação de biofilme. Além disso, as células de levedura expressam diversos genes que influenciam na patogenicidade e os produtos desses genes participam nos mecanismos de adesão, síntese de carboidratos, resistência às drogas como as bombas de efluxo, por exemplo e no *quorum sensing*, caracterizado como um mecanismo de comunicação intra e interespecies microbianas que propicia aos micro-organismos expressarem alterações fenotípicas marcantes quando estes se encontram em alta densidade populacional (Kuleta, Kozik, Kozik, 2009).

Os biofilmes polimicrobianos são difíceis de diagnosticar e tratar, e podem atuar como um reservatório infeccioso, para uma variedade de micro-organismos, como bactérias e fungos. Estes aglomerados podem ser encontrados em infecções sistêmicas, onde é possível encontrar *C. albicans* crescendo com *Staphylococcus epidermidis*, espécies de *Enterococcus* e *S. aureus* (Harriott e Noverr, 2011). No pulmão alguns autores relataram a interação antagônica de *C. albicans* e *Pseudomonas aeruginosa* (Morales *et al.*, 2010). Até agora, não foi demonstrada a formação de biofilme no trato gastrointestinal (Harriott e Noverr, 2011).

Ademais, um dos problemas associados a formação dos biofilme, é o aumento da resistência antifúngica. Os mecanismos responsáveis por esta menor susceptibilidade estão relacionados com limitações difusionais da passagem do agente antimicrobiano pela matriz extracelular, com alterações fenotípicas das células no biofilme e ainda com o desenvolvimento de mecanismos de resistência por alteração do genótipo das células. Outro mecanismo proposto que as células associadas ao biofilme crescem significativamente mais lentamente do que as células planctônicas e, como consequência, captam os agentes antimicrobianos na mesma condição (Santana *et al.*, 2013).



As diferentes espécies de *Candida* diferem em sua capacidade de formar biofilmes, podendo variar na morfologia global, composição e resistência antifúngica. Alguns trabalhos também afirmam que diferentes cepas de uma mesma espécie podem apresentar diferenças na sua capacidade de formar estes agregados celulares, indicando que estirpes formadoras de biofilmes "fortes" e "fracos" podem existir dentro uma mesma espécie (Jin *et al.*, 2003; Thein *et al.*, 2007).

Jin *et al.* (2003) verificaram que cepas selvagens de *Candida* demonstraram possuir maior capacidade de formar biofilmes quando comparadas com cepas laboratoriais de referência. Alguns trabalhos afirmam que *C. albicans* e *C. krusei* formam biofilmes mais confluentes do que outras espécies de *Candida* (Samaranayake *et al.*, 2005; Parahitiyawa *et al.*, 2006). Adicionalmente Ramage, Lopez-Ribot (2005) afirmam que a maioria das doenças causadas por *C. albicans* são associadas ao crescimento do biofilme. No entanto, em estudo conduzido por Gasparetto e colaboradores (2005), de um total de 92 leveduras avaliadas, 63% foram capazes de produzir biofilme. Proporcionalmente as espécies *Candida* não-*albicans* foram as mais capazes de aderir ao substrato. Outros estudos também têm apontado que a capacidade de formação de biofilme é maior para as espécies de *Candida* não-*Candida albicans* do que para espécies *C. albicans* (Kumar e Menon, 2006).

Tumbarello *et al.* (2007) avaliaram a capacidade de formação de biofilme por isolados clínicos provenientes de infecções hematogênicas e verificaram que os isolados de *C. tropicalis* foram os que apresentaram maior habilidade de agregação, seguido por *C. glabrata*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Ainda, Silva e colaboradores (2009a) demonstraram que *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* também são capazes de produzir biofilmes. Assim, Galán-Ladero *et al.* (2013) destacam isolados de *C. tropicalis* envolvidos em infecções hospitalares como os que apresentam mais intensa formação de biofilmes. Nesse contexto, a incidência de infecções fúngicas oportunistas tem aumentado devido a interação entre sistema imunológico do hospedeiro e fatores de virulência do micro-organismo, e em paralelo com o surgimento de cepas resistentes as terapêuticas antifúngicas (Balkis *et al.*, 2002).

## 2.5 SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

O aumento da incidência de patógenos resistentes a drogas e a toxicidade de compostos antifúngicos existentes atraem constantemente a atenção para o estudo de

novos produtos antimicrobianos. Ainda, o pequeno número de medicamentos disponíveis para o tratamento das infecções fúngicas, a maioria dos quais são fungistáticos, incentivam a procura de tratamentos alternativos (de Oliveira, Jorge e dos Santos, 2006).

Apesar de haver disponíveis no mercado agentes antifúngicos, mais ativos e menos tóxicos além do uso de profilaxia antifúngica, a candidíase continua sendo associada a altas taxas de mortalidade (Kriengkauykiat, Ito, Dadwal, 2011). Neste contexto, a resistência antifúngica permanece crescente, conduzindo a falha terapêutica e consequentemente dificuldade no combate a infecções invasivas por espécies de *Candida*. A resistência clínica frequentemente está associada a concentrações inibitórias mínimas (CIMs) elevadas, sendo as principais causas de esquema terapêutico ineficaz utilização de doses inadequadas, interações medicamentosas e neutropenia grave (Lim *et al.*, 2012).

Evidências mostram que amostras de *Candida* isoladas de pacientes de UTIN apresentam susceptibilidade diminuída aos agentes antifúngicos, devido ao aumento expressivo do uso (Roidiles *et al.*, 2004). Assim, a determinação da susceptibilidade antifúngica dos agentes etiológicos é um passo importante na condução e eficácia do tratamento. Contudo, 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 ocorrência de contaminação cruzada (Avila-Aguero *et al.*, 2005).

As drogas mais utilizadas para o tratamento de candidíases em neonatos são pertencentes a quatro diferentes classes: poliênicos, incluindo anfotericina B desoxicolato e formas lipídicas, os azoles como o fluconazol e o voriconazol, os análogos das pirimidinas e as equinocandinas. Geralmente os fármacos de escolha para o tratamento de RNs acometidos por candidemia são a anfotericina B isolada ou combinada com fluocitosina, formulação lipossomal da anfotericina B ou fluconazol (Würthwein *et al.*, 2005). Entretanto, o desenvolvimento de uma nova geração de azóis e equinocandinas tem aumentado as opções terapêuticas para o tratamento (Chapman, 2007).

Novos agentes antifúngicos estão disponíveis para tratar candidemia neonatal com base em ensaios clínicos em adultos, uma vez que ainda há poucos estudos comparativos de agentes antifúngicos em RNs e crianças (Blyth *et al.*, 2011). Ensaios

clínicos randomizados para avaliar o uso profilático de antifúngicos sistêmicos profiláticos em prematuros de muito baixo peso e extremo baixo peso ao nascer existem, mas ainda não foram bem delimitados para guiar adequadamente o tratamento de infecções fúngicas invasivas em neonatos. Existe consenso que uma única hemocultura para *Candida* constitui evidência suficiente de infecção e que a terapia antifúngica apropriada deverá ser iniciada. Da mesma forma, considera-se componente essencial da terapia a remoção dos cateteres vasculares (Rex, *et al.*, 2000; Aydemir *et al.*, 2011).

### 2.5.1 Poliênicos

O mecanismo de ação dos poliênicos é baseado na interação específica com o ergosterol, esteróide constituinte exclusivo da membrana celular fúngica, conduzindo à formação de poros através de membranas lipídicas, com alteração da permeabilidade celular que permite, portanto, o escape de íons e metabólitos, principalmente íons de potássio ocasionando a morte celular (Odds *et al.*, 2003).

O espectro de ação *in vitro* desta classe de antifúngicos abrange leveduras, fungos dimórficos e a maioria dos fungos filamentosos oportunistas, sobre os quais exerce um efeito fungistático ou fungicida (Odds *et al.*, 2003; Wingard e Leather, 2004). Dentre os antifúngicos poliênicos apenas a anfotericina B com suas diferentes formulações é usada para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas (Paramythiotou *et al.*, 2014).

A anfotericina B é produzida 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. 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 uso clínico têm assegurado que este antifúngico permaneça como fármaco de escolha no tratamento da maioria das micoses sistêmicas (Dismukes, 2000). Contudo, o uso deve ser limitado devido a problemas de tolerabilidade, salientando-se a nefrotoxicidade e as reações ligadas à infusão. Devido à semelhança das moléculas de ergosterol da parede celular fúngica e de colesterol da membrana celular dos mamíferos a anfotericina B liga-se também ao colesterol, causando alterações na molécula e provocando grande parte dos efeitos adversos. 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).

A anfotericina B desoxicolato (convencional ou Amb) teve aprovação para uso em adultos em 1958, e agora também vem sendo indicada para administração em crianças. É pouco absorvida após a administração oral, porém quando em via intravenosa é amplamente distribuída no corpo e pode ser detectada no fígado, baço e rins. Este fármaco tem uma meia-vida mais longa (15 horas) e maior potencial de acumulação em lactentes do que em adultos (Testoni, Smith, Benjamin, 2012).

A penetração no líquido céfalo-raquidiano (LCR) em crianças também é maior do que em adultos, com concentrações séricas de 40-90%. Outro fato importante é que os produtos deste antifúngico tendem a ter penetração considerável no sistema nervoso central. A nefrotoxicidade é o principal efeito colateral observado com o uso de Amb. Visando a redução desta nefrotoxicidade, atualmente existem três formulações lipídicas de disponíveis: lipossomal (L-Amb ou AmBisome), anfotericina B complexo lipídico de (ABLC ou Abelcet) e anfotericina B dispersão coloidal (ABCD ou Amphotec) . A Food and Drug Administration aprovou L-Amb para uso em crianças  $\geq 1$  mês de idade, ABLC para crianças  $\geq 16$  meses de idade, e ABCD para crianças e adultos (Testoni, Smith, Benjamin, 2012).

Linder e colaboradores (2003) compararam a efetividade e tolerabilidade de três preparados antifúngicos, anfotericina B, anfotericina lipossomal e a anfotericina B em dispersão coloidal no tratamento da infecção por *Candida*. Todos os pacientes com creatinina sérica  $\geq 1,2\text{mg}\%$  receberam as preparações lipídicas: 56 RNs completaram o estudo, sendo 4 a termo e 52 pré-termos, incluindo 36 pré-termos extremos. Entre os grupos não se observou diferença de mortalidade. A esterilização do sangue foi obtida em 67,6% com o uso da Amb, em 83% com a ABLC e em 71% com ABCD. Os autores concluíram que estas duas preparações lipídicas parecem ser efetivas, seguras e bem toleradas em RNs pré-termos com sepses por *Candida* e insuficiência renal.

Os escassos estudos de farmacocinética (PK) em RNs 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. A medicação deve ser diluída em soro glicosado a 5% (não utilizar soro fisiológico) e infundida em seis horas. O frasco e o equipo de soro devem ser protegidos da luz. O tratamento deve ser mantido até se atingir dose total Os efeitos colaterais da anfotericina

B são frequentes e potencialmente graves, sendo constituído por febre, nefrotoxicidade, hipopotassemia, necrose hepática e supressão da medula óssea (Chapman, 2007).

A 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 Amb, verificado pela concentração mínima de 90% de inibição dos isolados (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 convencional CIMs < 1µg/mL, os quais foram 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. guilliermondii* (3,5%) e *C. krusei* (1,78%). Pemán *et al.* (2011) avaliaram 200 isolados de diferentes espécies de *Candida* provenientes de infecções em crianças internadas em um hospital espanhol e verificaram que apenas um isolado, pertencente a espécie *C. tropicalis*, apresentou resistência a anfotericina B. Farooqi *et al.* (2013) ainda destacam a rara resistência a este fármaco, em sua pesquisa todos os isolados clínicos de *Candida* provenientes de infecções invasivas foram sensíveis a anfotericina B e ainda reforçam a confiabilidade de deste antifúngico como uma escolha empírica.

### **2.3.2. Azólicos**

Os antifúngicos azólicos sistêmicos foram introduzidos no mercado na década de 80 como drogas alternativas para o tratamento das micoses invasivas, principalmente em

indivíduos debilitados, cujo tratamento com anfotericina B não era possível devido a elevada toxicidade (Akins, 2005). Esses antifúngicos apresentam ação fungistática atuando na inibição do crescimento celular (Chapman, 2007).

Os azóis são caracterizados por um anel pentagonal na estrutura molecular, o qual contém três átomos de carbono e dois de nitrogênio (imidazólicos), ou dois de carbono e três de nitrogênio (triazólicos). O mecanismo de ação está associado a inibição do citocromo P450 fungico, através da desmetilação do 14-alfa-lanosterol, com conseqüente diminuição do ergosterol celular. Com a depleção do ergosterol, a integridade da membrana celular fúngica fica comprometida (Margotto, 2012).

Quatro compostos azólicos estão disponíveis para o tratamento de doenças fúngicas invasivas: itraconazol, fluconazol, voriconazol, ravoconazol e posaconazol. Para candidiases sistêmicas destaca-se o fluconazol e o voriconazol (Paramythiotou *et al.*, 2014).

O 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).

Em infantes, o fluconazol 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 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 de *Candida* não-*albicans* como *C. krusei* e *C. glabrata*, também foi relatada a ocorrência de resistência em isolados de *C. parapsilosis* (Chapman, 2007).

O uso de fluconazol parece ser seguro em RNs. Cinco ensaios clínicos controlados e randomizados, com 726 RNs prematuros, avaliaram o efeito do fluconazol e hepatotoxicidade, dois deles demonstraram aumentos estatisticamente significativos da AST e ALT, no entanto, nenhum destes foi considerado clinicamente relevante e as taxas normalizaram após a descontinuação do fluconazol (Kaufman *et al.*, 2001; Kicklighter *et al.*, 2001; Kaufman *et al.*, 2005; Manzoni *et al.*, 2007; Parikh *et al.*, 2007).

Estudo avaliando hepatotoxicidade do fluconazol na profilaxia em crianças de extremo baixo peso demonstrou um risco aumentado de hiperbilirrubinemia conjugada, entretanto, estes valores também foram normalizados após a interrupção do antifúngico (Aghai *et al.*, 2006). Aydemir *et al.*, 2011 ainda destacam alterações laboratoriais em pacientes que recebem fluconazol e ressaltam que são incomuns; um aumento transitório das enzimas hepáticas foi visto em <5% de crianças e não foram verificadas reações adversas graves.

Vários estudos randomizados relatam que o uso profilático de fluconazol diminuiu a incidência de doença invasiva (Parikh *et al.*, 2007; Weitkamp *et al.*, 2008; Aydemir *et al.*, 2011). Embora a profilaxia com este fármaco diminua a ocorrência de candidíase invasiva em populações de alto risco, não se sabe se reduz a mortalidade em geral ou quais efeitos no neurodesenvolvimento podem estar associados em longo prazo. Existe também preocupação de que este procedimento possa aumentar a incidência de cepas resistentes (Manzoni *et al.*, 2008).

As propriedades farmacocinéticas de fluconazol são bem descritas em infantes. O volume de distribuição varia com a idade e é maior durante o período neonatal diminuindo na idade adulta. A depuração de fluconazol é mais rápida em crianças do que em adultos, com uma meia-vida média de 20 horas. Fluconazol é eliminado por via renal, portanto, ajustes de dosagem são necessárias em doentes com insuficiência renal significativa. No bebê prematuro, normalmente se faz um ajuste de dose quando há presença elevada de creatinina na urina (Testoni, Smith, Benjamin, 2012).

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

Em relação ao uso do fluconazol uma preocupação é o surgimento de resistência, principalmente entre as espécies de *Candida* não-*albicans* como *C. krusei* e *C. glabrata* (Sabatelli *et al.*, 2006), sendo também relatada em menor proporção a ocorrência de resistência em isolados de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (Chapman, 2007).

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

considerável entre isolados de *C. tropicalis* e *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.

Nos últimos anos no EUA, Europa e América do Sul a resistência aos azólicos tem aumentado, em particular ao fluconazol. Até 2005 raramente resistência a este fármaco era relatada (Pfaller e Diekema, 2007), mas dados a partir da segunda metade da década mostram um aumento significativo na resistência, sobretudo, de isolados nosocomiais (Pfaller *et al.*, 2011).

Entre os 51 isolados de candidemia avaliados por França, Ribeiro e Queiros-Telles (2008), cuja suscetibilidade a antifúngicos foi avaliada, três cepas de *C. glabrata* e uma de *C. krusei* apresentaram suscetibilidade dose-dependente ao fluconazol. Em estudo conduzido por Mímica, *et al.* (2009) foram avaliados 100 isolados clínicos de *Candida* sp. provenientes de um hospital da cidade de São Paulo. Entre os azólicos, o fluconazol foi o antifúngico com maior espectro de ação; apenas as cepas de *C. krusei*, intrinsecamente resistentes à ação desse antifúngico, não apresentaram suscetibilidade.

Favalessa, Martins e Hans (2010), em estudo brasileiro, avaliaram a ação de diversos antifúngicos frente a isolados clínicos de espécies de *Candida* e contataram que de todos os fármacos testados, o fluconazol foi aquele que contribuiu com maiores valores de CIM, sugerindo resistência para a maioria dos isolados, como se segue: *C. krusei* (100%), *C. albicans* (29,6%) e *C. tropicalis* (50%).

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). Em 2013, na África do Sul, Ballot *et al.* avaliaram candidemia em 59 neonatos, sendo identificada *C. parapsilosis* em 54.2% dos casos, seguido por *C. albicans* (27.1%). Resistência ao fluconazol esteve presente em 16 dos 32 isolados de *C. parapsilosis* contra apenas um dos 16 de *C. albicans*.

Apesar de o fluconazol ser uma das drogas mais comumente utilizadas para o tratamento de infecções invasivas em neonatos por leveduras do gênero *Candida* o uso rotineiro de agentes antifúngicos empiricamente tem sido associado ao desenvolvimento de espécies de *Candida* resistentes e aumentado as infecções por espécies de *Candida* não-*albicans*. Estima-se que cerca de 10% dos isolados de *C. albicans* provenientes de amostras de sangue são resistentes ao fluconazol (Ferreira *et al.*, 2012).



O voriconazol pertence à segunda geração dos triazóis que foi desenvolvida com o objetivo de ampliar o espectro de atividade (Pfaller *et al.*, 2002). Possui elevada biodisponibilidade oral (90 %) e uma meia-vida de seis horas. A PK tem sido estudada em crianças de 2 a 11 anos, mas ainda não estão disponíveis para a população neonatal. É aprovado pelo Foods and Drugs Administration (FDA) para infantes  $\geq 12$  anos de idade. Possui facilidade de penetração no sistema nervoso central e é metabolizada pelo citocromo P4502C19 no fígado; polimorfismos genéticos na sequência de DNA que codifica esta enzima desempenha um papel na sua PK (Walsh *et al.*, 2004).

Os níveis plasmáticos de voriconazol em crianças são variáveis, sobretudo em lactentes. Em um estudo com dez infantes com uma idade média de 17 meses, as concentrações deste medicamento foram muito variáveis e não se correlacionou com a dose administrada (Doby *et al.*, 2012). Todas as faixas etárias experimentam os mesmos efeitos adversos: distúrbios visuais transitórios e fotossensibilidade, ainda elevação transitória leve dos níveis das enzimas hepáticas também foi observada (Walsh *et al.*, 2010; Shima *et al.*, 2010).

Turan *et al.* (2011) relataram a experiência do tratamento com voriconazol intravenoso de candidemia persistente em neonatos. Estes autores concluíram que considerando os efeitos perigosos de infecções por *Candida* em RNs prematuros, o voriconazol pode ser adicionado ao tratamento da sepse fúngica persistente associado ao uso de um antifúngico convencional. No entanto, mais informações clínicas são necessárias antes que esse medicamento possa ser utilizado como um fármaco de primeira linha. Este produto deve ser reservado como uma segunda (ou terceira) opção para o tratamento de infecção invasiva neonatal, principalmente no contexto de resistência aos outros fármacos de escolha (Testoni, Smith, Benjamin, 2012).

Este fármaco mostra-se eficaz sobre muitas espécies de *Candida*, incluindo *C. krusei*, *C. glabrata* e algumas estirpes resistentes ao fluconazol. Apesar da boa eficácia 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 a 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*. Favalessa, Martins e Hans (2010), considerando o voriconazol, obtiveram dados que mostraram 25,9% de resistência à *C. albicans*. No entanto, para a espécie *C. krusei*, o voriconazol demonstrou atividade *in vitro*, e não foram detectados isolados resistentes, mostrando que nos casos de espécies intrinsecamente resistentes ao fluconazol o voriconazol pode apresentar ação efetiva.

Ademais, além dos polienos e azólicos, outra opção no tratamento de candidíase invasiva são as equinocandinas (Martinez, 2006).

### **2.3.3. Equinocandinas**

As equinocandinas são lipopeptídeos semissintéticos com estrutura química de hexapeptídeos cíclicos ligados a uma cadeia lateral de ácido graxo. Compõem uma nova classe de antifúngicos que atuam em 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 dos fungos. Como os mamíferos não possuem parede celular o risco de toxicidade é menor em relação aos polienos e azólicos (Odio *et al.*, 2004; Martinez, 2006).

Os antifúngicos pertencentes a esta classe possuem grande peso molecular e pouca penetração no sistema nervoso central (SNC). No entanto, estudos realizados em uma série de experiências com modelos animais, seguido por ensaios farmacocinéticos em neonatos, demonstram que a micafungina e anidulafungin podem ser utilizados em dosagens mais elevadas para que os produtos possam alcançar com êxito as concentrações máximas para eliminação do micro-organismo dentro do SNC (Hope *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2009).

Estes fármacos começaram a ser comercializadas no Brasil em 2000, com a introdução da caspofungina. Posteriormente em 2009, a anidulafungina foi introduzida como uma alternativa para o tratamento de candidíase invasiva em pacientes adultos não-neutropênicos (Bormann e Morrison, 2009). 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).

Devido ao perfil terapêutico e os níveis de segurança favoráveis, o uso de equinocandinas em pacientes críticos tem exibido um rápido aumento e existem diretrizes para administração destes medicamentos como tratamento primário para candidíase invasiva. No entanto, este recente aumento do uso de equinocandinas tem levantado temores sobre o surgimento de resistência, mas até o presente momento este fenômeno continua raro. Estudos mostram uma menor susceptibilidade a estes fármacos por algumas espécies de *Candida*, a exemplo de *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* (Bal, 2010; Walker *et al.*, 2010). Outra preocupação em relação ao tratamento é o elevado custo (Glockner, 2011).

Adicionalmente na atividade contra espécies de *Candida* os CIMs das três equinocandinas são menores do que os da anfotericina B e fluconazol, exceto para *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*, contra os quais são semelhantes ou maiores. Em contrapartida, as infecções por estas espécies apresentam resposta *in vivo* quando tratadas com equinocandinas, mesmo não apresentando susceptibilidade *in vitro* (Cortés e Russi, 2011).

A caspofungina é um derivado semissintético da pneumocandina B, produto natural de *Glarea lozoyensis*. Tem atividade contra *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. e seu uso é aprovado pela FDA para adultos e crianças acima de três meses de idade. É um antifúngico que passa por metabolismo hepático e possui meia-vida de 9-10 horas, portanto em pacientes com insuficiência renal não é necessário ajuste de dose, no entanto, a diminuição da dosagem diária é necessária em pacientes com insuficiência hepática (Arathoon *et al.*, 2002; Stone *et al.*, 2002, Martinez, 2006).

Em crianças, o uso principal da caspofungina é para casos refratários de candidíase invasiva ou em terapia combinada (Cesaro *et al.*, 2007). Mais recentemente, alguns estudos têm mostrado o uso da medicação como o principal tratamento para a candidíase invasiva (Zaoutis *et al.*, 2009) ou para a terapia antifúngica empírica (Maertens *et al.*, 2010). Contudo, a eficácia de caspofungina contra candidíase do SNC ainda não foi demonstrada.

Os eventos adversos mais comuns são febre, dor de cabeça e erupção cutânea. Aumento das transaminases hepáticas e hipocalcemia podem ser relatados (Maertens *et al.*, 2010). Entretanto, um estudo com 18 crianças (idade gestacional 24-41 semanas), 94% dos pacientes apresentou um ou mais sintomas adversos, porém nenhum foi considerado relacionado com o uso caspofungina (Walsh *et al.*, 2005).

Pfaller *et al.* (2006) realizaram um estudo sobre susceptibilidade a caspofungina por agentes de candidemia por um período de quatro anos. Dos 8.197 isolados os resultados por espécies (expressas como percentagem CIM50/CIM90 e inibição a  $\leq 1 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) foram os seguintes: *C. albicans*, 0.03/0.06, 99,9; *C. glabrata*, 0.03/0.06, 99,9; *C. parapsilosis*, 0.5/0.5, 99,0; *C. tropicalis*, 0.03/0.06, 99,7; *C. krusei*, 0.12/0.5, 99,0, e *C. guilliermondii*, 0,5 / 1, 94,4. Dos 25 isolados com CIMs de caspofungina maiores do que  $1\mu\text{g/ml}$ , 12 isolados foram *C. parapsilosis*, seis *C. guilliermondii*, dois *C. rugosa*, e um *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. tropicalis*.

Em 2011, os mesmo autores, determinaram a atividade antifúngica da caspofungina novamente contra 5.346 isolados de *Candida* provenientes de infecções hematogênicas. A distribuição das espécies foi *C. albicans* (54%), *C. parapsilosis* (14 %), *C. glabrata* (14 %), *C. tropicalis* (12%), *C. krusei* (3%), *C. guilliermondii* (1%) e 2 % de outras espécies de *Candida*. No geral, a caspofungina apresentou boa atividade frente estas espécies, ocorrendo raros casos de resistência em isolados de *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii* (Pfaller *et al.*, 2011).

A micafungina apresenta atividade de amplo espectro contra patógenos clinicamente importantes, inclusive contra de *C. albicans* resistentes aos azólicos. Possui ação fungicida frente a *Candida* spp e fungistática contra *Aspergillus* spp. (Hatano *et al.*, 2002).

A forma intravenosa é a única via de administração e nos Estados Unidos o seu uso é aprovado tanto para adultos quanto crianças e neonatos. Tem uma meia-vida de aproximadamente 12 horas em adultos e as maiores concentrações da droga são detectadas nos pulmões, fígado, baço e rins. É metabolizada principalmente no fígado e poucas interações medicamentosas são descritas. A excreção fecal é a principal via de eliminação (Infante-Lopez e Rojo-Conejo, 2009; Yamada *et al.*, 2011).

Dentre as equinocandinas, a micafungina é a que apresenta melhor descrição para população pediátrica e neonatal. O depuramento deste fármaco em prematuros é mais rápido do que em crianças mais velhas e em adultos (Yanni *et al.*, 2011).

Lyon *et al.* (2010) em um estudo multicêntrico avaliaram a susceptibilidade a micafungina de 5.900 isolados clínicos e detectaram que este fármaco exibiu excelente atividade contra todas as espécies de *Candida*, com a taxa global de susceptibilidade de 99,8%. A espécie com CIMs mais elevados foi *C. parapsilosis* (CIM90 =  $1\mu\text{g/ml}$ ), no entanto, quando comparada a caspofungina a maioria dos isolados estudados apresentaram CIMs discretamente menores para micafungina.

A 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).

Ghannoum e colaboradores (2009) evidenciaram que a 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. Este fármaco é recomendado para o tratamento de candidemia e candidíase esofágica em adultos neutropênicos. A administração segura em crianças menores de dois anos ainda está sendo investigada. Devido a falta de estudos do uso em infantes, até o momento a sua utilização não é recomendada nesta população. Adicionalmente, a anidulafungina 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 (Cohen-Wolkowicz *et al.*, 2009; Arnold *et al.*, 2010).

Cohen-Wolkowicz e colaboradores (2011) administraram anidulafungina por via intravenosa em 15 pacientes com menos de 18 meses de idade, em uma dose de ataque de 3 mg/kg no primeiro dia e manutenção diária com a dose de 1,5 mg/kg. Entre os pacientes, havia oito RNs com uma idade gestacional média de 27 semanas. Os bebês que receberam 1,5 mg/kg/dia tiveram exposição e efeitos da anidulafungina semelhantes aos de crianças que receberam a dose baseada no peso.

A dose adequada deste fármaco em crianças para alcançar uma penetração no SNC ainda é desconhecida. Apesar da anidulafungina ser bem tolerada na população pediátrica, ocorreram efeitos adversos em alguns pacientes, sendo a variação transitória no teste de função hepática a mais comumente relatada (Cohen-Wolkowicz *et al.*, 2011).

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

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

Antecedendo as coletas, o projeto passou pela aprovação do comitê de ética em pesquisa sob o registro CAAE0246.0.099.000-10.

As coletas das 243 amostras clínicas foram realizadas nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital Agamenon Magalhães, Hospital Memorial Guararapes e Hospital das Clínicas no período de janeiro de 2012 a setembro de 2014.

O material biológico analisado foi indicado através de solicitação médica. Espécimes clínicos de sangue foram coletados por profissionais de saúde dos referidos hospitais através de punção asséptica venosa ou arterial. As amostras coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco para realização do diagnóstico micológico.

#### 3.2 MANIPULAÇÃO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

O processamento das amostras clínicas para exame direto ocorreu sem adição de corante ou clarificante. Concomitantemente, o material biológico foi semeado em duplicata na superfície do meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) e ágar “Brain Heart Infusion” (BHI) adicionados de 50 mg/L de cloranfenicol contido em placas de Petri e mantidos à temperatura de 30° C e 37° C por um período de até 15 dias. Após o surgimento das colônias, estas foram purificadas e, posteriormente, identificadas.

#### 3.3 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 foram semeados por esgotamento na superfície do meio SDA com antibiótico contido em placas de Petri. Posteriormente, as colônias foram semeadas em tubos de ensaio contendo meio SDA com extrato de levedura para posterior identificação (Barnnet *et al.*, 2000; De Hoog *et al.*, 2000).

### 3.4 IDENTIFICAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS

A identificação foi realizada com base na taxonomia clássica através 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) e fisiológicas/bioquímicas (assimilação de compostos de carbono e nitrogênio, fermentação de fontes de carbono e produção de ácido acético) (Barnett *et al.*, 2000; Hoog *et al.*, 2000), produção de urease, (Lacaz *et al.*, 2002). A confirmação foi procedida ainda pelo sistema automatizado VITEK2, espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) (Lima-Neto *et al.*, 2014) e quando necessário foi realizado sequenciamento das regiões ITS1 e ITS4 do RNAr (White *et al.*, 1990).

#### 3.4.1 Identificação clássica

##### Formação de pseudomicélio, micélio verdadeiro e clamidosporo

A verificação da formação de pseudomicélio, micélio verdadeiro e clamidosporos foi realizada a partir de crescimento em 3 mL de CornMeal agar (ágar-fubá) , posteriormente foi depositado em lâmina contida sobre um suporte de vidro em forma de U no interior de uma placa de Petri. Após solidificação do meio, a levedura foi semeada com auxílio de uma agulha em “L”, fazendo-se duas estrias paralelas, as quais foram recobertas com lamínula esterilizada. Para evitar a dessecação do meio, o procedimento foi realizado em câmara úmida, acrescentando-se 2 mL de água destilada esterilizada à placa durante o período de incubação do teste. A visualização das estruturas através de microscopia foi feita após 24h, 48h e 72h (Lodder, 1970).

##### Produção de ascos e ascosporos

As amostras foram cultivadas em ágar Gorodkova a 28°C por 15 dias. Ao fim deste período foi avaliada quanto a produção de ascos e ascosporos, bem como suas características taxonômicas (Barnett; Paine; Yarrow, 2000).

##### Fermentação de fontes de carbono (Zimograma)

Para a realização do teste, tubos longos de 150 por 12mm, contendo tubos de Durham invertidos de 50mm x 6mm foram preenchidos com água peptonada acrescida das fontes de carbono na concentração de 4%. Em seguida, foi adicionado 100µL da suspensão de leveduras ajustada de acordo com a escala 0,5% de MacFarland. Os tubos

foram incubados a 28°C por 10 dias e observados diariamente para verificação da produção de dióxido de carbono (Barnett; Paine; Yarrow, 2000).

#### Assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (Auxonograma)

Para execução do teste, foram realizadas suspensões de cada espécie de levedura em água com extrato de levedura de acordo com a escala 0,5 de MacFarland. Em seguida, essas foram semeadas *pour plate* em meio isento de carboidratos. Após solidificação, foram adicionadas as fontes de carbono e nitrogênio e as placas mantidas a 28°C por três dias, sendo realizada leitura diária para verificar em quais fontes de carbono e nitrogênio houve crescimento da levedura, caracterizando a sua capacidade assimilativa (Barnett, Paine e Yarrow, 2000).

#### Produção de ácido

As leveduras foram semeadas em meio sólido contendo 5% de glicose e 0,5% de carbonato de cálcio. Posteriormente, as placas foram incubadas a temperatura de 25±3°C e avaliadas por até cinco dias. A produção de ácido foi considerada positiva seu halo claro ao redor das colônias (Barnett; Paine; Yarrow, 2000).

#### Hidrolise da Uréia

As amostras com até 48h de crescimento foram semeadas em Ágar Christensen e incubadas a 37°C. Os tubos foram examinados por três a cinco dias a fim de verificar a mudança de cor (amarelo para rosa), indicando a produção de urease (Barnett; Paine; Yarrow, 2000).

### **3.4.2 Identificação proteômica por MALDI-TOF MS**

Os isolados também foram submetidos à análise direta por espectrometria de massa (MALDI-TOF Autoflex III Bruker Laser nd:yag smartbeam, Bruker Daltonics Inc., USA/Germany).

O cultivo e manutenção dos isolados de *Candida* foi feito em meio Dextrose Peptona Extrato de Levedura (YEPD). Células de *Escherichia coli*, utilizadas como padrão, foram cultivadas e mantidas em meio ágar Luria-Bertani (LB). *Trichophyton rubrum* foi cultivado em YEPD e incorporado nas análises como um controle externo. Incubações foram padronizadas em 20h e as linhagens se desenvolveram aerobicamente a 37°C.

Fragmentos de células (cerca de 50µg) foram diretamente transferidos do meio de cultura para 48 anéis da placa, sendo adicionado sobre todas as amostras de leveduras



0,5 µL de ácido fórmico a 25% e misturado levemente com o material biológico. Após a total evaporação do meio líquido, adicionou-se 0,5 µL da solução matrix (75 mg/mL de 2,5-ácido dihidroxibenzóico [DHB] em etanol/água/acetonitrila [1:1:1] com 0,03% de ácido trifluoroacético [TFA]). Para *E. coli* a adição da solução matrix foi realizada sem tratamento prévio com ácido fórmico.

Todas as amostras foram cristalizadas em temperatura ambiente ( $20 \pm 2$  °C). Em seguida, cada amostra foi transferida em duplicata para testar a reprodutibilidade. (Putignani *et al.*, 2010; Veen *et al.*, 2010).

Os espectros para determinação do perfil protéico dos isolados foram obtidos através de um laser de nitrogênio (337 nm), cuja a intensidade foi ajustada ligeiramente acima do limiar para a produção de íons. *E. coli* DH5α com conhecido valores de massa das proteínas ribossomais foi usada para calibração.

A variação de massa entre 2.000 a 20.000 Da foi registrado usando modo linear com pulso de 104 ns em uma voltagem de +20 kV. Espectros finais foram gerados através da soma de 20 tiros de laser acumulados por perfil e 50 perfis produzidos por amostra, levando a um total de 10.800 disparos de laser somados por espectro. A lista de picos obtidos foi exportada ao software SARAMIS™ (Spectral Archiving and Microbial Identification System, Anagnostec, Postdam-Golm, Germany, [www.anagnostec.eu](http://www.anagnostec.eu)) onde as identificações finais foram alcançadas. Identificação através do software SARAMIS™ foi baseada na presença ou ausência de cada pico no espectro.

### **3.4.3 Identificação molecular**

#### Obtenção de biomassa e extração do DNA

Para análise molecular foi obtida massa celular das culturas crescidas em 2mL de meio extrato de levedura, peptona e dextrose a 30°C sob agitação de 220 rpm, por 16 h, até a densidade de  $2 \times 10^8$  células/mL. A extração do DNA e a verificação da qualidade e quantidade do DNA extraído foram realizadas de acordo com Xu *et al.* (2000).

#### Sequenciamento dos produtos da PCR

Os produtos purificados após amplificação foram sequenciados bidirecionalmente utilizando-se o kit *Taq DyeDeoxy Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Gouda, Holanda), de acordo com as instruções do fabricante. Os iniciadores utilizados para o sequenciamento foram os mesmos empregados na

amplificação, com dois iniciadores a mais para a região ITS (ITS1 e ITS4). A reação de sequenciamento foi realizada em uma placa de 96 poços, cada um contendo um produto de PCR purificado diluído em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e um *mix* preparado especificamente para cada iniciador. O volume final em cada poço da placa foi de 15  $\mu\text{L}$  na qual continha 40–80 ng de DNA (4  $\mu\text{L}$  de DNA diluído em 2  $\mu\text{L}$  de água DEPC), 2  $\mu\text{L}$  de pré-mix *Taq DyeDeoxy*, 4  $\mu\text{L}$  de tampão de sequenciamento e 3  $\mu\text{L}$  de iniciador a 2  $\text{pmol}/\mu\text{L}$ . Posteriormente, a placa preparada foi ciclada num termociclador Perkin-Elmer 2400 (Cetus Corporation, Emeryville, California, EUA), em 25 ciclos de 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C e 1 minuto a 60°C.

Após a ciclagem, os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados a fim de eliminar o excesso de iniciadores, sais, dNTPs e ddNTPs não incorporados.

A cada orifício ou poço da placa de 96 poços foram adicionados 2,0  $\mu\text{L}$  de EDTA 125 mM e 3,0  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio 3 M. Em seguida, 55  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto foram adicionados a cada poço da placa de sequenciamento, sendo esta vedada, homogeneizada e incubada por 15 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi centrifugada por 35 minutos a 3700 rpm e 20°C. Nesta etapa ocorreu a precipitação das moléculas de DNA. Após a centrifugação, o etanol foi descartado e os *pellets* lavados com 70  $\mu\text{L}$  de etanol 70% e a placa novamente homogeneizada e centrifugada por 15 minutos a 3700 rpm e 4°C. Em seguida, o etanol foi descartado por inversão e o excesso retirado por evaporação a 95°C.

Após a precipitação, os fragmentos foram submetidos a uma etapa de desnaturaçã e para tanto, 15  $\mu\text{L}$  de formamida *HiDi* (Applied Biosystems, Gouda, The Netherlands) foram adicionados a cada um dos poços da placa. A placa foi vedada com uma *septa* específica para separação eletroforética em capilar, homogeneizada por 20 segundos e incubada a 94°C por 3 minutos, seguida de um choque térmico em gelo por 1 minuto. O sequenciamento foi realizado por separação eletroforética em capilar em um sequenciador modelo *ABI Prism 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

Os dados do sequenciamento foram coletados com o *software AutocAssembler* (Applied Biosystems). Após a coleta, os dados passaram por uma inspeção de qualidade por meio do *Sequencing Analysis Software* (Applied Biosystems).

Posteriormente, a edição e análise manual das sequências foram realizadas no *Sequencher DNA Sequence Assembly Software 4.1.4* (Gene Codes Corporation, EUA) e no *SeqMan* (Lasergene, Madison, WI). A sequência gerada por cada um dos iniciadores utilizados no sequenciamento de um dado fragmento de DNA foi analisada, a princípio

separadamente e, em seguida, agrupada com as demais sequências do mesmo fragmento, a fim de gerar o *contig* ou sequência consenso. Então, as sequências passaram por uma inspeção na qual foram corrigidas as ambiguidades. A partir de então, as sequências foram investigadas quanto à sua composição de bases.

Após edição completa dos *contigs*, estes foram submetidos ao BLAST na base de dados do *GenBank* através da página *web* do NCBI a fim de investigar a correspondência na identificação das espécies.

### 3.5 DIFERENCIAÇÃO DE LEVEDURAS DO COMPLEXO *CANDIDA PARAPSILOSIS*

As leveduras identificadas como *C. parapsilosis* pelo método clássico e automatizado foram selecionadas e o DNA foi extraído como descrito anteriormente, para posterior realização da técnica de RAPD-PCR com o objetivo de diferenciar as três espécies do complexo.

Foram utilizados os primers RP2 (5'-AAGGATCAGA-3') e RP4-2 (5'-CACATGCTTC-3'). A reação de RAPD foi procedida de acordo com o protocolo proposto por Lehmann *et al.* (1992) com algumas modificações.

Cada reação foi composta por uma mistura contendo 10 ng de DNA genômico; 200 µM de dNTP; 8µM do primer apropriado; 0,5 U de Taq DNA polimerase no tampão de PCR fornecido pelo fabricante e 2,7µM de MgCl<sub>2</sub>. O volume final da mistura da reação foi de 25µl.

Os produtos da PCR foram amplificados em termociclador Flexigene Thermocycler (Techne, Cambridge, United Kingdom) programado para primeiro ciclo de desnaturação por 5 minutos (min) a 94°C; seguido por 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 36°C e 2 min a 72°C cada; a extensão final foi de 10 minutos a 72°C.

Os produtos resultantes da amplificação do DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio (0.5 mg/ml); Sendo utilizado TAE (40 mM Tris [pH 8.0], 1 mM EDTA) como tampão de corrida, e um marcador de DNA de 100-bp. As bandas de DNA foram visualizadas através de iluminação com ultravioleta.

### 3.6 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Foram avaliados os seguintes parâmetros: condições maternas durante a gestação, prematuridade, sexo, peso, condição do neonato ao nascer, agentes etiológicos identificados e número de óbitos atribuíveis à infecção fúngica, através de acesso aos prontuários dos pacientes diagnosticados com candidemia, bem como o preenchimento do formulário epidemiológico (Apêndice 1).

### 3.7 ANÁLISE DA VIRULÊNCIA

#### 3.7.1 Cultura de células HeLa

Para estudar a adesão de *Candida* ao epitélio três processos principais foram realizados: preparação de células epiteliais, testes de adesão e quantificação da extensão da adesão, seguindo a metodologia proposta por Negri *et al.* (2011).

##### Preparo das células

Células HeLa provenientes da ATCC (“American Type Cell Collection”) e cedidas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido. Após serem lentamente descongeladas, as células foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM; Gibco) contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de penicilina/estreptomicina (P/S; Gibco) e foram incubadas a 37 °C em estufa a 5% de CO<sub>2</sub>.

Depois de atingir 80% de confluência, as células foram separadas utilizando 25% solução de tripsina-EDTA (Gibco); a concentração celular final foi ajustada em câmara de Neubauer a 1x10<sup>6</sup> células/ml em meio D-MEM sem P/S. Em seguida, 1 ml da suspensão foi adicionado às cavidades de uma placa de 24 poços e incubou-se a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Antes dos ensaios de adesão, os poços foram lavados duas vezes com PBS.

##### Teste de Adesão

Para realização do teste de adesão, as células de leveduras cultivadas em SDA incubadas a 37 °C por 18 horas foram suspensas em meio D-MEM, sem vermelho de fenol, ajustando uma concentração final de 1x10<sup>7</sup> leveduras/ml em câmara de Neubauer. Em seguida, 1 ml desta suspensão foi adicionado a cada poço de placa de 24 poços

cobertos com uma camada confluyente de células HeLa. Após 2 horas de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, cada poço foi lavado com PBS para remover leveduras não aderidas.

#### Contagem de células

As leveduras aderidas foram quantificadas usando o método de coloração com cristal violeta (CV), de acordo com Negri *et al.* (2010).

### **3.7.2 Formação de biofilme**

A avaliação da capacidade de formação de biofilme foi realizado utilizando o método visual descrito por Pfaller *et al.* (1995). Os isolados foram semeados no meio SDA contido em placas de Petri e mantidas a 35°C por 24 horas. Posteriormente, foi realizada uma suspensão em salina com concentração final de 10<sup>6</sup> UFC/mL. Dessa suspensão, 20µl foram inoculados em 180µl de ágar Sabouraud líquido contido nos poços de microplacas de 96 poços, mantidas a 35°C por 24 horas sem agitação. Em seguida o conteúdo foi aspirado e os poços lavados com água destilada e sobre estes, adicionado o corante safranina para realização de avaliação de acordo com a intensidade da coloração.

Interpretação: fraca coloração, lidos como 1+; coloração mediana 2+ a 3+ e fortemente corada 4+ representando aderência fraca, moderada e forte, respectivamente.

## **3.8 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), e M27-S4 do CLSI (2012).

No ensaio foram incluídas linhagens do American Type Culture Collection (ATCC), recomendadas pelo método: *Candida krusei* ATCC6528, *C. parapsilosis* ATCC22019 e *C. tropicalis* ATCC750.

Dois poços controles, isentos de antifúngico e fungos, foram incluídos no ensaio.

#### Preparação dos antifúngicos

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

#### Meio de Cultivo

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 SDA foram preparadas suspensões em 5mL de solução salina estéril 0,145 mol/L (8,5g/L NaCl; salina a 0,85%) cuja concentração final foi de  $10^6$  células/mL.

A suspensão resultante foi agitada em vórtex durante 15 segundos e a densidade celular, ajustada em espectrofotômetro com comprimento de onda a 530 nm, acrescentando-se solução salina suficiente para obter a transmitância equivalente de uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5 para uma suspensão-padrão de levedura contendo  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células por mL. A suspensão de trabalho foi ajustada a 1:100 seguida de uma diluição de 1:20 da suspensão-padrão com meio RPMI 1640, resultando em uma concentração de  $5,0 \times 10^2$  a  $2,5 \times 10^3$  células/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  $\mu\text{g/mL}$ ), micafungina (0,01 a 8  $\mu\text{g/ml}$ ), caspofungina (0,01 a 8  $\mu\text{g/ml}$ ), anidulafungina (0,01 a 8  $\mu\text{g/ml}$ ), voriconazol (0,03 a 16  $\mu\text{g/ml}$ ) e fluconazol (0,12 a 64  $\mu\text{g/mL}$ ). As placas foram mantidas a 35°C e a determinação da concentração inibitória mínima dos antifúngicos foi realizada por observação visual a cada 24 horas para as equinocandinas e 48 horas no caso da anfotericina B e azólicos.

A concentração fungicida para a anfotericina B foi representado pelo poço onde ocorrer 100% na inibição do crescimento fúngico e para as equinocandinas, voriconazol, bem como fluconazol, pelo poço que corresponder a inibição de 50% do crescimento quando comparado ao poço controle positivo.

Na leitura o fungo foi considerado resistente quando apresentou CIM  $> 1 \mu\text{g/ml}$  para anfotericina B. Para as equinocandinas e azólicos, os CIMs passaram a ser espécie-específicos de acordo com documento M27-S4 (CLSI 2012), e estão demonstrados na Tabela 1 e Tabela 2.

**Tabela 1.** Interpretação de testes de susceptibilidade antifúngica *in vitro* de isolados de *Candida* spp. frente às equinocandinas segundo a padronização do documento M27-S4 (*Clinical Laboratory and Standards Institute - CLSI 2012*).

Agente antifúngico	Espécie	CIM (µg/ml)		
		S	I	R
<b>Anidulafungina</b>	<i>Candida albicans</i>	≤0,25	0,5	≥1
	<i>C. glabrata</i>	≤0,12	0,25	≥0,5
	<i>C. tropicalis</i>	≤0,25	0,5	≥1
	<i>C. krusei</i>	≤0,25	0,5	≥1
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2,0	4	≥8
	<i>C. guilliermondii</i>	≤2,0	4	≥8
<b>Caspofungina</b>	<i>C. albicans</i>	≤0,25	0,5	≥1
	<i>C. glabrata</i>	≤0,12	0,25	≥0,5
	<i>C. tropicalis</i>	≤0,25	0,5	≥1
	<i>C. krusei</i>	≤0,25	0,5	≥1
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2,0	4	≥8
	<i>C. guilliermondii</i>	≤2,0	4	≥8
<b>Micafungina</b>	<i>C. albicans</i>	≤0,25	0,5	≥1
	<i>C. glabrata</i>	≤0,06	0,12	≥0,25
	<i>C. tropicalis</i>	≤0,25	0,5	≥1
	<i>C. krusei</i>	≤0,25	0,5	≥1
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2	4	≥8
	<i>C. guilliermondii</i>	≤2	4	≥8

S: Sensível; I: Intermediário; R: Resistente; CIM: Concentração Inibitória Mínima.

**Tabela 2.** Interpretação de testes de susceptibilidade antifúngica *in vitro* de isolados de *Candida* spp. frente ao fluconazol e ao voriconazol segundo a padronização do documento M27-S4 (*Clinical Laboratory and Standards Institute - CLSI 2012*).

Agente antifúngico	Espécie	CIM (µg/ml)		
		S	DD	R
<b>Fluconazol</b>	<i>Candida albicans</i>	≤2	4	≥8
	<i>C. glabrata</i>	-	≤32	≥64
	<i>C. krusei</i>	-	-	-
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2,0	4	≥8
	<i>C. tropicalis</i>	≤2,0	4	≥8
<b>Voriconazol</b>	<i>C. albicans</i>	≤0,12	0,25-0,5	≥8
	<i>C. glabrata</i>	-	-	-
	<i>C. krusei</i>	≤0,5	1	≥2
	<i>C. parapsilosis</i>	≤0,12	0,25-0,5	≥1
	<i>C. tropicalis</i>	≤0,12	0,25-0,5	≥1

S: Sensível; DD: Dose-dependente; R: Resistente; CIM: Concentração Inibitória Mínima.

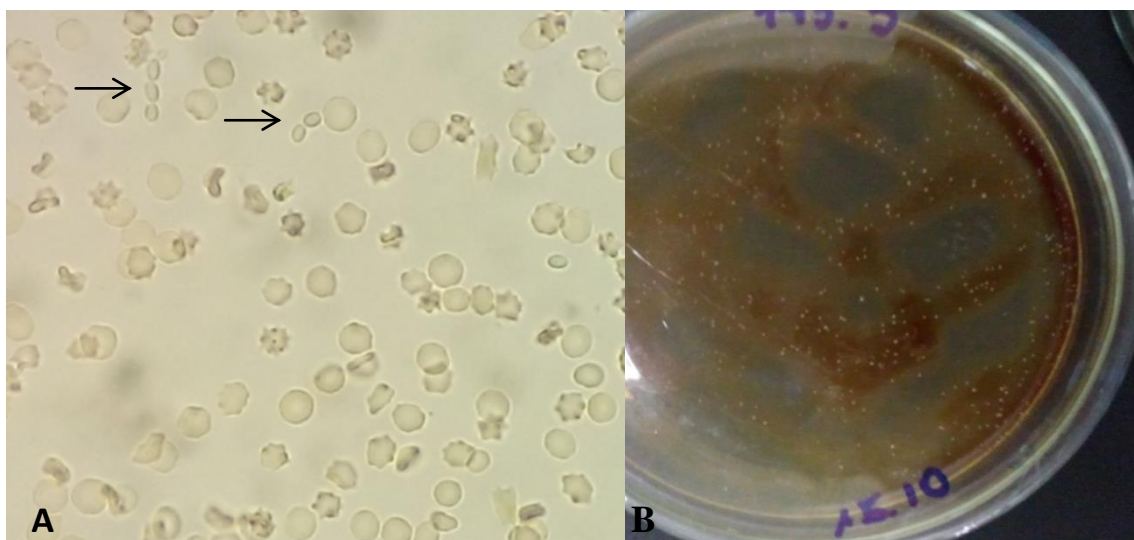


## 4 ANÁLISE DE RESULTADOS

### 4.1 DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO E IDENTIFICAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS

Foram obtidas, nas UTINs dos hospitais públicos, 243 amostras de sangue provenientes de 201 neonatos. O diagnóstico micológico foi baseado na presença de estruturas em parasitismo nas amostras de sangue ao exame direto, sendo observadas células de leveduras ovais, hialinas e brotantes e no isolamento em cultura de *Candida* (Figura 1A e 1B).

A partir destes pacientes foram diagnosticados 16 casos de fungemia por espécies de *Candida*, o que implica numa incidência de 8% aproximadamente.



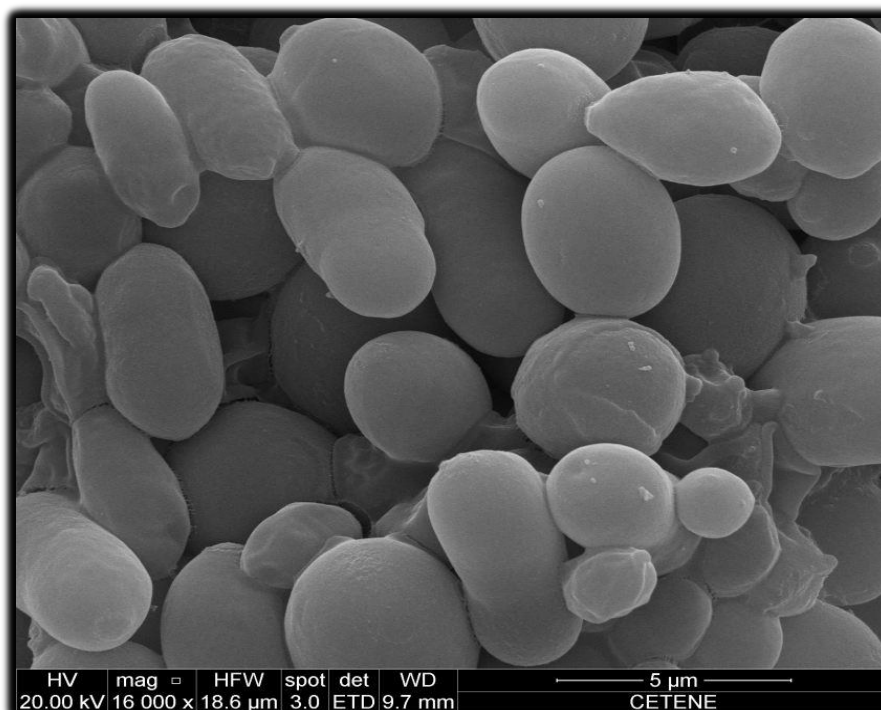
**Figura 1.** **A** – Exame direto de amostra de sangue evidenciando células de leveduras brotantes, ovais e hialinas; **B** – Cultura de *Candida* sp. após 24 horas de semeio de hemocultura e incubação a 37°C.

A identificação dos agentes etiológicos foi baseada na taxonomia clássica, método automatizado e espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) sendo observada uma prevalência de leveduras do complexo *C. parapsilosis* com oito isolados, seguidas por *C. albicans* (3), *C. haemulonii* (2), *C. guilliermondii* (1), *C. famata* (1) e *C. glabrata* (1) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Agentes etiológicos de candidemia de recém-nascidos hospitalizados em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal

Espécies identificadas	Número de isolados
Complexo <i>Candida parapsilosis</i>	08
<i>C. albicans</i>	03
<i>C. haemulonii</i>	02
<i>C. guilliermondii</i>	01
<i>C. famata</i>	01
<i>C. glabrata</i>	01

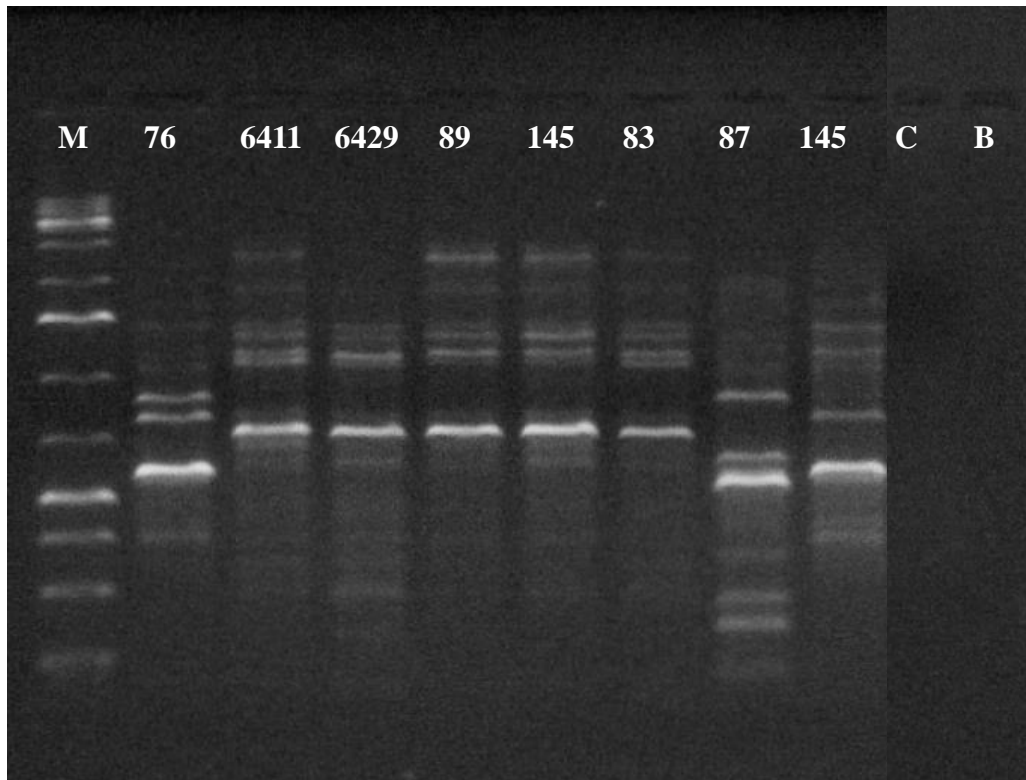
Os isolados de *C. famata* e *C. guilliermondii* foram diferenciados através da taxonomia molecular com o uso de primers espécie-específico. Os isolados identificados como *C. haemulonii* foram submetidos ao sequenciamento, sendo uma sequencia depositada no GenBank com o código de acesso KJ934715, o mesmo isolado, também teve sua morfologia avaliada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) conforme ilustrado na Figura 2.



**Figura 2.** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) evidenciando células de leveduras esféricas e ovóides, brotantes e isoladas de *Candida haemulonii*.

#### 4.2 DIFERENCIAÇÃO DE LEVEDURAS DO COMPLEXO *CANDIDA PARAPSILOSIS*

Foram submetidos à análise molecular por RAPD-PCR oito isolados de *C. parapsilosis* provenientes de amostras de sangue de neonatos diagnosticados com candidemia. Destes cinco foram classificadas como *C. parapsilosis stricto sensu*, dois *C. orthopsilosis* e um *C. metapsilosis* (Figura 3).



**Figura 3.** Gel de agarose obtido através dos produtos da RAPD-PCR utilizando o RP4-2. M: Marcador de pares de base 10kb; os isolados de *Candida parapsilosis stricto sensu* (6411, 6429, 89, 83, 145); *Candida orthopsilosis* (57, 87); *Candida metapsilosis* (76); C: Controle negativo; B: Branco.

Os resultados obtidos através da análise molecular proteômica por MALDI-TOF MS foram os mesmos, validando o uso da técnica de espectrometria de massa para diferenciação das leveduras do complexo.

### 4.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Os dados referentes ao perfil epidemiológico de infecções fúngicas hematológicas nos neonatos mostram que todos os agentes etiológicos pertencem à espécie do gênero *Candida*. Entre os acometidos, todos os neonatos eram prematuros com idade gestacional média de 29,7 semanas e o sexo mais acometido foi o masculino com 62,5% das ocorrências (Tabela 4).

A maioria dos recém-nascidos apresentou muito baixo peso ao nascer (peso ao entre 1000 e 1500 gramas) e todos fizeram uso, em pelo menos um momento durante o estabelecimento e decorrer da micose, de dispositivos médico-invasivos, tais como cateteres e dispositivos para nutrição parenteral.

**Tabela 4.** Dados epidemiológicos relacionados às infecções fúngicas ocorridas nos neonatos internados em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal de Recife-PE.

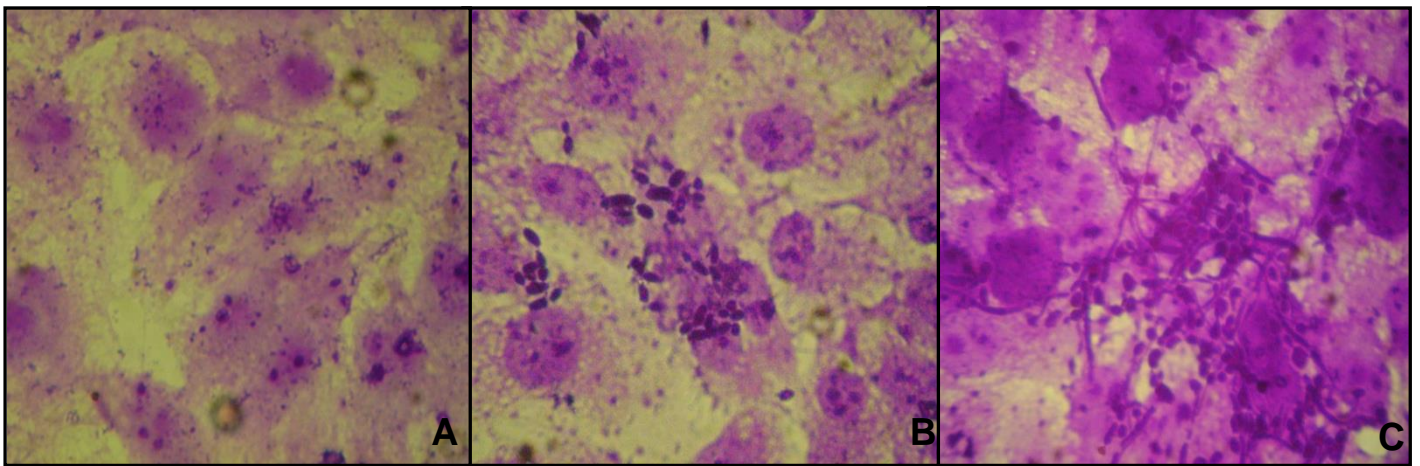
<b>Registro</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade gestacional (semanas)</b>	<b>Peso ao nascer</b>	<b>Uso de dispositivo médico-invasivo</b>	<b>Agente etiológico identificado</b>
6411	M	31	1450g	NPT, CVC	<i>Candida parapsilosis</i>
6429	M	27	1075g	NPT	<i>C. parapsilosis</i>
57	F	27,5	700g	NPT, CVC	<i>C. orthopsilosis</i>
63	M	29,2	1345g	NPT	<i>C. guilliermondii</i>
76	F	36	1270g	NPT, CVC	<i>C. metapsilosis</i>
83	M	28	775g	NPT	<i>C. parapsilosis</i>
85	M	31	1075g	NPT, CVC	<i>C. albicans</i>
86	F	30	2295g	NPT, CVC	<i>C. glabrata</i>
87	M	30	1915g	NPT, CVC	<i>C. orthopsilosis</i>
89	F	29,5	865g	NPT	<i>C. parapsilosis</i>
91	M	28	1250g	NPT, CVC	<i>C. famata</i>
105	F	32	1125g	NPT, CVC	<i>C. albicans</i>
123	M	26,6	660g	NPT	<i>C. haemulonii</i>
129	M	28	1020g	NPT	<i>C. haemulonii</i>
140	M	27	700g	NPT	<i>C. albicans</i>
145	F	35,6	2530g	NPT	<i>C. parapsilosis</i>

F: Feminino; M: Masculino; NPT: Nutrição parenteral total; CVC: Cateter venoso central

#### 4.4. CARACTERIZAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS QUANTO A VIRULÊNCIA

O grau de virulência dos isolados identificados foi avaliado através da análise de adesão às células HeLa e formação de biofilme em superfície de poliestireno.

Em relação à aderência às monocamadas de cultura de células HeLa, houve diferença na expressão de forte, moderada e fraca entre isolados da mesma espécie e diferentes espécies, ou seja, intra e interespecífica (Figura 4). A maior capacidade de adesão ocorreu por isolados de *C. albicans*, *C. glabrata* e um isolado de *C. parapsilosis* (Tabela 5), destacando a alta capacidade de virulência destas cepas.

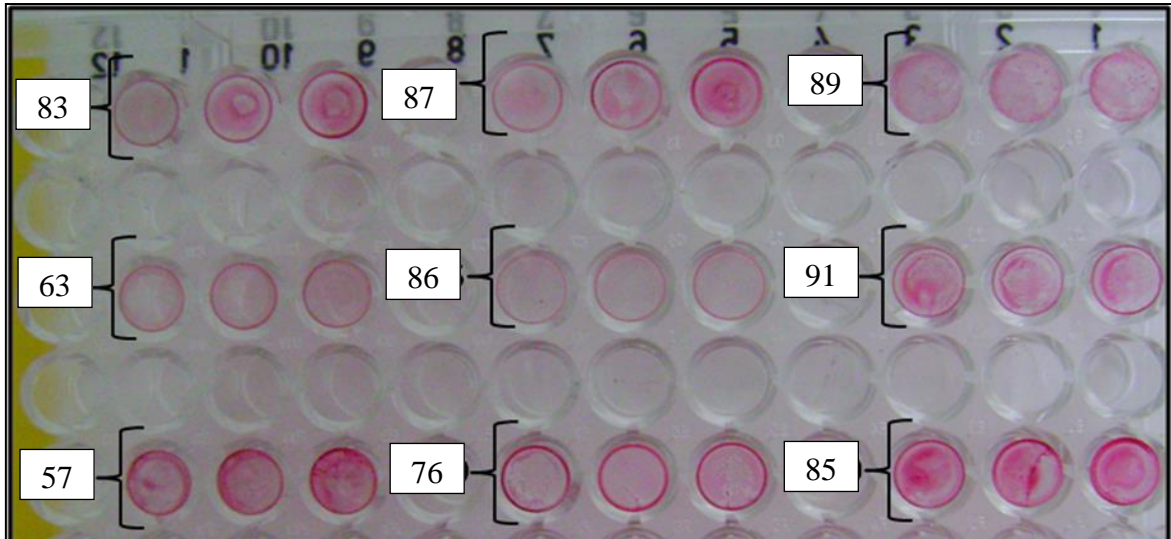


**Figura 4.** Adesão de leveduras às células HeLa. A: Fraca aderência por isolado de *Candida guilliermondii*; B: Moderada aderência por isolado de *C. parapsilosis*; C: Forte aderência por isolado de *C. albicans*.

**Tabela 5.** Capacidade de adesão às células HeLa por isolados de *Candida* proveniente de hemoculturas de neonatos internados em Unidades de Terapia Intensiva.

<b>Registro</b>	<b>Espécie</b>	<b>Classificação da capacidade de adesão às células HeLa</b>
6411	<i>Candida parapsilosis</i>	Fraca
6429	<i>C. parapsilosis</i>	Fraca
57	<i>C. orthopsilosis</i>	Fraca
63	<i>C. guilliermondii</i>	Fraca
76	<i>C. metapsilosis</i>	Fraca
83	<i>C. parapsilosis</i>	Moderada
85	<i>C. albicans</i>	Forte
86	<i>C. glabrata</i>	Forte
87	<i>C. orthopsilosis</i>	Fraca
89	<i>C. parapsilosis</i>	Forte
91	<i>C. famata</i>	Moderada
105	<i>C. albicans</i>	Moderada
123	<i>C. haemulonii</i>	Moderada
129	<i>C. haemulonii</i>	Moderada
140	<i>C. albicans</i>	Forte
145	<i>C. parapsilosis</i>	Fraca

Na avaliação quanto a capacidade de formação de biofilme também foi verificada diferença entre os isolados de mesma e diferentes espécies como ilustra a Figura 5. Dos isolados que apresetaram forte formação de agregados celulares se destacaram dois isolados *C. parapsilosis* e um de *C. albicans*, os resultados referentes ao ensaio estão apresentados na tabela 6.



**Figura 5.** Formação de biofilme com diferentes intensidades expressas por espécies de *Candida* isoladas em hemocultura de neonatos. Fraca capacidade de formação de biofilme: 63, 86; capacidade moderada: 76, 89, 91, 87, 83; forte capacidade: 57, 85.

**Tabela 6.** Formação de biofilme por isolados de *Candida* provenientes de hemoculturas de neonatos.

Registro	Espécie	Capacidade de formação de biofilme	Classificação
6411	<i>Candida parapsilosis</i>	2+	Moderada
6429	<i>C. parapsilosis</i>	2+	Moderada
57	<i>C. orthopsilosis</i>	4+	Forte
63	<i>C. guilliermondii</i>	1+	Fraca
76	<i>C. metapsilosis</i>	2+	Moderada
83	<i>C. parapsilosis</i>	3+	Moderada
85	<i>C. albicans</i>	4+	Forte
86	<i>C. glabrata</i>	1+	Fraca
87	<i>C. orthopsilosis</i>	3+	Forte
89	<i>C. parapsilosis</i>	2+	Moderada
91	<i>C. famata</i>	2+	Moderada
105	<i>C. albicans</i>	2+	Moderada
123	<i>C. haemulonii</i>	1+	Fraca
129	<i>C. haemulonii</i>	1+	Fraca
140	<i>C. albicans</i>	2+	Moderada
145	<i>C. parapsilosis</i>	4+	Forte

A cepa 85 de *C. albicans* pode ser classificada como a que apresenta o maior grau de virulência de acordo com os padrões avaliados, pois apresentou alta capacidade de aderência às células epiteliais, bem como forte habilidade de formação de biofilme.

#### 4.5 SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

Foram avaliadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos 16 isolados frente a seis antifúngicos (anfotericina B, fluconazol, voriconazol, micafungina, caspofungina e anidulafungina), segundo a metodologia de microdiluição em caldo.

CIMs dos agentes etilógicos frente à anfotericina B e azólicos estão demonstrados na Tabela 7, todos os isolados, exceto os de *C. haemulonii*, foram sensíveis a anfotericina B. Uma cepa de *C. albicans* apresentou resistência aos azóis e as cepas de *C. haemulonii* apresetaram CIM dose-dependete para o fluconazol.

Em relação à susceptibilidade às equinocandinas, apenas um isolado de *C. parapsilosis* 6411 apresentou resistência frente à anidulafungina, os resultados podem ser visualizados na tabela 8.

O voriconazol apresentou melhor atividade do que o fluconazol para *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. O mesmo aconteceu com *C. haemulonii* que apresentou menores CIMs para o voriconazol, sendo resistente à anfotericina B, e exibindo dose-dependência ao fluconazol.

O isolado mais sensível foi o de *C. metapsilosis* cuja sensibilidade ocorreu com todos os antifúngicos testados.



**Tabela 7.** Concentração inibitória mínima (CIM) dos isolados provenientes de amostras sanguíneas de neonatos internados em Unidades de Terapia Intensiva frente à anfotericina B , fluconazol e voriconazol.

<b>Registro</b>	<b>Espécie</b>	<b>Anfotericina B</b>	<b>Fluconazol</b>	<b>Voriconazol</b>
6411	<i>Candida parapsilosis</i>	0,06 µg/ml	0,12 µg/ml	0,06 µg/ml
6429	<i>C. parapsilosis</i>	0,25 µg/ml	0,25µg/ml	0,12 µg/ml
57	<i>C. orthopsilosis</i>	0,25 µg/ml	0,25µg/ml	0,12 µg/ml
63	<i>C. guilliermondii</i>	0,25 µg/ml	32µg/ml	1 µg/ml
76	<i>C. metapsilosis</i>	0,03 µg/ml	0,5 µg/ml	0,06 µg/ml
83	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 µg/ml	1 µg/ml	0,12 µg/ml
85	<i>C. albicans</i>	0,5 µg/ml	1 µg/ml	0,06 µg/ml
86	<i>C. glabrata</i>	0,5 µg/ml	16 µg/ml	0,06 µg/ml
87	<i>C. parapsilosis</i>	1 µg/ml	2 µg/ml	0,25 µg/ml
89	<i>C. parapsilosis</i>	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml
91	<i>C. famata</i>	0,25 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml
105	<i>C. albicans</i>	0,25 µg/ml	64 µg/ml	16 µg/ml
123	<i>C. haemulonii</i>	8 µg/ml	32 µg/ml	0,12 µg/ml
129	<i>C. haemulonii</i>	8 µg/ml	32 µg/ml	1 µg/ml
140	<i>C. albicans</i>	0,25 µg/ml	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml
145	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 µg/ml	1 µg/ml	0,12 µg/ml

**Tabela 8.** Concentração inibitória mínima (CIM) dos isolados provenientes de amostras sanguíneas de neonatos internados em Unidades de Terapia Intensiva frente às equinocandinas.

<b>Registro</b>	<b>Espécie</b>	<b>Anidulafungina</b>	<b>Micafungina</b>	<b>Caspofungina</b>
6411	<i>Candida parapsilosis</i>	8 µg/ml	1 µg/ml	0,25 µg/ml
6429	<i>C. parapsilosis</i>	4 µg/ml	1 µg/ml	0,25 µg/ml
57	<i>C. orthopsilosis</i>	0,03 µg/ml	0,03 µg/ml	0,25 µg/ml
63	<i>C. guilliermondii</i>	0,12 µg/ml	0,12 µg/ml	0,12 µg/ml
76	<i>C. metapsilosis</i>	1 µg/ml	0,25 µg/ml	0,5 µg/ml
83	<i>C. parapsilosis</i>	1 µg/ml	0,06 µg/ml	0,25 µg/ml
85	<i>C. albicans</i>	0,01 µg/ml	0,01 µg/ml	0,01 µg/ml
86	<i>C. glabrata</i>	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml
87	<i>C. parapsilosis</i>	4 µg/ml	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml
89	<i>C. parapsilosis</i>	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml
91	<i>C. famata</i>	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml
105	<i>C. albicans</i>	0,03 µg/ml	0,01 µg/ml	0,03 µg/ml
123	<i>C. haemulonii</i>	0,01 µg/ml	0,03 µg/ml	0,25 µg/ml
129	<i>C. haemulonii</i>	0,01 µg/ml	0,03 µg/ml	0,25 µg/ml
140	<i>C. albicans</i>	0,01 µg/ml	0,01 µg/ml	0,03 µg/ml
145	<i>C. parapsilosis</i>	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml

## 5 DISCUSSÃO

Segundo estimativa do DATASUS (Ministério da saúde, 2008), 60% da mortalidade infantil no Brasil ocorre no período neonatal, sendo a sepse uma das principais causas. Oliveira e colaboradores (2012) ainda destacam espécies do gênero *Candida* como a terceira maior causa de sepse em recém-nascidos internados em UTIN.

Candidemia é uma das micoses oportunistas mais frequentes em todo o mundo, afetando pacientes imunocomprometidos, incluindo neonatos prematuros. Estudos epidemiológicos limitados na América Latina indicam que a incidência é ainda maior nessa região quando comparado com países do hemisfério norte. O diagnóstico destas infecções geralmente é tardio o que afeta no início da terapia antifúngica (Santolaya *et al.*, 2013).

A incidência de candidíase neonatal subiu rapidamente na década de 1980 e 1990 com o aumento da sobrevivência de recém-nascidos prematuros e difusão do uso de cateteres venosos centrais (Kelly, Benjamin e Smith, 2014). No entanto, esta tendência inverteu-se, e a ocorrência de candidíase invasiva em neonatos passou a diminuir substancialmente ao longo dos últimos anos (Fridkin *et al.*, 2006; Aliaga *et al.*, 2014).

De acordo com nosso estudo realizado em UTINs de Recife-PE candidemia esteve presente em aproximadamente 8% dos neonatos com suspeita de sepse. Alguns autores relatam que o envolvimento de espécies de *Candida* em infecção hematogênica neonatal seja de aproximadamente 8-10% (Coello *et al.*, 2003; Tragiannidis, Tsoulas e Groll, 2015). No entanto, a incidência de candidemia varia consideravelmente entre UTINs de diferentes regiões (Leibovitz, 2012). Rao, Surendernath e Sandeepthi (2014), em um estudo realizado em hospitais indianos, observaram uma prevalência de candidemia neonatal envolvida em 20,39% dos quadros de sepse.

A condição verificada como principal fator predisponente para candidemia neonatal foi a prematuridade, entre os acometidos 100% possuíam idade gestacional inferior a 37 semanas e a maioria apresentava muito baixo peso ao nascer, outros fatores associados também foram o uso de dispositivos médico-invasivos, nutrição parenteral a antibioticoterapia de amplo espectro. Esses dados corroboram com pesquisas anteriores, Al-Sweih e colaboradores (2009) em UTIN do Kuwait, uma variedade de fatores de risco associados com o desenvolvimento de infecção invasiva por *Candida* em

prematturos foi identificada, além do baixo peso e idade gestacional, destacando que 82% recebiam nutrição parenteral e 78% faziam uso de cateter venoso central.

Apesar de dispositivos médico-invasivos exercerem um papel crítico na patogênese da candidíase invasiva, atuando como uma via de entrada para *Candida*, bem como uma superfície externa para a adesão e a formação de biofilme, em certas situações o seu uso é indispensável. Cateteres venosos centrais são necessários no tratamento de prematturos em estado grave, minimizando a necessidade de punção venosa e facilitando a administração de nutrição parenteral, hemoderivados, e terapia inotrópica (Benjamin *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2013).

Em nossas pesquisas houve uma predominância do sexo masculino (62,5%), o que está de acordo com o estudo de Pedroso e Krebs (2008), que 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%). De acordo com Stevenson *et al.*, (2000) nascem mais meninos imunodeprimidos 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.

Ao decorrer da pesquisa um total de 16 casos de candidemia em UTIN foram diagnosticados, a espécie que mais acometeu os pacientes foram as do complexo *C. parapsilosis* isoladas em 50% das ocorrências, superando, inclusive, *C. albicans* que é historicamente mais frequente (Vendettuoli *et al.*, 2008; Cahan e Deville, 2011). Outro dado relevante foi o isolamento de dois casos de candidemia ocasionados por *C. haemulonii*, a qual de acordo Ruan *et al* (2010) raramente causa doenças em humanos. Em neonatos apenas um caso de surto (Khan *et al.*, 2007) foi relatado até o momento.

Apesar da prevalência mundial de *C. albicans*, alguns autores dão destaque a regiões como Brasil, Portugal e Espanha, onde muitas vezes a incidência de candidemia por *C. parapsilosis* se torna maior (Costa-de-Oliveira *et al.*, 2008; Neu *et al.*, 2009). Em estudo brasileiro em UTIN de um Hospital da Bahia, constatou-se que dentre os agentes etiológicos de candidemia isolados e identificados houve predominância de *C. parapsilosis* (38%), seguida por *C. albicans* (33%) (Arraes, 2012). Hammoud *et al.* (2013) também destacam que o número de casos de candidemia persistente em UTIN do Kuwait ocasionada por *C. parapsilosis* superou o número dos ocasionados por *C. albicans*.

Vários estudos indicam que alguns fatores associados aos nossos pacientes como o uso prolongado de cateter venoso em posição central e a nutrição parenteral aumentam os riscos para infecções invasivas por *C. parapsilosis*, além disso, o tempo prolongado de internação e o fato desses neonatos serem tratados por um grande número de pessoas aumentam a probabilidade de infecção (Trofa, Gácsér e Nosanchuk, 2008; Conde-Rosa *et al.*, 2010).

Na verdade, *C. parapsilosis* é formada por um complexo de três espécies denominadas *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (Tavanti *et al.*, 2005). No presente estudo submetemos à análise por RAPD-PCR e MALDI-TOF MS 14 isolados de *C. parapsilosis* provenientes de amostras de sangue de neonatos, sendo, por ambos os métodos, observada prevalência de *C. parapsilosis stricto sensu* (5), seguido por *C. orthopsilosis* (2) *C. metapsilosis* (1). Esses resultados reforçam que a espectrometria de massa por tempo de voo tem trazido resultados favoráveis para separação das espécies do complexo que condizem com os obtidos por genotipagem (De Carolis *et al.*, 2014).

Pesquisas anteriores também demonstram uma prevalência de *C. parapsilosis stricto sensu*, dados semelhantes foram encontrados em um estudo realizado com isolados do complexo *psilosis* a partir de hemoculturas coletadas de pacientes com candidemia durante um estudo multicêntrico envolvendo 11 hospitais gerais localizados em nove cidades brasileiras entre 2003 e 2004. Este estudo demonstrou a presença de *C. parapsilosis stricto sensu* (88%), *C. orthopsilosis* (9%) e *C. metapsilosis* (3%) (Gonçalves *et al.*, 2010). Ainda estudo brasileiro incluindo 53 isolados identificados fenotipicamente como pertencentes ao complexo foram caracterizados por métodos moleculares, sendo *C. parapsilosis stricto sensu* a espécie predominante (75,4%) seguida de *C. orthopsilosis* (20,8%) e *C. metapsilosis* (3,8%) (Carvalho, 2012). Lockart e colaboradores (2008) enfatizam que tem ocorrido um aumento no número de casos de candidemia por *C. orthopsilosis*, principalmente a partir de 2005. Entretanto, existem poucos dados que avaliam exclusivamente a epidemiologia da candidemia pelo complexo *C. parapsilosis* em neonatos e crianças.

Em um estudo realizado por Blyth *et al.* (2009), *C. parapsilosis stricto sensu* foi significativamente mais comum em recém-nascidos e crianças do que em adultos. No trabalho descrito por Canto'n *et al.* (2011), a espécie do complexo mais frequente em crianças foi *C. parapsilosis stricto sensu*, seguida por *C. orthopsilosis*, não ocorrendo isolamento de *C. metapsilosis*. Garcia-Effron *et al.* (2012) relataram um único estirpe

(1,19%) de *C. metapsilosis* entre 84 cepas isolada a partir de hemocultura de pacientes pediátricos.

As diferentes espécies do complexo *psilosis* podem apresentar diferentes perfis de virulência, bem como são encontrados entre as diferentes espécies de *Candida* (Bertini *et al.*, 2013; Tosun *et al.*, 2013). No desenvolvimento da candidíase uma propriedade de virulência essencial é a capacidade de adesão do microrganismo, sendo assim a análise *in vitro* desta propriedade importante para contribuir na compreensão do comportamento destes organismos em um processo de infecção específico (Menezes *et al.*, 2013).

Desta forma, Pires e colaboradores (2001) destacam que a utilização de cultivos celulares estabelecidos apresenta algumas vantagens em relação ao uso de células não-estabelecidas nos testes de adesão *in vitro*, pois, as células da cavidade oral são inevitavelmente colonizadas com micro-organismos comensais além de sofrerem alterações em termos de idade e de viabilidade. Dentro deste contexto, linhagens de células HeLa, isoladas em 1951 de carcinoma de cérvix uterino, vem sendo utilizadas no entanto, poucos estudos incluindo aderência de células fúngicas (Weinberg, 2008).

Os 16 isolados clínicos obtidos foram testados quanto a capacidade de adesão às células HeLa, podendo ser verificada forte aderência a esta linhagem celular, especialmente por cepas de *C. albicans* e *C. glabrata*. Esses dados corroboram com estudos que apresentam *C. albicans* como a espécie de *Candida* com maior capacidade de se aderir às células epiteliais (Monod e Borg-Von, 2002; Sundstrom, Cutler e Staab, 2002). Ainda, Tamura *et al.* (2007) e Negri *et al.* (2010) destacam *C. glabrata* como a espécie de *Candida* não-*albicans* mais aderente. Kuhn e Vyas (2012) demonstraram que a adesina Epa1p de *C. glabrata*, além de mediar a ligação às células epiteliais, são capazes de interagir com células do sistema imune inato de mamíferos, como macrófagos, induzindo, deste modo, a fagocitose.

Nossos resultados mostraram que *C. parapsilosis* e *C. albicans* foram as espécies que demonstraram a melhor capacidade de formação de biofilme. A candidemia também é frequentemente associada com a capacidade da levedura em formar estes agregados celulares na luz de dispositivos, tais como cateteres venosos centrais e próteses (Lynch e Robertson, 2008). Os biofilmes constituem uma população de microrganismos ligados uns aos outros, que podem se aderir a uma superfície, rodeada por uma matriz extracelular. Os biofilmes tendem a reduzir a eficácia da terapia antifúngica, dificultando o tratamento (Ramage *et al.*, 2012).

Esses dados corroboram com o de outros autores, Ramage, Lopez-Ribot (2005) afirmam que a maioria das doenças causadas por *C. albicans* são associadas ao crescimento do biofilme. Contudo, Silva e colaboradores (2009a) demonstraram que *C. parapsilosis* é uma das espécies de *Candida* não-*albicans* com maior habilidade de produção de biofilme.

Apesar de isolados de *C. parapsilosis* se destacarem na formação de biofilme, um isolado de *C. albicans* foi, com base em nossos resultados, classificado como o mais patogênico, por apresentar forte aderência às células epiteliais e forte formação de agregados celulares. De acordo com Soares *et al* (2013) *C. albicans* é uma levedura com elevado grau de virulência e seu potencial patogênico é bastante conhecido, em neonatos, a candidemia por esta levedura costuma estar associada à colonização prévia, transmitida verticalmente no momento do parto. Embora, *C. parapsilosis* seja menos virulenta do que *C. albicans* forma biofilme com facilidade o que pode contribuir com a capacidade de se aderir a cateteres e causar infecções sistêmicas em RNs prematuros que fazem uso de nutrição parenteral ou outros dispositivos invasivos (Pfaller *et al.*, 2008).

Em relação susceptibilidade antifúngica, todos os isolados, exceto os de *C. haemulonii*, foram sensíveis a anfotericina B. Em relação aos azólicos as mesmas cepas de *C. haemulonii* apresentaram dose-dependência e uma estirpe de *C. albicans* foi resistente tanto ao fluconazol quanto ao voriconazol.

Resistência à anfotericina B 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. Porém, algumas espécies tem apresentado baixa susceptibilidade, relatos anteriores demonstram que *C. haemulonii* costuma ter resistência não apenas à anfotericina B, como também aos azólicos apresentando perfil de dose-dependência ou resistência, o que corrobora com os nossos resultados (Ruan *et al.*, 2010; Muro *et al.*, 2012).

Foi verificada resistência simultânea por isolado de *C. albicans* aos azóis testados. Apesar de o fluconazol ser uma das drogas mais comumente utilizadas seu uso rotineiro tem sido associado ao desenvolvimento resistência. Estima-se que cerca de 10% dos isolados de *C. albicans* provenientes de amostras de sangue são resistentes ao fluconazol (Ferreira *et al.*, 2012). Alguns autores também afirmam que em pacientes

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

Devido ao perfil terapêutico e os níveis de segurança favoráveis, o uso de equinocandinas em pacientes críticos, que apresentam resistência aos azóis, tem exibido um rápido aumento e existem diretrizes para administração destes medicamentos como tratamento primário para candidíase invasiva. Resistência a esta classe de fármacos é rara (Glockner, 2011). No entanto, estudos mostram uma menor susceptibilidade por espécies *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* (Bal, 2010; Walker *et al.*, 2010). Esses dados estão de acordo com nosso estudo, onde se verificou sensibilidade de todos os isolados as três equinocandinas, exceto um de *C. parapsilosis* que se mostrou resistente a anidulafungina, no entanto os CIMs associados a *C. parapsilosis* foram mais elevados quando comparados aos de outras espécies.

Todos os isolados que apresentaram resistência a anfotericina B e/ou azóis foram sensíveis às equinocandinas, enfatizando a possibilidade do desenvolvimento de pesquisas futuras que visem a padronização do uso desta classe de fármaco para o tratamento de candidemia neonatal, pois segundo Blyth e colaboradores (2011), a terapêutica neste grupo de pacientes costuma ser baseada apenas em ensaios clínicos envolvendo adultos, o que ainda gera insegurança na escolha destes medicamentos para uso em RNs.

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



## 6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados observados ao longo do desenvolvimento da pesquisa podemos inferir que:

- Infecções fúngicas hematogênicas por *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. haemulonii*, *C. guilliermondii* e *C. glabrata* ocorrem em neonatos internados em UTINs;

- *C. parapsilosis* é a espécie mais frequentemente isolada de candidemia em neonatos, superando a ocorrência de *C. albicans* e fortalecendo os indícios de emergência de espécies não-*albicans* na população avaliada;

- Prematuridade, baixo peso ao nascer e uso de dispositivos médico-invasivos constituem fatores de risco para o desenvolvimento de candidemia em RNs;

- Candidemia neonatal permanece acometendo mais o sexo masculino;

- Técnicas de RAPD-PCR e espectrometria de massa são válidas para diferenciar as espécies do complexo *psilosis*.

- A espécie do complexo *parapsilosis* mais relacionada com infecção da corrente sanguínea em neonatos é a *C. parapsilosis sensu stricto*, seguida por *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*;

- Isolados de *C. albicans* e *C. glabrata* são os que apresentam maior capacidade de adesão às células HeLa;

- *C. albicans* 85 e *C. parapsilosis* 145 se destacam na produção de biofilmes;

- Espécies de *C. haemulonii* apresentam resistência à anfotericina B, podendo ainda apresentar dose-dependência ao fluconazol;

- Resistência cruzada aos azólicos pode ocorrer, sobretudo em isolados de *C. albicans*;

- Resistência por espécies de *Candida* às equinocandinas é rara, porém *C. parapsilosis* apresentam CIMs mais elevados em relação à outras espécies de *Candida*.

- O voriconazol apresentou boa atividade diante de alguns isolados resistentes ou dose-dependentes ao fluconazol.

## 7 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, J., BANSAL, S., MALIK, G.K., JAIN, A. Trends in neonatal septicemia: emergence of non-*albicans Candida*. **Indian Pediatrics**, v. 41, p. 712-715, 2004.
- AGHAI, Z.H., MUDDLURU, M., NAKHLA, T.A., *et al.* Fluconazole prophylaxis in extremely low birth weight infants: association with cholestasis. **J Perinatol**. v. 26, n. 9, p. 550–555, 2006.
- AJENJO H.M.C., AQUEVEDO, S.A., GUZMA'N D.A.M., POGGI, M.H., CALVO, A.M., CASTILLO, V.C., LEÓN C.E., ANDRESEN, H.M., LABARCA, L.J. Epidemiological profile of invasive candidiasis in intensive care units at a university hospital. **Rev Chilena Infectol**, v. 28, p. 118–122, 2011.
- AKINS, R.A. An update on antifungal agents and mechanism of resistance in *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 42, p. 285-318, 2005.
- ALEXANDER, B.D., SCHELL, W.A., MILLER, J.L., LONG, G.D., PERFECT, J.R. *Candida glabrata* fungemia in transplant patients receiving voriconazole after fluconazole. **Transplantation**, v. 80, p.868–871, 2005.
- ALIAGA, S., CLARK, R.H., LAUGHON, M., *et al.* Changes in the incidence of candidiasis in neonatal intensive care units. **Pediatrics**, v. 133, n. 2, p. 236–42, 2014.
- ALMIRANTE, B.J., ALONSO-TARRES, L., RODRIGUEZ-TUDELA, J.L., PAHISSA, A. Epidemiology, risk factors and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, from 2002 to 2003. **J Clin Microbiol**. v. 44, p.1681–1685, 2006.
- AL-SWEIH, N., KHAN, K. KHAN, S., DEVARAJAN, L.V. Neonatal candidaemia in Kuwait: a 12-year study of risk factors, species spectrum and antifungal susceptibility. **Mycoses**, v. 52, n. 6, p. 518–523, 2009.
- AMARAL-LOPES, S., MOURA, A. Neonatal fungal sepsis by *Candida krusei*: A report of three cases and a literature review. **Medical Mycology Case Reports**, v. 1, p. 24–26, 2012.
- ANTUNES, A.G.V., PASQUALOTTO, A.C., DÍAZ, M.C., D' AZEVEDO, P.A., SEVERO, L.C. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, p. 239-241, 2004.
- ARATHOON, E.G., GOTUZZO, E., NORIEGA, L.M., *et al.* Randomized, double-blind, multicenter study of caspofungin versus amphotericin B for treatment of oropharyngeal and esophageal candidiases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 2, p. 451–457, 2002.

ARENDRUP, M. C., FISHER B. T., ZAOUTIS T. E. Invasive fungal infections in pediatrics and neonatal population: diagnostics and management issues. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15, p. 613–624, 2009.

ARIFF, S., SALEEM, A.F., SOOFI, F.B., SAJJAD, R. Clinical spectrum and outcomes of neonatal candidiasis in a tertiary care hospital in Karachi, Pakistan. **Journal of infection developing countries**, v. 5, n. 3, p.216 – 223, 2011.

ARNOLD, T.M., DOTSON, E., SAROSI, G.A., HAGE, C.A. Traditional and Emerging Antifungal Therapies. **Proceedings of The American Thoracic Society**, v. 7, p. 222-228, 2010.

ARRAES, A.C.P. Detecção da diversidade molecular de *Candida* spp. Isoladas de Uti Neonatal. **Trabalho de Dissertação, Universidade Federal da Bahia** pp: 1-109, 2012.

ASADZADEH, M., AHMAD, S., AL-SWEIH, N., KHAN, Z.U. Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* strains isolated from clinical specimens in Kuwait. *Journal of Medical Microbiology* 58: 745-752.

ASHFORD, B. Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. **Am J Trop Med Hyp**, v. 8, p.507–538, 1928.

AVILA-AGUERO, M. L., CANAS-COTO, A., ULLOA-GUTIERREZ, R., CARO, M. A., ALFARO, B., PARIS, M. M. Risk factors for *Candida* infections in a neonatal intensive care unit in Costa Rica, **International Journal of Infectious Diseases**, v. 9, p. 90-95, 2005.

AYDEMIR, C., OGUZ, S.S., DIZDAR, E.A., *et al.* Randomised controlled trial of prophylactic fluconazole versus nystatin for the prevention of fungal colonisation and invasive fungal infection in very low birth weight infants. **Arch Dis Child Fetal Neonatal**, v. 96, n. 3, p. 164–168, 2011.

BAKIR, M., ÇERIKCIOĞLU, N., TIRTIR, A., BERRAK, S., ÖZEK, E. CANPOLAT, C. *Pichia anomala* fungaemia in immunocompromised children. **Mycoses**, v. 47, p. 231-235, 2004.

BAL, A.M. The echinocandins: three useful choices or three too many? **Int J Antimicrob Agents**, v. 35,p.13-18, 2010.

BALKIS, M.M., LEIDICH, S.D., MUKHERJEE, P.K., GHANNOUM, M.A. Mechanisms of Fungal Resistance: An Overview. **Drugs**. v. 62, p. 1025-1040, 2002.

BALLOT, D.E., BOSMAN, N., NANA, T., RAMDIN, T., COOPER, P.A. Background changing patterns of neonatal fungal sepsis in a developing country. **Journal of tropical pediatrics**, v. 59, n. 6, p. 460-464, 2013.

BARADKAR, V.P., MATHUR, M., KUMAR, S., RATHI, M. *Candida glabrata* emerging pathogen in neonatal sepsis. **Ann Trop Med Public Health**, v. 1, p. 5-8, 2008.

BARADKAR, V.P., TAKLIKAR, S., KUMAR, S. Fatal postoperative *Candida glabrata* candidemia in a child with congenital heart disease. **Journal of global infectious diseases**, v. 1, n. 1, p. 68-70, 2009.

BATISTA, J.C.M., KREBS, V.L.J., RUIZ, L.S., AULER, M.E., HAHN, R.C., PAULA, C.R. Oral colonization: A possible source for candidemia in low-weight neonates. **Journal de Mycologie Médicale** [<http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2013.11.004>], 2014.

BECERRA, M.R., TANTALEÁN, J.A., SUÁREZ, V.J., ALVARADO, M.C., CANDELA, J.L., URCIA, F.C. Epidemiological surveillance of nosocomial infections in a Pediatric Intensive Care Unit of a developing country. **BMC Pediatrics**, v. 10, n. 66, p. 1-9, 2010.

BEN ABDELJELIL, J., SAGHROUNI, S., NOURI, S., *et al.* Neonatal invasive candidiasis in Tunisian hospital: incidence, risk factors, distribution of species and antifungal susceptibility. **Mycoses**, v. 55, p. 6, p. 493-500, 2012.

BENJAMIN JR, D.K., GARGES, H., STEINBACH, W.J. *Candida* bloodstream infection in neonates. **Semin. Perinatol**, v. 27, p. 375-583, 2003.

BENJAMIN JR, D.K., STOLL, B.J., GANTZ, M.G. *et al.* Neonatal Candidiasis: Epidemiology, Risk Factors, and Clinical Judgment. **Pediatrics**, v. 126, n. 4, p. 865-873, 2010.

BERGAMASCO, M., GARNICA, M., COLOMBO, A., NUCCI, M. Epidemiology of candidemia in patients with hematological malignancies and solid tumours in Brazil. **Mycoses**, 2012.

BERTINI, A., DE BERNADIS, F., HENSGENS, L.A.M., SANDINI, S., SENESI, S., TAVANTI, A. Comparison of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* adhesive properties and pathogenicity. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 2, p. 98–103, 2013.

BICANIC, T.A., HARRISON, T.S. Systemic fungal infections. **Medicine**, v. 42, p.1, 2014.

BLYTH, C.C., CHEN, S.C., SLAVIN, M.A., SERENA, C., NGUYEN, Q., MARRIOTT, D., ELLIS, D., MEYER, W., SORREL, T.C. Australian Candidemia Study. Not just little adults: candidemia epidemiology, molecular characterization, and antifungal susceptibility in neonatal and pediatric patients. **Pediatrics**, v. 123, p. 1360–1368, 2009.

BONATTI, H., STELZMUELLER, I., BERGER, N., LECHNER, M., GRIF, K., GELTNER, C., MARGREITER, R., LASS-FLO, C. Infections Caused by *Candida krusei* in Five Transplant and Two Surgical Patients. **Surgical Infections**, v. 10, n. 3, p. 265-271, 2009.

BORGES, R.M., SOARES, L.R., BRITO, C.S., BRITO, D.V.D., ABDALLAH, V.O.S., FILHO P.P.G. Fatores de risco associados à colonização por *Candida* spp em neonatos internados em uma unidade de terapia intensiva neonatal brasileira. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v. 42, p. 431-435, 2009.

BORMANN, A.M., MORRISON, V.A. Review of the pharmacology and clinical studies of micafungin. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 3, p. 295-302, 2009.

BROWN, A.J.P., ODDS, F.C., GOW, N.A.R. Infection-related gene expression in *Candida albicans*. **Cur. Opinion in Microbiol.**, v. 10, p. 307–313, 2007.

CAHAN, H., Deville, J.G. Outcomes of Neonatal Candidiasis: The Impact of Delayed Initiation of Antifungal Therapy. *Int J Pediatr.* 2011: 813-871.

CALDERONI, R.A., FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiol**, v. 9, p. 327-35, 2001.

CANO, M.V., PERZ, J.F., CRAIG, A.S., et al. Candidemia in pediatric outpatients receiving home total parenteral nutrition. **Med. Mycol.**, v. 43, n. 3, p. 219-22, 2005.

CÁNTON, E., PEMÁN, J., QUINDÓS, G., et al. Epidemiology, Molecular Identification and Antifungal Susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* Isolated from Patients with Candidemia: Prospective Multicenter Study. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 55, n. 12, p. 5590-5596, 2011.

CARVALHO, H.G.F. Determinação da susceptibilidade aos fármacos antifúngicos de amostras do complexo de espécies de *Candida parapsilosis* isoladas de pacientes com fungemia. **Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Dissertação de mestrado**, 2012.

CASTRO, T.L., COUTINHO, H.D.M., GEDEON, C.C., SANTOS, J.M., SANTANA, W.J., SOUZA, L.B.S. Mecanismos de resistência da *Candida* sp wwa antifúngicos. **Infarm**, v. 18, p.30-36, 2006.

CELEBI, S., HACIMUSTAFAOGLU, M., KOKSAL, N., OZKAN, H., CETINKAYA, M., ENER, B. Neonatal candidiasis: results of an 8 year study. **Pediatr Int.**, v. 54, n. 3, p. 341-349, 2012.

CESARO, S., GIACCHINO, M., LOCATELLI, F., et al. Safety and efficacy of a caspofungin-based combination therapy for treatment of proven or probable aspergillosis in pediatric hematological patients. **BMC Infect Dis.**, v. 7, p. 28, 2007.

CHAPMAN, R.L. Prevention and Treatment of *Candida* Infections in Neonates. **Seminars in Perinatology**, v. 31, p. 39-46, 2007.

CHEN, S.C.A., SLAVIN,, M.A.; SORRELL, T.C. Echinocandin Antifungal Drugs in Fung Infections: A Comparison. **Drugs**, v. 71, n. 1, p. 11-41, 2011.

CLERIHEW, L., LAMAGNI, T.L., BROCKLEHURST, P., MCGUIRE, W. *Candida parapsilosis* infection in very low birthweight infants. **Arch Dis Child Fetal Neonatal**, v. 92, p. 127–129, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, 3rd ed. **CLSI document M27-A3**, Wayne, PA., 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: fourth informational supplement. **CLSI document M27-S4**. Wayne, PA., 2012.

COELLO R, CHARLETT A, WARD V *et al.* Device-related sources of bacteraemia in English hospitals-opportunities for the prevention of hospital acquired bacteraemia. *J Hosp Infect*; 53: 46–57, 2003.

COHEN-WOLKOWIEZ, M., MORAN, C., BENJAMIN, D.K., SMITH, P.B. Pediatric Antifungal Agents. **Curr Opin Infect Dis.**, v. 22, n. 6, p.553–558, 2009.

COHEN-WOLKOWIEZ, M., BENJAMIN, D.K. JR., PIPER, L., *et al.* Safety and pharmacokinetics of multiple-dose anidulafungin in infants and neonates. **Clin Pharmacol Ther.**, v. 89, n. 5, p.702–707, 2011.

COLOMBO, A.L., GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

COLOMBO, A.L., NUCCI, M. PARK, B.J, NOUÉR, S.A., ARTHINGTON-SKAGGS, B., MATTA, D.A., *et al.* Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 2816-2823, 2006.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Candiduria: a clinical and therapeutic approach. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 332-337, 2007.

CONDE-ROSA, A., AMADOR, R., PEREZ-TORRES, D., CÓLON, E., SÁNCHEZ-RIVERA, C., NIEVAS-PLAZA, M., *et al.* Candidemia distribution, associated risk factors, and attributed mortality at a university-based medical center. **P R Health.**, v. 29, n. 1, p. 26-29, 2010.

CORTÉS, L., RUSSI, N. A. Equinocandinas. **Rev. chil. Infectol**, v. 28, n. 6, p. 529-536, 2011.

COSTA, K.R.C. Aspectos fenotípicos e moleculares da adesão e atividade enzimática de *Candida* sp isolada de pacientes com sinais clínicos de candidíase oral. **Tese de Doutorado em Biociências Aplicada a Farmácia - USP Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**, 2009.

COSTA-DE-OLIVEIRA, S., PINA-VAZ, C., MENDONÇA, D., GONCALVES RODRIGUES, A. A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 27, p. 365–74, 2008.

COUTO, E.M.P., CARLOS, D., MACHADO, E.R. Candidíase em neonatos: uma revisão epidemiológica. **Ensaios e ciência**, v. 15, p. 197-213, 2011.

DE CAROLIS, E., HENSGENS, L.A.M., VELLA, A., POSTERARO, B., SANGUINETTI, M., SENESI, S., TAVANTI, A. Identification and typing of the *Candida parapsilosis* complex: MALDI-TOF MS vs. AFLP. **Medical Mycology**, v. 00:, p. 1–8, 2014.

DE HOOG, G.S., GUARRO, J., GENE, J., FIGUERAS, M.J. **Atlas of Clinical Fungi** (2<sup>nd</sup> edition). Holland: CBS; 215-216, 2000.

DE OLIVEIRA, L.F., JORGE, A.O., DOS SANTOS, S. S. *In vitro* minocycline activity on superinfecting microorganisms isolated from chronic periodontitis patients. **Braz Oral Res**, v. 20, p. 202–206, 2006.

DIEKEMA, D., ARBEFEVILLE, S., BOYKEN, L., KROEGER, J., PFALLER, M. The changing epidemiology of health-care associated candidemia over three decades. **Diagnostic Microbiology and Infectious disease**, v. 73, p. 45-48, 2012.

DISMUKES, W.E. Introduction to antifungal drugs. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 653-657, 2000.

DOBY, E.H., BENJAMIN, D.K. JR., BLASCHKE, A.J., *et al.* Therapeutic drug monitoring of voriconazole in children less than 3 years of age: a case report and summary of pharmacokinetic data for 10 children. **Pediatr Infect Dis J**, v. 31, n. 6, p. 632-635, 2010.

DOUGLAS, J.L. Candida biofilms and their role in infection. **Trends in Microbiol**, v. 11, p. 30-36, 2004.

ENGER, L., JOLY, S., PUJOL, C., SIMONSON, P., PFALLER, M. A. & SOLL, D. R. Cloning and characterization of a complex DNA fingerprinting probe for *Candida parapsilosis*. **J Clin Microbiol**, v. 39, p. 658–669, 2001.

FAROOQI, J.Q., JABEEN, K., SAEED, N., IQBAL, N., MALIK, B., LOCKHART, S.R., ZAFAR, A., BRANDT, M.E., HASAN, R. Invasive candidiasis in Pakistan: clinical characteristics, species distribution and antifungal susceptibility. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 259–268, 2013.

FAVALESSA, O.C., MARTINS, M.A., HAHN, R.C. Aspectos micológicos e suscetibilidade in vitro de leveduras do gênero *Candida* em pacientes HIV-positivos provenientes do Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 673-677, 2010.

FERNANDES, A.C.S, JUNIOR, F.C.S., OLIVEIRA S.M., CALICH, L. Prevalence of *Candida* species in umbilical catheters implanted in newborns in Natal, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 104 – 107, 2007.

FERREIRA, B.F.F., RAGAZZINI, L.J., ANDRADE, M.C. Investigação da Sensibilidade ao Fluconazol e Produção de Enzimas Hidrolíticas por *Candida* sp. Isoladas do Trato Respiratório de Pacientes Internados em um Hospital no Sul de Minas Gerais. **Rev Ciências Saúde**, v. 2, p. 1-9, 2012.

FILLER, S.G. *Candida* host cell receptor ligand interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 333-339, 2006.

FRANÇA, J.C.B. 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, 2006.

FRANÇA, J.C.B., RIBEIRO, C.E.L., QUEIROS-TELLES, F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, p. 23-28, 2008.

FRIDKIN, S.K., KAUFMAN, D., EDWARDS, J.R., SHETTY, S., HORAN, T. Changing incidence of *Candida* bloodstream infections among NICU patients in the United States: 1995–2004. **Pediatrics**, v. 117, p. 1680–1687, 2006.

GALÁN-LADERO, M.A., BLANCO-BLANCO, M.T., HURTADO, C., PÉREZ-GIRALDO, C., BLANCO, M.T., GÓMEZ-GARCÍA, C. Determination of biofilm production by *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients and its relation to cellular surface hydrophobicity, plastic adherence and filamentation ability. **Yeast**, v. 30, p. 331-339, 2013.

GARCIA-EFFRON, G., CANTON, E., PEMAÑ, J., DILGER, A., ROMA, E., PERLIN, D.S. Epidemiology and echinocandin susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu lato species isolated from bloodstream infections at a Spanish university hospital. **J Antimicrob Chemother.**, v. 67, p. 2739–2748, 2012.

GASPARETTO, A., NEGRI, M.F.N., DE PAULA, C.R., SVINSDZISKI, T.I.E. Produção de biofilme por leveduras isoladas de cavidade bucal de usuários de prótese dentária. **Acta Sci. Health Sci**, v. 27, n. 1, p. 37-40, 2005.

GE, Y.P., BOEKHOUT, T., ZHAN, P., LU, Z.X., SHEN, Y.M., LI, M., SHAO, H.F., LIU, W.D. Characterization of the *Candida parapsilosis* complex in East China: species distribution differs among cities. **Medical Mycology**, v 50, n. 1, p. 56-66, 2012.

GHANNOUM, M.A., CHEN, A., BUHARI, M., CHANDRA, J., MUKHERJEE, P.K., BAXA, D., GOLEMBIESKI, A., *et al.* Differential in vitro activity of anidulafungin, caspofungin and micafungin against *Candida parapsilosis* isolates recovered from a burn unit. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 274–279, 2009.



GIOLO, M.D., SVIDZINSKI, T.I.E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **J Bras Patol Med Lab**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GLOCKNER, A. Treatment and prophylaxis of invasive candidiasis with anidulafungin, caspofungin and micafungin: Review of the literature. **Eur. J. Med. Res.** v. 16, p. 167–179, 2011.

GODOY, P., TIRABOSCHI, I.N., SEVERO, L.C., BUSTAMANTE, B., CALVO, B., DA MATTA, D.A., COLOMBO, A.L. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 401-405, 2003.

GOEL, N., RANJAN, P.K., AGGARWAL, R., CHAUDHARY, U., SANJEEV, N. Emergence of Nonalbicans *Candida* in neonatal septicemia and antifungal susceptibility: Experience from a tertiary care center. **J Lab Physicians**, v. 1, p.53-55, 2009.

GOLD, N., STOUT, H.A., PAGANO, I.F.; DONOVICK, R. Amphotericin A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. *In vivo* studies. **Antibiot. Annu.**, v. 1955-1956, p. 579-586, 1956.

GOMEZ-LOPEZ, A., ALASTRUEY-IZQUIERDO, A., RODRIGUEZ, D., ALMIRANTE, B., PAHISSA, A., RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. Barcelona Candidemia Project Study Group. Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 52, n. 4, p. 1506–1509, 2008.

GONÇALVES, S.S., AMORIM, C.S., NUCCI, M., PADOVAN, A.C.B., BRIONES, M.R.S., MELO, A.S.A., COLOMBO, A.L. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of *C. parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. **Clin Microbiol Infect** 16 (in press), 2010.

GONDIM, B.A., BRITO, D.V.D., BRITO, C.S., DOLINGER, E.J.O.V., ABDALLAH, V.O.S., FILHO, P.P.G. Fatores de risco para colonização e sepse por *Candida albicans* e *Candida* não albicans em neonatos críticos. **Arquivo ciência saúde**, v. 16, n. 3, p. 105-109, 2009.

GREENBERG, R.G., BENJAMIN, D.K. JR, GANTZ, M.G. *et al.* Empiric Antifungal Therapy and Outcomes in Extremely Low Birth Weight Infants with Invasive Candidiasis. **J Pediatr.**, v. 161, n. 2, p. 264-269, 2012.

HAMMOUD, M.S, ALTAIR, A., FOUAD, M., RAINA, A., KHAN, Z. Persistent candidemia in neonatal care units: risk factors and clinical significance. **International Journal of infectious disease**, v. 17, p. 624-628, 2013.

HARRIOTT, M.M., LILLY, E.A., RODRIGUEZ, T.E., FIDEL, P.L., NOVERR, M.C. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. **Microbiology**, v. 156, p. 3635–3644, 2010.

HASAN, F. *et al.* Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. **Microbes infect.**, v. 1, p. 753-776, 2009.

HATANO, K., MORISHITA, Y., NAKAI, T., *et al.* Antifungal mechanism of FK463 against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 55, n. 2, p. 219–222, 2002.

HEALY, C.M., CAMPBELL, J.R., ZACCARIA, E., BAKER, C..J. Fluconazole Prophylaxis in Extremely Low Birth Weight Neonates Reduces Invasive Candidiasis Mortality Rates Without Emergence of Fluconazole-Resistant *Candida* Species. **Pediatrics**, v. 121, p. 703–7010, 2008.

HENRIQUES, M., AZEREDO, J., OLIVEIRA, R. *Candida* species adhesion to oral epithelium: factors involved and experimental methodology used. **Crit Rev Microbiol**, v. 32, p. 217–226, 2006.

HOPE, W.W., MICKIENE, D., PETRAITIS, V., *et al.* The pharmacokinetics and pharmacodynamics of micafungin in experimental hematogenous *Candida* meningoencephalitis: implications for echinocandin therapy in neonates. **J Infect Dis.**, v. 197, n. 1, p. 163–71, 2008.

INFANTE-LOPEZ, M.E., ROJO-CONEJO, P. Micafungin for the treatment of neonatal invasive candidiasis. **Rev Iberoam Micol**, v. 26, n. 1, p. 56–61, 2009.

JACOBSEN, D., WILSON, D., WÄCHTLER, B., BRUNKE, S., NAGLIK, JR., HUBE, B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target Ilse. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 10, p. 85-93, 2012.

JIN, Y., YIP, H.K., SAMARANAYAKE, Y.H., YAU, J.Y., SAMARANAYAKE, L.P. Biofilm-forming a ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. **J Clin Microbiol**, v. 41, p. 2961–2967, 2003.

JUYAL, D., ADEKHANDI, S., NEGI, V., SHARMA, N. An Outbreak of Neonatal Candidemia Due to Non-*albicans Candida* Species in a Resource Constrained Setting of Uttarakhand State, India. **Journal of Clinical Neonatology**, v. 2, n. 4, p. 182-186, 2013.

KALKANCI, A., DIZBAY, M., TURAN, O., FIDAN, I., YALÇIN, B., HIRFANOGLU, I., *et al.* Nosocomial transmission of *Candida pelliculosa* fungemia in a pediatric intensive care unit and review of the literature. **The Turkish Journal of Pediatrics**, v. 52, p. 42-49, 2010.

KANG, C.I., ROUSE, M.S., MANDREKAR, J.N., *et al.* Anidulafungin treatment of candidal central nervous system infection in a murine model. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 53, n. 8, p. 3576–8, 2009.

KATO, M., OZEKI, M., KIKUCHI, A., KANBE, T. Phylogenetic relationship and mode of evolution of yeast DNA topoisomerase II gene in the pathogenic *Candida* species. **Gene**, v. 272, p. 275–281, 2001.

KAUFMAN, D., BOYLE, R., HAZEN, K.C., PATRIE, J.T., ROBINSON, M., DONOWITZ, L.G. Fluconazole prophylaxis against fungal colonization and infection in preterm infants. **N Engl J Med.** v. 34, n. 23, p. 1660–1666, 2001.

KAUFMAN, D., BOYLE, R., HAZEN, K.C., PATRIE, J.T., ROBINSON, M., GROSSMAN, L.B. Twice weekly fluconazole prophylaxis for prevention of invasive *Candida* infection in high-risk infants of <1000 grams birth weight. **J Pediatr.**, v. 147, n. 2, p. 172–179, 2005.

KELLY, M.S., BENJAMIN, D.K., SMITH, P.B. The Epidemiology and Diagnosis of Invasive Candidiasis Among Premature Infants. **Clin Perinatol** (IN PRESS), 2014.

KHAN, Z.U., AL-SWEIH, N.A., AHMAD, S., AL-KAZEMI, N., KHAN, S., JOSEPH, L., CHANDY, R. Outbreak of fungemia among neonates caused by *Candida haemulonii* resistant to amphotericin B, itraconazole, and fluconazole. **J Clin Microbiol**, v. 45, p. 2025–2027, 2007.

KICKLIGHTER, S.D., SPRINGER, S.C., COX, T., HULSEY, T.C., TURNER, R.B. Fluconazole for prophylaxis against candidal rectal colonization in the very low birth weight infant. **Pediatrics.**, v. 107, n. 2, p. 293–298, 2001.

KIM, M.N., SHIN, J.H., SUNG, H., *et al.* *Candida haemulonii* and closely related species at five university hospitals in Korea: identification, antifungal susceptibility, and clinical features. **Clin Infect Dis.**, v. 48, p. 57–61, 2009.

KIM, S., KO, K.S., MOON, S.Y., LEE, M.S., LEE, M.Y., SON, J.S. Catheter related Candidemia Caused by *Candida haemulonii* in a Patient in Long-term Hospital Care. **Journal of Korean Medical Science**, v. 26, p. 297-300, 2011.

KOJIC, E.M. E DAROUICHE, R.O. *Candida* infections of medical devices. **Clin Microbiol Rev**, v. 17, n. 2, p. 255-67, 2004.

KRCMERY, V., HUTTOVA, M., MATEICKA, *et al.* Breakthrough fungaemia in neonates and infants caused by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* susceptible to fluconazole in vitro. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 48, p. 521-525, 2001.

KRIENGKAUYKIAT, J., ITO, J.I., DADWAL, S.S. Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections. **Clinical Epidemiology**, v. 3, p. 175–191, 2011.

KUHN, D.M.; CHANDRA, J.; MUKHERIEE, P.K.; GHANNOUM, M.A. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infect Immun**, v. 70, p. 878-888, 2002.

KUHN, D.M., VYAS, V.K. The *Candida glabrata* adhesin Epa1p causes adhesion, phagocytosis, and cytokine secretion by innate immune cells. **FEMS Yeast Research** v. 12, p. 398–414, 2012.

KULETA, J.K., KOZIK, M.R., KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Bioch. Pol.** v. 56, n. 2, p. 211-224, 2009.

KUMAR, C.P.G., MENON, T. Biofilm production by clinical isolates of *Candida* species. **Medical Mycology**, v. 44, p. 99–101, 2006.

KUZUCU, C., DURMAZ, R., OTLU, B., AKTAS, E., GULCAN, E., CIZMECI, Z. 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**, v. 31, p. 401-408, 2008.

LACAZ, C.S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C., HEINS-VACCARI, E.M., MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**, 9 ed., São Paulo, Sarvier, 2002.

LACROIX, C., GICQUEL, A., SENDID, B., MEYER, J., ACCOCEBERRY, I., FRANÇOIS, N. *et al.*, 2014. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species. **Clinical Microbiology and Infection.**, v. 20, n. 2, p. 153–158.

LAVARDE, V., DANIEL, F., SAEZ, H., ARNOLD, M., FAGUER, B. Peritonite mycosique a *Torulopsis haemulonii*. **Bul Soc Fr Mycol Med.**,v. 13, p.173-176, 1984.

LAI, C.C., WANG, C.Y., LIU, W.L., HUANG, Y.T., HSUEH, P.R. Time to positivity of blood cultures of different *Candida* species causing fungaemia. **J Med Microbiol**, v. 61, p. 701–704, 2012.

LEE, T.J.; CHUN, J.K.; KIM, D.S. Epidemiology of Candidemia in Neonates and Children: A Single Center Experience from 2001 to 2006. v. 39, n. 5, p. 248-254, 2007.

LEHMANN, P. F., LIN, D. M. & LASKER, B. A. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. **J Clin Microbiol**, v. 30, p. 3249–3254, 1992.

LEIBOVITZ, E. Strategies for the prevention of neonatal candidiasis. 2012. **Pediatrics and Neonatology**, v. 53, p. 83-89, 2012.

LEROY, O., GANGNEUX, J.P., MONTRAVERS, P., MIRA, J.P., GOUIN, F., SOLLET, J.P., CARLET, J., REYNES, J., ROSENHEIM, M., REGNIER, B., LORTHOLARY, O. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). **Critical Care Medicine**, v. 37, n. 5, p. 1612-1618, 2009.

LEUNG, A.Y., CHIM, C.S., HO, P.L., et al. *Candida tropicalis* fungemia in adult patients with haematological malignancies: clinical features and risk factors. **J. Hosp. Infect.**, v. 50, n. 4, p. 316-319, 2002.

- LI, X., YAN, Z., XU, J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 149:, p. 353–362, 2003.
- LIM, C.S.Y, ROSLI, R., SEOW, H.F., CHONG, P.P. Candida and invasive candidiasis: back to basics. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 1, p. 21–31, 2012.
- LIMA, E.M., ANDRADE, D., HAAS, J.V. Avaliação Prospectiva da Ocorrência de Infecção em Pacientes Críticos de Unidade de Terapia Intensiva. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, n. 3, 2007.
- LIMA-NETO, R.G., BELTRÃO, E.I.C., OLIVEIRA, P.C., NEVES, R.P. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. **Mycoses**, v. 54, n. 1, p. 23–29, 2011.
- LIMA-NETO, R.G., SANTOS, C., LIMA, N., SAMPAIO, P., PAIS, C., NEVES, R.P. Application of MALDI-TOF MS for requalification of *Candida* clinical isolates culture collection. **Braz J Microbiol** (IN PRESS), 2014.
- LYNCH, A.S., ROBERTSON, G.T. Bacterial and fungal biofilm infections. **Annu Rev Med**, v. 59, p. 415–428, 2008.
- LINDER, *et al.* Treatment of candidaemia in premature infants: comparison of three amphotericin B preparations. **J Antimicrob Chemother**, v. 52, p. 663-667, 2003.
- LOCKHART, S.R., MESSER, A.S., PFALLER, M.A., DIEKEMA, D.J. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly describe species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. **J Clin Microbiol.**, v. 46, n. 8, p. 2659-2664.
- LODDER, J. **The yeasts; a taxonomic study**. North-Holland Pub. Co. (Amsterdam), 1385p. 1970.
- LOTT, T. J., KUYKENDALL, R. J., WELBEL, S. F., PRAMANIK, A. & LASKER, B. A. Genomic heterogeneity in the yeast *Candida parapsilosis*. **Curr Genet**, v. 23, p. 463–467, 1993.
- LUCIGNANO, B., *et al.* Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 6, p. 2252- 2258, 2011.
- LYON, G.M., KARATELA, S., SUNAY, S., ADIRI, Y., Candida Surveillance Study Investigators. **J. Clin. Microbiol.** v. 48, n. 4, p. 1270-1275, 2010.
- MAERTENS, J.A., MADERO, L., REILLY, A.F., *et al.* A randomized, double-blind, multicenter study of caspofungin versus liposomal amphotericin B for empiric antifungal therapy in pediatric patients with persistent fever and neutropenia. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 29, n. 5, p. 415–420, 2010.

MALANI, A.N., PSARROS, G., MALANI, P.N., KAUFFMAN, C.A. 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>., 2010.

MANZONI, P., STOLFI, I., PUGNI, L., DECEMBRINO, L., MAGNANI, C., VETRANO, G., *et al.* A multicenter, randomized trial of prophylactic fluconazole in preterm neonates. **N Engl J Med.**, v. 14, n. 24, p. 2483–2495, 2007.

MANZONI, P., LEONESSA, M., GALLETTO, P., *et al.* Routine use of fluconazole prophylaxis in a neonatal intensive care unit does not select natively fluconazole-resistant *Candida* subspecies. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 27, n. 8, p.731–737, 2008.

MANZONI, P., MOSTERT, M., JACQZ-AIGRAIN, E., STRONATI, M., FARINA, D. *Candida* colonization in the nursery. **Jornal de pediatria**, v. 88, n. 3, p. 187-190, 2012.

MARGOTTO, P.R. **Novos antifúngicos**. Escola Superior de Ciências da Saúde (ESCS) Brasil, 15p. 2012.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **J. bras. pneumol.**, v. 32, n. 5, 2006.

MEDEIROS, E.A.S., LOTT, T.J., COLOMBO, A.L., GODOY, P., COUTINHO, A.P., BRAGA, M.S., *et al.* Evidence for a Pseudo-Outbreak of *Candida guilliermondii* Fungemia in a University Hospital in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 3, p. 942-947, 2007.

MENEZES, V.M., FARIAS VALE, I.N., MONTEIRO, S.G., GONÇALVES, L.H.B., FIGUEIREDO, P.M.S., MONTEIRO, C.A. Classificação da capacidade de adesão de isolados clínicos de *Candida* spp em padrões de arranjos celulares distintos. **Rev Patol Trop**, v. 42, n. 3, p. 289-300, 2013.

MIKULSKA, M., CALANDRA, T., SANGUINETTI, M., POULAIN, D., VISCOLI, C. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: Recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. **Crit. Care**, v. 14, p. R222, 2010.

MÍMICA, L.M.J., UEDA, S.M.Y., MARTINO, M.D.V., NAVARINI, A., MARTINI, I.J. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. **J Bras Patol Med Lab**, v. 45, n. 1, p. 17-23, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [Internet]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/070408.htm>. 2008.

MOKADDAS, E.M., RAMADAN, S.A., ABO EL MAATY, S.H., SANYAL, S.C. Candidemia in pediatric surgery patients. **Journal of chemotherapy**, v. 12, p. 332-338, 2000.

MONOD, M., BORG-VON, Z.M. Secreted aspartic proteases as virulence factors of *Candida* species. **Biol Chem**, v. 383, p. 1087–1093, 2002.

MORALES, D.K., JACOBS, N.J., RAJAMANI, S., KRISHNAMURTHY, M., CUBILLOS-RUIZ, J.R., HOGAN, D.A. Antifungal mechanisms by which a novel *Pseudomonas aeruginosa* phenazine toxin kills *Candida albicans* in biofilms. **Mol Microbiol**, v.78, p. 1379–1392, 2010.

MOREIRA, M.E.L., LOPES, J.M.A. CARALHO, M., orgs. **O recém-nascido de alto risco: teoria e prática do cuidar [online]**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 564 p. ISBN 85-7541-054-7, 2004.

MORENO, S.M.A., VERGANI, C.E., SANITÁ, P.V., GIAMPAOLO, E.T., MACHADO, A.L., PAVARINA, A.C. Avaliação da adesão de *Candida* spp em uma resina acrílica experimental. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 38, p. 89, 2009.

MURO, M.D., MOTTA, F.A., BURGUER, M., MELO, A.S.A., DALLA-COSTA, L.M. Echinocandin resistance in two *Candida haemulonii* isolates from pediatrics patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 50, n. 11, p. 3783, 2012

NEGRI, M., GONÇALVES, V., SILVA, S., HENRIQUES, M., AZEREDO, J., OLIVEIRA, R. Crystal violet staining to quantify *Candida* adhesion to epithelial cells. **British Journal of Biomedical Science**, v. 67, n. 3, p. 120-125, 2010.

NEGRI, M., BOTELHO, C., SILVA, S., LOPES, L.M.H., HENRIQUES, M., AZEREDO, J., OLIVEIRA, R. An *in vitro* evaluation of *Candida tropicalis* infectivity using human cell monolayers. **J Med Microbiol.**, v. 60, n. 9, p. 1270-1275, 2011.

NÉMETH, T., TÓTH, A., SZENZENSTEIN, J., HORVÁTH, P., NOSANCHUK, J.D., *et al.* Characterization of Virulence Properties in the *C. parapsilosis* *Sensu Lato* Species. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 68704, 2013.

NEU, N., MALIK, M., LUNDING, A., WHITTIER, S., ALBA, L., KUBIN, C., SAIMAN, L. Epidemiology of candidemia at a children's hospital, 2002 to 2006. **Pediatr Infect Dis J.** v. 28, p. 806–9, 2009.

NGUYEN, M.H., WISSEL, M.C., SHIELDS, R.K., SALOMONI, M.A., HAO, B., PRESS, E.G., SHIELDS, R.M., CHENG, S., MITSANI, D., VADNERKAR, A., *et al.* Performance of *Candida* real-time polymerase chain reaction, beta-D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. **Clin. Infect. Dis.** v. 54, p. 1240–1248, 2012.

NOSEK, J., TOMASKA, L., RYCOVSKA, A., FUKUHARA, H. Mitochondrial telomeres as molecular markers for identification of the opportunistic yeast pathogen *Candida parapsilosis*. **J Clin Microbiol**, v. 40, p. 1283–1289, 2002.

NUCCI, M., COLOMBO, A.L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary

care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, p. 77–82, 2007.

ODDS, F.C., BROWN, A.J., AND GOW, N.A. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends Microbiol**, v. 11, p. 272-279, 2003.

ODIO, C. M., ARAYA, R., PINTO, L.E. et al. Caspofungin therapy of neonates with invasive candidiasis. **Pediatr Infect Dis J**, v. 23, p. 1093– 1097, 2004.

OLIVEIRA, M.L.A., VERONESI, C.L., GOULART, L.S. Caracterização de recém-nascidos com hemoculturas positivas internados em unidade de terapia intensiva neonatal. **Revista Eletrônica Gestão & Saúde.**, v. 03, n. 2, p. 717-729, 2012.

PANACKAL, A.A., GRIBSKOV, J.L., STAAB, J.F., KIRBY, K.A., RINALDI, M., MARR, K.A. Clinical significance of azole antifungal drug cross-resistance in *Candida glabrata*. **J. Clin. Microbiol.** v. 44, p.1740–1743, 2006.

PANACKAL, A.A. Optimizing Containment and Control of *Candida parapsilosis* Fungemia among Neonates in the Outbreak Setting Using a Mathematical Modeling Approach. **Journal of mycology**, 2013.

PARAHITIYAWA, N.B., SAMARANAYAKE, Y.H., SAMARANAYAKE, L.P. et al. Interspecies variation in *Candida* biofilm formation studied using the Calgary biofilm device. **Apmis**, v. 114, p. 298–306, 2006.

PARAMYTHIOTOU, E., FRANTZESKAKI, F., FLEVARI, A., ARMAGANIDIS, A., DIMOPOULOS, G. Invasive Fungal Infections in the ICU: How to Approach, How to Treat. **Molecules**, v. 19, p. 1085-1119, 2014.

PEDROSO, C.P.A., KREBS, V.L.J. Complications of systemic candidiasis in NICU. **Revista de Ciências médicas biológicas**, v. 7, n. 3, p. 280 – 288, 2008.

PÉMAN, J., CÁNTON, E., LINARES-SICILIA, M.J. et al. Survey Patients: a Spanish Multicenter Prospective of Bloodstream Fungal Isolates in Pediatric Epidemiology and Antifungal Susceptibility. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, n. 12, p. 4158, 2011.

PFALLER, M.A., DIEKEMA, D.J., JONES, R.N., MESSER, S.A., HOLLIS, R.J. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 to 2000. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 852-856, 2002.

PFALLER, M.A., DIEKEMA, D.J. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 4419–4431, 2004.

PFALLER, M.A., DIEKEMA, D.J., RINALDI, M.G., BARNES, G., HU, B., VESELOV, A.V., et al. 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**, v. 43, n. 12, p. 5848-5859, 2005.

PFALLER, M.A., BOYKEN, L., HOLLIS, R.J., MESSER, S.A., TENDOLKAR, S. DIEKEMA, D.J. In Vitro Susceptibilities of *Candida* spp. to Caspofungin: Four Years of Global Surveillance. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 3, p. 760-763, 2011.

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

PFALLER, M.A., DIEKEMA, D.J., GIBBS, D.L., NEWELL, V.A., NG, K.P., COLOMBO, A.L., FINQUELIEVICH, J., BARNES, R., *et al.* Geographic and Temporal Trends in Isolation and Antifungal Susceptibility of *Candida parapsilosis*: a Global Assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 842-849, 2008.

PFALLER, M.A., MOET, G.J., MESSER, S.A., JONES, R.N., CASTANHEIRA, M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008–2009. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, p. 561–566, 2011.

PIRES, M.F.C., CORREA, B., GAMBALE, W., PAULA, C.R. Experimental model of *Candida albicans* (Serotypes A and B) adherence *in vitro*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 163-169, 2001.

PIRES, R.H., SILVA, J.F., MARTINS, C.H.G., ALMEIDA, A.M.F., SOARES, C.P., MENDE-GIANNINI, M.J.S. Effectiveness of disinfectants used in hemodialysis against both *Candida orthopsilosis* and *C. parapsilosis* sensu stricto biofilms. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 57, n. 5, p. 2417, 2013.

PORTE, L., LEÓN, P., GÁRATE, C., GUZMÁN, A.M., LABARCA, J., GARCÍA, P. Susceptibilidad a azoles y anfotericina B de aislados de *Candida* spp. Experiencia de una red de salud universitaria, entre 2004 y 2010. **Revista Chilena de Infectología**, v. 29, n. 2, p. 149-155, 2012.

PULCRANO, G., IULA, D.V., VOLLARO, A., TUCCI, A., CERULLO, M., ESPOSITO, M., *et al.* Rapid and reliable MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Candida* non-albicans isolates from bloodstream infections. **J Microbiol Methods**, v. 94, p. 262–266, 2013.

PUTIGNANI, L., DEL CHIERICO, F., ONORI, M., *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi. **Molecular BioSystems** Online publication, DOI: 10.1039/C0MB00138D, 2010.

RAMAGE, G.; VANDE-WALLE, K.; WICKES, B.L.; LOPEZ-RIBOT, J.L. Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. **J Clin Microbio**, v. 39, p. 3234-3240, 2001.

- RAMAGE, G., LÓPEZ-RIBOT, J.L. Techniques for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. **Methods Mol Med.**, v. 118, p. 71–79, 2005.
- RAMAGE, G., MARTINEZ, J.P., LOPEZ-RIBOT, J.L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. **Fems Yeast Research**, v. 6, p. 979–986, 2006.
- RAMAGE, G., RAJENDRAN, R., SHERRY, L., WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **Int J Microbiol**, 2012.
- RAO, M. S. S., SURENDERNATH, M. & SANDEEPTHI, M. Prevalence of neonatal candidemia in a tertiary care institution in Hyderabad, South India. **Int J Res Med Sci**, v. 2, n. 3, p. 1016-1019, 2014.
- REBOLI, C.M., ROTSTEIN, C., PAPPAS, P.G., CHAPMAN, S.W., KETT, D.H., KUMAR, D., *et al.* Anidulafungin versus Fluconazole for Invasive Candidiasis. **N Engl J Med.**, v. 356, p. 2472-82, 2007.
- REX, J.H.; WALSH, T.J.; SOBEL, J.D. Practice guidelines for the treatment of candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 662-678, 2000.
- RICHTMANN, R., TAKAGI, N.B., VALCILOTO, E., KUSANO, E., MARQUES, M.R.M., BALTIERI, S.R., ARRIERO, G.D., AMARO, E.R. Candidemia em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal: onde Estamos? **Revista da Sociedade Paulista de Infectologia**, v. 1, p. 5-9, 2005.
- ROILIDES, E., FARMAKI, E., EVDORIDOU, J., DOTIS, J., HATZIIONNIDIS, E., TSIVITANIDOU, M., *et al.* Neonatal candidiasis: analysis of epidemiology, drug susceptibility, and molecular typing of causative isolates. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 23, p. 745-750, 2004.
- ROILIDES, E. Invasive candidiasis in neonates and children. **Early Human Development**, v. 87, p. 75-76, 2011.
- ROY, B. E MEYER, S. A. Confirmation of the distinct genotype groups within the form species *Candida parapsilosis*. **J Clin Microbiol**, v. 36, p. 216–218, 1998.
- RUAN, S.Y., KUO, Y.W., HUANG, C.T., HSIUE, H.C., HSUEH, P.R. Infections due to *Candida haemulonii*: species identification, antifungal susceptibility and outcomes. **Int J Antimicrob Agents**, v. 35, p. 85-8, 2010.
- RUIZ, L.S., KHOURI, S., HAHN, R.C., SILVA, E.G., OLIVEIRA, V.K.P., GANDRA, R.F., PAULA, C.R. Candidemia by Species of the *Candida parapsilosis* Complex in Children's Hospital: Prevalence, Biofilm Production and Antifungal Susceptibility. **Mycopathologia**, v. 175, p.231–239, 2013.
- SABATELLI, F., PATEL, R., MANN, P.A. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 2009-2015, 2006.

SAIMAN, L. *et al.* Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 20, p. 1119-1124, 2001.

SAMARANAYAKE, Y.H., YE, J., YAU, J.Y.Y., CHEUNG, B.P.K., SAMARANAYAKE, L.P. In vitro method to study antifungal perfusion in *Candida* biofilms. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 818–825, 2005.

SANTANA, D.P., RIBEIRO, E.L., MENEZES, A.C.S., NAVEZ, P.L.F. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, v. 12, n. 2, p. 229-233, 2013.

SANTOLAYA, M.E., MATUTE, T.A., QUEIROZ-TELLES, F., COLOMBO, A.L., ZURITA, J., TIRABSCHI, I.N., *et al.* Recommendations for the management of candidemia in neonates in Latin America. **Rev Iberoam Micol.**, v. 30, n. 3, p. 158–170, 2013.

SASTRE, J.L., COTALLO, G.D.C., COLOMER, B.F. Neonatal Invasive Candidiasis in Spain. An epidemiological study from the “Grupo de Hospitales Castrillo”. **Early human development**, v. 85, p. 100, 2009.

SHARMAN, M., YADAV, S. APARNA, CHAUDHARY, U. *Candida* Blood Stream Infections In Neonates. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, p. 338-340, 2011.

SHIMA, H., MIHARU, M., OSUMI, T., *et al.* Differences in voriconazole trough plasma concentrations per oral dosages between children younger and older than 3 years of age. **Pediatr Blood Cancer**, v. 54, n. 7, p. 1050–1052, 2010.

SILVA, G.M., SILVEIRA, F.R.X., PIRES, M.F.C. Adherence to HeLa cells, typing by killer toxins and susceptibility to antifungal agents of *Candida dubliniensis* strains. **Braz Oral Res**, v. 21, n. 1, p. 87-91, 2007.

SILVA, S., HENRIQUES, M., MARTINS, A., OLIVEIRA, R., WILLIAMS, D., AZEREDO, J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. **Med Mycol**, v. 47, p. 681–689, 2009a.

SILVA, A.P., MIRANDA, I.M., LISBOA, C., PINA-VAZ, C., RODRIGUES, A.G. Prevalence, distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. **J Clin Microbiol**, v. 47, p. 2392–2397, 2009b.

SILVA, S., NEGRI, M., HENRIQUES, M., OLIVEIRA, R., WILLIAMS, D., AZEREDO, J. Silicone colonization by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine. **J Med Microbiol**, v. 59, p. 747-754, 2010.

SILVA, S., NEGRI, M., HENRIQUES, M., OLIVEIRA, R., WILLIAMS, D., AZEREDO, J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Trends Microbiol**, v. 19, p. 241-247, 2011.

SILVA, A.T.P. Infection by *Candida parapsilosis* multifactorial analysis of an emerging medical problem. Repositório aberto da Universidade do Porto. **Tese de doutorado**, 2012.

SILVA, C.M., CARVALHO-PARAHYM, A.M.R., LEÃO, M.P.C., OLIVEIRA, N.T., AMORIM, R.J.M., NEVES, R.P. Fungemia by *Candida pelliculosa* (*Pichia anomala*) in a Neonatal Intensive Care Unit: A Possible Clonal Origin. **Mycopathologia**, v. 175, p. 175-179, 2013.

SILVEIRA, R.C., PROCIANOY, R.S. Uma revisão atual sobre sepse neonatal. **Boletim científico de pediatria**, v. 1, p. 29-35, 2011.

SOARES, L.P.M.A., OLIVEIRA, L.T., CARNEIRO, I.C.R.S. Infecções da corrente sanguínea por *Candida* spp. em unidade neonatal de hospital de ensino da Região Norte do Brasil: estudo dos fatores de risco. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 4, n. 3, p. 19-24, 2013.

SOLL, D.R. *Candida* biofilms: is adhesion sexy? **Current Biology**, v. 18, p. 153-155, 2008.

SPILIOPOULOU, A., DIMITRIOU, G., JELASTOPULU, E., GIANNAKOPOULOS, I., ANASTASSIOU, E.D., CHRISTOFIDOU, M. **Mycopathologia**, v. 173, p. 219–228, 2012.

SPREGHINI, E., ORLANDO, F., TAVANTI, A., SENESI, S., GIANNINI, D., MANSO, E., BARCHIESI, F.. In vitro and in vivo effects of echinocandins against *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, p. 2195–2202, 2012

STEVENSON, D.K., VERTER, J., FANAROFF, A.A., OH, W., EHRENKRANZ, R.A., SHANKARAN, S., DONOVAN, E.F. Sex differences in outcomes of very low birthweight infants: the newborn male disadvantage. **Arch Dis Child Fetal Neonatal**, v. 83, p. 182–185, 2000.

STOLL, B.J., HANSSSEN, L., FANAROFF, A.A., WRIGHT, L.L., CARLO, W.A., EHRENKRANZ, R.A., LEMONS, J.A., *et al.* Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. **Pediatrics**, v. 110, p. 285-29, 2002.

STOLL B. J., GORDON T., KORONES S. B., SHANKARAN S., TYSON J. E., BAUER C. R., *et al.* Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. **J. Pediatr**, v. 129, p. 63–71, 1996.

STONE, J.A., HOLLAND, S.D., WICKERSHAM, P.J., *et al.* Single- and multiple-dose pharmacokinetics of caspofungin in healthy men. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 3, p.739–45, 2002.

SUNDSTROM, P., CUTLER, J.E., STAAB, J.F. Reevaluation of the role of *HWPI* in systemic candidiasis by use of *Candida albicans* strains with selectable marker *URA3* targeted to the *ENO1* locus. *Infect Immun* 70: 3281–3283.

TAMURA, N.K., NEGRI, M.F.N., BONASSOLI, L.A., SVIDZINSKI, T.I.E. Virulence factors for *Candida* spp recovered from intravascular catheters and hospital workers?. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, p. 91-93, 2007.

TAVANTI, A., DAVIDSON, A. D., GOW, N. A. R., MAIDEN, M. C. J., ODDS, F. C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To Replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 284-92, 2005.

TAVANTI, A., HENSGENS, L.A.M., GHELARDI, E., CAMPA. M., SENESI, S. Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. **J Clin Microbiol**, v. 45, p. 1455–1462, 2007.

TAVANTI, A., HENSGENS, L.A.M., MOGAVERO, S., MAJOROS, L., SENESI, S., CAMPA, M. Genotypic and phenotypic properties of *Candida parapsilosis* sensu strictu strains isolated from different geographic regions and body sites. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 203, 2010.

TAY, S.T., NA, S.L., CHONG, J. Molecular differentiation and antifungal susceptibilities of *Candida parapsilosis* isolated from patients with bloodstream infections. **J Med Microbiol**, v. 58, p. 185–191, 2009.

TESTONI, D., SMITH, P.B., BENJAMIN JR., D.K. The use of antifungal therapy in Neonatal Intensive Care. **Clin Perinatol.**, v. 39, n. 1, p. 83–98, 2012.

THEIN, Z.M., SAMARANAYAKE, Y.H., SAMARANAYAKE, L.P. *In vitro* biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. **Arch Oral Biol**, v. 52, p. 761–767, 2007.

TINOCO-ARAÚJO, J.E., ARAÚJO, D.F.G., BARBOSA, P.G., SANTOS, P.S.S., MEDEIROS, A.M.C. Candidíase invasiva e alterações bucais em recém-nascidos prematuros. **Einstein**, v. 11, n. 1, p. 71-75, 2012.

TOSUN, I., AKYUZ, Z., GULER, N.C., GULMEZ, D., BAYRAMOGLU, G., KAKLIKKAYA, N., ARIKAN-AKDAGLI, S., AYDIN, F. Distribution, virulence attributes and antifungal susceptibility patterns of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from clinical samples. **Medical Mycology**, v. 51, n. 5, p. 483-492, 2013.

TUMBARELLO, M., POSTERARO, B., TECARICHI, E.M., FIORI, B., ROSSI, M., PORTA, R., *et al.* Biofilm Production by *Candida* Species and Inadequate Antifungal Therapy as Predictors of Mortality for Patients with Candidemia. **J. Clin. Microbiol**, v. 45, n. 6, p. 1843-1850, 2007.

- TURAN, O., ERGNEKON, E., HIRFANOGLU, M., *et al.* Combination antifungal therapy with voriconazole for persistent candidemia in very low birth weight neonates. **The Turkish Journal of Pediatrics**, v. 53, p. 19-26, 2011.
- TRAGIANNIDIS, A., TSOULAS, C., KERL, K., GROLL, A.H. Invasive candidiasis: Update on current pharmacotherapy options and future perspectives. **Expert Opin. Pharmacother**, v. 14, p. 1515–1528, 2013.
- TRAGIANNIDIS, A., TSOULAS, C., GROLL, A.H. Invasive candidiasis and candidaemia in neonates and children: update on current guidelines. **Mycoses**, v. 58, n. 1, p. 10–21, 2015.
- TROFA, D., GACSER, A., NOSANCHUK, J.D. *Candida parapsilosis*; an emerging fungal pathogen. **Clin Microbiology Rev.**, v. 21, n. 4, p. 606-625, 2008.
- VEEN, S.Q., CLAAS, E.C.J., KUIJPER, E.J. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 900-907, 2010.
- VENDETTUOLI, V., TANA, M., TIRONE, C., POSTERARO, B., LA SORDA, M., FADDA, G., ROMAGNOLI, C., VENTO, G. The role of *Candida* surveillance cultures for identification of a preterm subpopulation at highest risk for invasive. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 27, p. 114-116, 2008.
- VERSTREPEN, K.J., KLIS, F.M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Mol Microbiol**, v. 60, p. 5–15, 2006.
- WALKER, L.A., GOW, N.A.; MUNRO, C.A. Fungal echinocandin resistance. **Fungal Genet Biol**, v. 47, p. 117-126, 2010.
- WALSH, T.J., KARLSSON, M.O., DRISCOLL, T. *et al.* Pharmacokinetics and safety of intravenous voriconazole in children after single- or multiple-dose administration, **Antimicrob Agent Chemother**, v. 48, p. 2166–2172, 2004.
- WALSH, T.J., ADAMSON, P.C., SEIBEL, N.L., *et al.* Pharmacokinetics, safety, and tolerability of caspofungin in children and adolescents. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 11, p. 4536–4545, 2005.
- WALSH, T.J., DRISCOLL, T., MILLIGAN, P.A., *et al.* Pharmacokinetics, safety, and tolerability of voriconazole in immunocompromised children. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 10, p. 4116–4123, 2010.
- WANG, M., TRAN, T., TRAN, V., PADILLA, L., LE, J. Case-control study of risk factors and outcomes associated with neonatal candidiasis. **Journal of Neonatal-Perinatal**, p. 39–43, 2011.
- WÄCHTLER, B., WILSON, D., HAEDICKE, K., DALLE, F., HUBE, B. From Attachment to Damage: Defined Genes of *Candida albicans* Mediate Adhesion,

Invasion and Damage during Interaction with Oral Epithelial Cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2: e17046. doi:10.1371/journal.pone.0017046, 2011.

WEINBERG, R.A. **A Biologia do Câncer**. Porto Alegre, Artmed, 2008.

WHITE, T.J., LEE, S., TAYLOR, J. **Amplification and direct sequence of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols, a guide to methods and applications**. Edited by Innis MA GD, Sninsky J, White TJ. New York, NY, EUA: Academic Press; 315-22, 1990.

WINGARD, J.R., LEATHER, H. A new era of antifungal therapy. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 10, p. 73-90, 2004.

WU, J., MU, D. Vascular catheter-related complications in newborns. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 48, p. 91–95, 2012.

XAVIER, P.C.N. CHANG, M.R. NUNES, M.O., PALHARES, D.B., SILVA, R.A.; BONFIM, G.F, et al. Neonatal candidemia in a public hospital in Mato Grosso do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 41, n. 5, p. 450-463, 2008.

XU, J.; RAMOS, A.R.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T.G. Clonal and spontaneous origins of fluconazole resistance in *Candida albicans*. **J Clin Microbiol**, v. 38, p. 1214–1220, 2000.

YAMADA, N., KUMADA, K., KISHINO, S., *et al.* Distribution of micafungin in the tissue fluids of patients with invasive fungal infections. **J Infect Chemother**. v. 17, n. 5, p. 731–4, 2011.

YAMAN, G., AKYAR, I., CAN, S. Evaluation of the MALDI TOF-MS method for identification of *Candida* strains isolated from blood cultures. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 1, p. 65–67, 2012.

YANNI, S.B., SMITH, P.B., BENJAMIN, D.K. JR. *et al.* Higher clearance of micafungin in neonates compared with adults: role of age-dependent micafungin serum binding. **Biopharm Drug Dispos.**, v. 32, n. 4, p. 222–32, 2011.

YU, Y., DU, L., YUAN, T., *et al.* Risk factors and clinical analysis for invasive fungal infection in neonatal intensive care unit patients. **Am J Perinatol**, v. 30, n. 7, p. 589–94, 2013.

ZAOUTIS T.E., FORAKER, E., MCGOWAN K.L., *et al.* Antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric patients: A survey of 4 children's hospitals. **Diag Microbiol Infect Dis**, v. 52, p. 295-298, 2005.

ZAOUTIS, T.E., JAFRI, H.S., HUANG, L.M., *et al.* A prospective, multicenter study of caspofungin for the treatment of documented *Candida* or *Aspergillus* infections in pediatric patients. **Pediatrics**, v. 123, n. 3, p. 877–884, 2009.

# APÊNDICES



## Formulário Epidemiológico

**Registro:**

**Data de nascimento:**

**Sexo:**

**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: \_\_\_\_\_

**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 ( )

**NEONATAL CANDIDEMIA CAUSED BY *CANDIDA HAEMULONII*:  
CASE REPORT AND REVIEW OF LITERATURE**

Carolina M. Silva<sup>1</sup>, Ana M.R. Carvalho-Parahym<sup>1</sup>, Danielle P.C. Macêdo<sup>1</sup>, Reginaldo G. Lima-Neto<sup>1</sup>, Elaine C. Francisco<sup>2</sup>, Analy S. A. Melo<sup>2</sup>, Maria da Conceição M. Silva<sup>3</sup>, Moacir B. Jucá<sup>3</sup>, Luciana R. B. Mello<sup>4</sup>, Rosemary M. J. Amorim<sup>1</sup> and Rejane P. Neves<sup>1\*</sup>.

Author affiliations: <sup>1</sup> Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil. <sup>2</sup>Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil. <sup>3</sup>Memorial Guararapes Hospital, Jaboatão dos Guararapes, Brazil. <sup>4</sup> Real Portuguese Hospital, Recife, Brazil.

**\*Artigo publicado - Mycopathologia, USA, 2015.**

**NEONATAL CANDIDEMIA CAUSED BY *CANDIDA HAEMULONII*:  
CASE REPORT AND REVIEW OF LITERATURE**

Carolina M. Silva<sup>1</sup>, Ana M.R. Carvalho-Parahym<sup>1</sup>, Danielle P.C. Macêdo<sup>1</sup>, Reginaldo G. Lima-Neto<sup>1</sup>, Elaine C. Francisco<sup>2</sup>, Analy S. A. Melo<sup>2</sup>, Maria da Conceição M. Silva<sup>3</sup>,  
Moacir B. Jucá<sup>3</sup>, Luciana R. B. Mello<sup>4</sup>, Rosemary M. J. Amorim<sup>1</sup> and Rejane P.  
Neves<sup>1\*</sup>.

Author affiliations: <sup>1</sup> Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil. <sup>2</sup>Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil. <sup>3</sup>Memorial Guararapes Hospital, Jaboatão dos Guararapes, Brazil. <sup>4</sup> Real Portuguese Hospital, Recife, Brazil.

**Neonatal candidemia by *Candida haemulonii***

**\*Corresponding author:**

Rejane P. Neves

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife/PE – Brazil.

Postal code: 50670-901

Phone number: +55 81 21268570

Fax: +55 81 21268480

E-mail address: rejadel@yahoo.com.br

## ABSTRACT

Candidemia is a frequent condition in Neonatal Intensive Care Units (NICU) and usually complicates the newborns clinical course. Several factors are responsible for candidiasis, such as prematurity and use of broad-spectrum antibiotics and in these cases there are the involvement of various *Candida* species, as *C. albicans* and *C. parapsilosis*. However, other species as *C. haemulonii* has been rarely described in candidemia cases, being considered an emergent pathogen. Thus, we report a case of neonatal candidemia by *C. haemulonii* and a review of literature of fungemia by this yeast. The patient was a neonate with gestational age of 26 weeks and birth weight of 660g hospitalized in a NICU from a Brazilian hospital. The identification of the etiological agent was performed by phenotypic methods, scanning electron microscopy, sequencing of the ITS region of rDNA and mass spectrometry. Antifungal susceptibility testing was carried out according to the Clinical Laboratories and Standards Institute guidelines. The newborn was diagnosed with candidemia by *C. haemulonii* resistant to amphotericin B with Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of 8 $\mu$ g/mL, sensitive to fluconazole (MIC: 8 $\mu$ g/mL) and voriconazole (MIC: 0.12 $\mu$ g/mL). The treatment with fluconazole (12mg/kg/day) was established with good outcome. Candidemia by *C. haemulonii* is still being limited to a few sporadic cases in adults with endemic and restricted occurrences in neonates. Usually the therapy with amphotericin B is ineffective against this species. Our results showed the importance of the mycological diagnosis associated to antifungigram for the successful clinical management followed by important epidemiological data.

**Keywords:** Candidemia; neonates; Neonatal Intensive Care Unit; emerging pathogen; antifungal sensibility; *Candida haemulonii*.

## INTRODUCTION

The incidence of hematogenous infections due to *Candida* species among neonates has increased significantly in recent decades, corresponding to the third micro-organism most frequently isolated from blood cultures in cases of neonatal sepsis [1]. This disease is also considered the second major cause of death reported by sepsis in the Neonatal Intensive Care Unit (NICU) [2].

Candidemia frequently complicates the clinical course of hospitalized preterm neonates, especially those who have some underlying disease or congenital malformation [3]. Several factors are responsible for the increasing occurrence of hematogenous candidiasis, such as survival of premature neonates and use of abrasive anticancer chemotherapy. Additionally, the long hospital stay in the NICU and low birth weight, as well as the use of broad spectrum antibiotics and invasive therapeutic devices, are associated with candidemia development [4, 5].

The mortality rate due to sepsis by *Candida* species is high, ranging from 25 to 54% of cases, and can reach 70% in very low birth weight newborns [6]. The main species involved in this infection are *C. albicans* and *C. parapsilosis*, and in less frequent cases *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, and *C. krusei* are associated.

Infections due to other species of the genus occur, but are still considered rare [7]. In this context, *C. haemulonii* appears as a candidemia emergent pathogen [8]. The related cases of hematogenous infection by *C. haemulonii* are less frequent in neonates than in adults, until now the only reported case was restricted to an outbreak in the Asian Continent [9].

On the other hand, the identification of this species is difficult because it has some morphologic and physiological characteristics that are very similar to *C. famata* (teleomorph *Debaryomyces hansenii*) and *C. guilliermondii* (teleomorph *Pichia*

*guilliermondii*), and often requires the use of molecular tools for taxonomic confirmation. Moreover, the *C. haemulonii* species complex has been recently described including five different species namely: *C. haemulonii*, *C. haemulonii* var *vulnera*, *C. duobushaemulonii*, *C. auris* and *C. pseudohaemulonii*. Molecular methods, such as ITS region sequencing and the MALDI-TOF techniques, should be used for species identification [10].

For the treatment of fungal invasive infections is commonly used amphotericin B and azole compounds, however *C. haemulonii* has been associated with resistance to this polyene [9, 11].

Considering the above, we report the first case of neonatal candidemia in Latin America by *C. haemulonii* resistant to amphotericin B in preterm infant.

## **CASE REPORT**

The research was conducted after the approval by the research ethics committee register CAAE0246.0.099.000-10.

A female neonate, born in November 2013, was admitted on the same birthday in the NICU from a public hospital of Recife-PE/Brazil. At that moment presented prematurity with gestational age of 26.6 weeks and extremely low birth weight (660g), additionally to a low APGAR index. The infant had respiratory distress syndrome and moderate hypoxia. Then umbilical catheterization and parenteral nutrition were instituted.

The antibiotic prophylaxis with penicillin associated with gentamicin was administered a day after admission during 15 days. Subsequently piperacillin-tazobactam with ampicillin was instituted for more 10 days. On the 26<sup>th</sup> day of hospitalization laboratorial exams showed thrombocytopenia (platelet count 57.000/mm<sup>3</sup>) and a high level of C-reactive protein (CRP) (3.16). Thus a blood culture was requested for

evaluation of a possible case of fungal infection and the use of prophylactic fluconazole with dosage of 6 mg/kg/day was initiated.

The blood samples were collected aseptically by arterial puncture in triplicate on three consecutive days and were sent to the Medical Mycology Laboratory at the Federal University of Pernambuco for diagnosis. The biological material was processed for direct examination (without clarifying or staining) and cultured in duplicate on the surface of Sabouraud Dextrose Agar (Difco) maintained at 30°C and 37°C for a period of 10 days. After the appearance of the colonies, these were purified and subsequently identified.

The identification of the etiologic agent was performed by macroscopic analysis (observation of edges, texture and coloration of the front and back of the colony, pigment production and growth time), microscopic analysis (observation of reproductive and somatic structures), physiological/biochemical characteristics (assimilation of carbon and nitrogen sources, fermentation of carbon sources and acetic acid production) [12] and automated identification method by the VITEK 2 ID-YST® (bioMérieux).

Also the strain was analyzed by Scanning Electron Microscopy to verify the architecture of colonies that were viewed in a FEI Quanta 200 Scanning Electron Microscope at 30kV.

The total genomic DNA of the isolate was extracted with the commercial kit PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems, USA). The ITS region of the rDNA was amplified and sequenced using ITS1 and ITS4 primers [13] on the automated ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, USA). The sequences were assembled and edited with the Sequencher DNA Sequence Assembly Software 4.1.4 (Gene Codes Corporation, EUA) and compared with sequences deposited in public genomic databases (GenBank, NCBI, USA and CBS database, The Netherlands).

The mass spectrometry analysis was carried on the MALDI-TOF Autoflex III Bruker Laser nd:yag smartbeam (Bruker Daltonics Inc., USA/Germany) and the resulting peak list were exported to the database of the MALDI Biotyper system, version 3.0 (Bruker Daltonics Inc., Bremen, Germany) for identification through specific protein profile [14].

Susceptibility tests were also performed according to the document M27-A3 from the Clinical and Laboratories Standards Institute (CLSI) [15]. The isolate were tested against amphotericin B (UnitedMedical), fluconazole (Pfizer) and voriconazole (Pfizer). The quality control was conducted including the test strain of *C. parapsilosis* ATCC 22019.

In the blood samples budding hyaline yeast cells were observed by direct examination and the cultures showed smooth colonies with tones of-white to cream after five days of growth.

The classical and the automated methods identified *C. haemulonii* as the etiologic agent. Scanning electron microscopy analyses were in accordance to *C. haemulonii* cultures description. The BLAST search of the ITS sequence on the genomic databases showed 100% of identity with the *C. haemulonii* species. The ITS sequence of this study was deposited at the GenBank database having the accession number KJ934715. Proteomic analysis identified also the species as *C. haemulonii* according to the MALDI Biotyper database.

The susceptibility antifungal tests showed that the isolate were resistant to amphotericin B with Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of 8 $\mu$ g/mL, and sensitive to fluconazole (MIC: 8 $\mu$ g/mL) and voriconazole (MIC: 0.12 $\mu$ g/mL).

Prior to diagnosis the patient were empirically treated with fluconazole at a dose of 6 mg/kg/day, however clinical resistance were observed. After susceptibility



antifungal testing therapy with fluconazole was maintained now at dosage of 12 mg/kg/day. At the 10<sup>th</sup> of fluconazole regimen another blood culture was realized without fungal growth however antifungal treatment follow for more nine days and the patient presented good outcome being considered cured.

## DISCUSSION

Several *Candida* species are involved in the etiology of neonatal candidiasis, and *C. albicans* is historically the most frequent isolate. However, *Candida non-Candida albicans* species, such as *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, and *C. glabrata* have showed a broad distribution and are clinically important. Therefore, new species such as *C. haemulonii*, have been recognized as potential pathogens, being described as emerging fungi. Candidemia caused by this yeast has rarely been described in humans, being limited to a few sporadic cases in adults and endemic and restricted occurrences in neonates with only one outbreak case in the Asian Continent [8, 9, 11, 16-21]. Here we present on Table 1 the scarce cases of *C. haemulonii* candidemia already reported in literature. Is possible to verify that this species is still emergent, though is probable that underdiagnosed cases occur. Thus is extremely important to indicate cases, especially in neonates, caused by this yeast.

In our case report the affected patient was a premature with low birth weight and prolonged stay in NICU. He made use of invasive medical devices as well as parenteral nutrition, and had been submitted to different regimens of broad-spectrum antibiotics. These data partially corroborate with other researchers which emphasize the use of invasive devices and broad-spectrum antibiotics as predisposing factors for candidemia especially by *C. haemulonii*, however differing to our case previous reports showed that this infection is more frequently associated with cancer patients [16, 19, 20]. Therefore

the pathogenic relation of this microorganism with premature newborns had not been described [21].

The pathogen obtained from blood cultures was strongly resistant to amphotericin B, although it was considered sensitive to fluconazole and voriconazole according to the document M27-A3 [15]. At the same time clinical resistance was verified in empirical administration of fluconazole at a dose of 6 mg/kg/day. The laboratorial results conducted the clinicians to maintain the treatment with the highest dose recommended (12 mg/kg/day) for neonates and therapeutic success was achieved.

According recent data presented in the CLSI supplement M27-S4 [22] guidelines; the MICs for azoles are considered species-specific, presenting variations. Actually there is not specific breakpoint for *C. haemulonii*, thus studies evaluating more and more antifungal agents for the candidemia control are needed.

Antifungal resistance is still the focus of attention in treatment of invasive fungal infection, and resistance to amphotericin B and azoles by *C. haemulonii* have been described in previous researches [9, 17]. However, when amphotericin B was empirically administered failed to eradicate candidemia by this yeast [9]. Clinical resistance to fluconazole was only reported in a study of a candidemia case in elderly patients [19].

In this context, the resistance of *C. haemulonii* represents a therapeutic challenge in the treatment of invasive candidiasis. Our patient was treated with fluconazole with good clinical response, but the therapeutic success was achieved only with high doses of the drug.

Considering the recent series of invasive infection by *C. haemulonii*, this species is an emergent yeast and the best strategy for management of the patient to eradicate the pathogen has not been completely elucidated. We emphasize that candidemia by this

yeast may affect newborns and requires, in some cases, additional clinical trials as molecular and proteomic tools, high clinical surveillance and antifungal susceptibility testing.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for funding. We acknowledge the Special Mycology Laboratory – EPM/UNIFESP, Brazil, for DNA sequencing and CETENE for scanning electronic microscopy analysis.

## REFERENCES

1. Hammoud MS, Altair A, Fouad M., Raina A, Khan Z. Persistent candidemia in neonatal care units: risk factors and clinical significance. *International Journal of infectious disease* 2013; 17: 624-8.
2. Panackal AA. Optimizing Containment and Control of *Candida parapsilosis* Fungemia among Neonates in the Outbreak Setting Using a Mathematical Modeling Approach. *Journal of mycology*. 2013; 2013: 11.
3. Blyth CC, Chen SC, Slavin MA, et al. Australian Candidemia Study. Not just little adults: candidemia epidemiology, molecular characterization, and antifungal susceptibility in neonatal and pediatric patients. *Pediatrics*. 2009;123:1360–8.
4. Arendrup MC, Fisher BT, Zaoutis TE. Invasive fungal infections in pediatrics and neonatal population: diagnostics and management issues. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2009; 15: 613–24.
5. Spiliopoulou A, Dimitriou G, Jelastopulu E, Giannakopoulos I, Anastassiou ED, Christofidou M. Neonatal Intensive Care Unit Candidemia: Epidemiology, Risk Factors, Outcome, and Critical Review of Published Case Series. *Mycopathologia* 2012; 173:219–28.
6. Pedroso CPA, Krebs VLJ. Complications of systemic candidiasis in NICU. *Revista de Ciências médicas biológicas* 2008; 7(3): 280 – 8.
7. Benjamin DK Jr, Stoll BJ, Fanaroff AA, et al. Neonatal candidiasis among extremely low birth weight infants: risk factors, mortality rates, and neurodevelopmental outcomes at 18 to 22 months. *Pediatrics* 2006; 117: 84–92.
8. Lavarde VF, Saez DH, Arnold M, Faguer B. Peritonite mycosique a *Torulopsis haemulonii*. *Bull. Soc. Fr. Mycol. Med.*1984; 13: 173-6.
9. Khan ZU, Al-Sweih NA, Ahmad S, Al-Kazemi N, Khan S, Joseph L, Chandy R. Outbreak of fungemia among neonates caused by *Candida haemulonii* resistant to amphotericin B, itraconazole, and fluconazole. *J Clin Microbiol* 2007; 45:2025–7.
10. Cendejas-Bueno E, Kolecka A, Alastruey-Izquierdo A, Theelen B, Groenewald M, Kostrzewa M, Cuenca-Estrella M, Gómez-López A, Boekhout T. Reclassification of the *Candida haemulonii* Complex as *Candida haemulonii* (*C. haemulonii* Group I), *C. duobushaemulonii* sp. nov. (*C. haemulonii* Group II), and *C. haemulonii* var. *vulnera* var. nov.: Three Multiresistant Human Pathogenic Yeasts. *Journal of Clinical Microbiology* 2012; 50:3641–51.
11. Kim S, Ko KS, Moon SY, Lee MS, Son JS. Catheter-related Candidemia Caused by *Candida haemulonii* in a Patient in Long-term Hospital Care. *J Korean Med Sci*. 2011; 26(2):297-300.

12. Barnett JA, Paine RW, Yarrow D. Yeasts: Characteristics and Identification. Cambridge University Press, Cambridge. 2000.
13. White TJ BT, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequence of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols, a guide to methods and applications. Edited by Innis MA GD, Sninsky J, White TJ. New York, NY, EUA: Academic Press; 1990:315-22.
14. Lima-Neto RG, Santos C, Lima N, Sampaio P, Pais C, Neves RP. Application of MALDI-TOF MS for requalification of *Candida* clinical isolates culture collection. Braz J Microbiol 2014; 45(2) xxx-xxx (in press).
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, 3rd ed. CLSI document M27-A3, Wayne, PA, 2008.
16. Marjolet M. *Torulopsis ernobii*, *Torulopsis haemulonii*: levures opportunistes chez l'immunode 'prime'? Bull. Soc. Fr. Mycol. Med. 1986; 15:143-6.
17. Rodero L, Cuenca-Estrella S, Cordoba P, et al. Transient fungemia caused by an amphotericin B-resistant isolate of *Candida haemulonii*. J. Clin. Microbiol. 2002; 40:2266-9.
18. Giusiano G, Mangiaterra M, Garcia Saito V, Rojas F, Gomez V, Diaz MC. Fluconazole and itraconazole resistance of yeasts isolated from the bloodstream and catheters of hospitalized pediatric patients. Chemotherapy 2006; 52:254-9.
19. Ruan SY, Kuo YW, Huang CT, Hsiue HC, Hsueh PR. Infections due to *Candida haemulonii*: species identification, antifungal susceptibility and outcomes. Int J Antimicrob Agents 2010; 35:85-8.
20. Almeida Jr JN, Motta AL, Rossi F, et al. First report of a clinical isolate of *Candida haemulonii* in Brazil. Clinics 2012; 67(10):1229-31.
21. Muro MD, Motta FA, Burguer M, Melo ASA, Dalla-Costa LM. Echinocandin resistance in two *Candida haemulonii* isolates from pediatrics patients. J. Clin. Microbiol. 2012; 50(11):3783.
22. CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: fourth informational supplement. CLSI document M27-S4. Wayne, PA, 2012.

**Table 1.** Cases of candidemia in humans caused by *Candida haemulonii* reported in the literature

Year/ Reference	Country	Age/ Gender	Underlying condition	Treatment	Clinical evolution
1984/ [8]	NS	26/ NS	Chronic renal insufficiency	Amphotericin B/ Fluocytosin	Death
1986/ [16]	France	NS	Cancer	NS	NS
2002/ [17]	Argentina	83/M	Megaloblastic anemia	None	Clinical improvement
2006/ [18]	Argentina	NS	Cancer	NS	NS
2007/ [9]	Kuwait	35 weeks/ M	Prematurity	Amphotericin B	Ineffective therapy
		26 weeks/ M	Prematurity	Fluconazole	Clinical improvement
		25 weeks/ F	Prematurity	Amphotericin B	Ineffective therapy
2010/ [19]	NS	85/M	Retal caner	Fluconazole	Ineffective therapy
		79/M	Pneumonia	Fluconazole	Clinical improvement
2011/ [11]	NS	67/M	Neurological disorder	Caspofungin	Clinical improvement
2012/ [21]	Brazil	26/ F	Ovarian cancer	None	Death
2012 [22]	Brazil	01/F	Down syndrome	Amphotericin B/ fluconazole	Clinical improvement
		09/F	Ewing sarcoma	Amphotericin B	Clinical improvement
		16/F	Acute Myeloid Leukemia	None	Clinical improvement

NS: Not Specified/ M: Male/ F: Female

# **ANEXOS**

### DECLARAÇÃO

Declaro que o projeto de pesquisa nº 2082 - 11 intitulado "**Infeções fúngicas Invasivas em Neonatos, Epidemiologia e Perfil de Susceptibilidade Antifúngica dos agentes Etiológicos**". apresentado pelo pesquisador (a) **Carolina Maria da Silva** foi **APROVADO AD REFERENDUM** pelo Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP, em 02 de junho de 2011

Recife, 06 de junho de 2011.



**Dr. José Eulálio Cabral Filho**  
Coordenador do Comitê de Ética  
em Pesquisa em Seres Humanos do  
Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP)

---