GEORGEA CARLA MATUURA DE BATISTA

PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DE LEVEDURAS ISOLADAS DA CAVIDADE ORAL, SANGUE E CATETER DE NEONATOS INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL DE HOSPITAL TERCIÁRIO DE SÃO PAULO

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2009

GEORGEA CARLA MATUURA DE BATISTA

PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DE LEVEDURAS ISOLADAS DA CAVIDADE ORAL, SANGUE E CATETER DE NEONATOS INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL DE HOSPITAL TERCIÁRIO DE SÃO PAULO

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Claudete Rodrigues Paula

São Paulo

2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Batista, Georgea Carla Matuura.

Perfil fenotípico e genotípico de leveduras isoladas da cavidade oral, sangue e cateter internados em unidade de terapia intensiva neonatal de Hospital Terciário de São Paulo / Georgea Carla Matuura Batista. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Claudete Rodrigues Paula.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Leveduras patogênicas.

Versão do título para o inglês: Phenotipic and genotypic profile of yeasts isolated from oral cavity, blood and catheter of neonates in neonatal intensive care unit of a public hospital in São Paulo, Brazil.

Descritores: 1. Infecção hospitalar 2. Candida 3. Candidiase 4. Neonatologia 5. Infecção fungica 6. UTIN - Unidade Terapia Intensiva Neonatal I. Paula, Claudete Rodrigues II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0169/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Georgea Carla Matuura Batista.
Título da Tese:	Perfil fenotípico e genotípico de leveduras isoladas da cavidade oral, sangue e cateter internados em unidade de terapia intensiva neonatal de Hospital Terciário de São Paulo.
Orientador(a):	Claudete Rodrigues Paula.
	ulgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão ca realizada a/, considerou () Aprovado(a) () Reprovado(a)
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:

DEUS

Passei tanto tempo Te procurando. Não sabia onde estavas, olhava para o infinito e não Te via. E pensava comigo mesmo: será que Tu existes??

Não me contentava com a busca e prosseguia, Tentava Te encontrar nas religiões e nos templos. Tu também não estavas.

> Te busquei através dos sacerdotes e pastores. Também não te encontrei.

Senti-me só, vazio, desesperado e descri. E na descrença Te ofendi, E na ofensa tropecei, E no tropeço caí, E na queda senti-me fraco.

Fraco procurei socorro No socorro encontrei amigos Nos amigos encontrei carinho No carinho eu vi nascer o amor Com amor eu vi um mundo novo.

E no mundo novo resolvi viver... O que recebi, resolvi doar. Doando alguma coisa muito recebi E em recebendo senti-me feliz.

E ao ser feliz, encontrei a paz E tendo a paz foi que enxerguei Que dentro de mim é que Tu estavas E sem procurar-te foi que Te encontrei.

(Caminhos de Luz)

AOS MEUS PAIS

pela paciência com os meus tropeços, pelo incentivo, apoio, carinho e amor...

Tudo que sou devo à vocês

Obrigada por confiarem em mim

ÀS MINHAS IRMÃS

Figuraças!!! pelo carinho, amor e pelas grandiosas risadas!!!

À MINHA FILHINHA QUERIDA

Pelo seu grande amor e compreensão

Obrigada, filhinha, pela oportunidade de crescer e aprender contigo.

Mamãe te ama muito!!!

"Existe uma única estrada e somente uma, e essa é a estrada que eu amo. Eu a escolhi. Quando trilho nessa estrada as esperanças brotam, e, o sorriso se abre em meu rosto. Dessa estrada nunca, jamais fugirei"

(Daisaku Ikeda)

AGRADEÇO

AOS PEQUENINOS DA UTI NEONATAL

Àqueles que passaram rapidamente pela Terra

Àqueles que continuam sua jornada por aqui

O meu muito obrigada pela contribuição

Que suas missões sejam protegidas por Deus onde quer que estejam

"A todos os que sofrem e estão sós, dai sempre um sorriso de alegria. Não lhes proporciones apenas os vossos cuidados, mas também o vosso coração"

Madre Tereza de Calcutá

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Minha querida e doce orientadora

Claudete Rodrigues Paula

Que desde o príncipio me recebeu de braços abertos

Pelo seu grande carinho e disponibilidade

Pela sua atenção e confiança

Pela sua imensa paciência sempre me incentivando não só como minha orientadora mas como amiga.

Obrigada por me mostrar que um grande orientador pode e deve ser um grande professor da vida, ensinando também como ser humilde, generoso mostrando sempre o respeito ao próximo.

Te admiro pela sua contribuição na ciência e na área acadêmica e principalmente, pela pessoa humana e maravilhosa que és.

Obrigada!

"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis". (Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo e especialmente ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas II pela oportunidade de realização do trabalho.

Ao Berçário Anexo à Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, USP pela oportunidade em coletar amostras.

À Dra Vera Lúcia Krebs, médica responsável da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) e colaboradora da pesquisa, sempre atenciosa, paciente e dedicada ao trabalho.

À Dra Maria Augusta Cicaroni Gibelli, médica daUTIN e participante do trabalho, sempre atenciosa, me ajudando muito com as coletas.

Às enfermeiras da UTIN que sempre me receberam com muito carinho.

Aos professores do ICB pelo convívio e amizade especialmente aos Professores Flávio Althertum, Valderez Gambale e Irma Riviera.

Aos funcionários da esterilização Zé e Elza pelos serviços prestados, sempre me recebendo com grande carinho e sorriso.

Às secretárias Naíde, Aninha pelos serviços prestados e todo o carinho.

À Alice pela imensa atenção com os assuntos da pós, sempre com muita disposição e paciência; e principalmente pelas palavras carinhosas de apoio, incentivo e amizade.

À Shirlei pelos seus ensinamentos, sempre tirando minhas dúvidas de ordem técnica e pela sua imensa atenção, carinho e amizade.

Ao pessoal da biblioteca pela atenção e esclarecimentos para elaboração da tese.

Ao Celso pelos serviços prestados sempre atencioso.

À Maria do Carmo da Comissão de ética sempre paciente e atenciosa.

Ao Flávio Viani pela paciência e colaboração com a estatística.

Ao Ériques especialmente pelo último ano na qual me ajudou muito, não só como um colega de trabalho, mas como uma amigo.

À Satiko por toda a atenção e carinho, sempre me ajudando nos assuntos da pós.

Ao John Norman pela tradução do resumo.

Ao CNPQ e a FAPESP pelo apoio financeiro concedido para a realização da pesquisa.

Aos meus queridos amigos,

Flávinha, Luciana, Marcos, Ériques, Débora, Karina, Adriana, Mauro, Cristiane, Shirlei, Alice, Mônica, Elza, Fernanda, Fabiana, Sandra, Silvana, Vanessa, Bruno, Carol, Karin, Danilo, Victor, Gláucia, Cássia, Márcia, Selminha, Mel, Satiko, Ronaldo, Carlos, Flávio, Gislaine... que sempre estiveram dispostos a me ajudar, esclarescendo dúvidas, sendo companheiros desta parte da minha jornada, compartilhando de minhas alegrias e incertezas... independente dos rumos dos nossos caminhos, levo-os comigo, dentro do coração... obrigada!

"Nós somos, cada um de nós, anjos com apenas uma asa e somente poderemos voar abraçando uns aos outros".

Luciano de Crescenzo

Depois de plantada a semente deste incrível arbusto, não se vê nada por aproximadamente cinco anos, exceto um lento desabrochar de um diminuto broto a partir do bulbo. Durante cinco anos, todo o crescimento é subterrâneo, invisível a olho nu, mas uma maciça e fibrosa estrutura de raiz que se estende vertical e horizontalmente pela terra está sendo construída. Então, no final do 5º ano, o bambu chinês cresce até atingir a altura de vinte e cinco metros.

RESUMO

BATISTA, G.C.M. Perfil fenotípico e genotípico de leveduras isoladas da cavidade oral, sangue e cateter de neonatos internados em unidade de terapia intensiva neonatal de hospital terciário de São Paulo. 2009. 108 f. Tese (Doutorado em Ciências) — Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Nesta pesquisa isolamos e identificamos as leveduras da mucosa oral, provenientes de cateter e de sangue de neonatos de alto risco internados na UTIN (Unidade de Terapia Intensiva Neonatal) de hospital terciário de São Paulo, por período de 9 meses. Foram coletadas 282 amostras da mucosa oral, 12 de sangue e 6 de cateter no período em estudo. As leveduras também foram avaliadas quanto ao perfil de exoenzimas (proteinase e fosfolipase) e sensibilidade aos antifúngicos pela técnica do Etest. As amostras também foram avaliadas quanto ao perfil molecular por meio da técnica de eletroforese em campo pulsátil (PFGE). Dos 125 neonatos internados, 23 (18,4%) apresentaram leveduras na mucosa oral, sangue e cateter. Dos 23 neonatos, obtivemos 54 amostras de leveduras, sendo 36 (66,7%) isoladas da colonização oral; 12 (22,2%) de sangue, seis (11,1%) de cateter. C. albicans foi a mais frequente dentre as amostras isoladas da mucosa oral e sepse. C. parapsilosis foi a mais isolada dentre as amostras de cateter. Todas as aos antifúngicos amostras foram consideradas sensíveis (fluconazol. voriconazol, itraconazol, cetoconazol, anfotericina B e caspofungina). As amostras de colonização oral, cateter e sangue apresentaram atividade de pelo menos uma exoenzima. Dentre os 12 casos de sepse, 83,4% (10/12) foram causadas por espécies de Candida, sendo que, destas 10 candidemias, 60% (6/10) estiveram associadas com colonização oral prévia pela mesma espécie e perfil genotípico. O PFGE tipo V foi predominante em C. albicans e neonatos colonizados com este perfil apresentaram maior probabilidade em desenvolver A mortalidade devido a infecção sistêmica (septicemia) por leveduras,no período do estudo, foi de 91.6% e a mortalidade devido somente às espécies de Candida, foi de 83,4%. Ressaltamos que C. albicans causou infecção fúngica sistêmica com prévia colonização oral. C. parapsilosis ocasionou maiores casos de septicemia provenientes do cateter.

Palavras chave: *Candida* sp. Neonatos. Perfil Molecular. Colonização. Fungemia.

ABSTRACT

BATISTA, G.C.M. Phenotypic and genotypic profile of yeasts isolated from the oral cavity, blood and catheter of neonates in a neonatal intensive care unit of a public hospital in São Paulo, Brazil. 2009. 108 p. Thesis (Doctorate in Sciences) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

This study was aimed to identify yeasts isolated from the oral mucosa, catheter and blood of high-risk neonates in an NICU (neonatal intensive care unit) in a public hospital in São Paulo, Brazil, over a period of 9 months. During the period of the study, 282 samples were collected from the oral mucosa, 12 from the blood, and 6 from the catheter. The yeasts were also evaluated in regard to the profile of their exoenzymes (proteinase and phospholipase), while their susceptibility to antifungal agents was measured by Etest. The molecular profile of the samples was moreover evaluated by means of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Of the 125 neonates studied, 23 (18.4%) presented yeast in their oral mucosa, blood, or catheter. From these 23 neonates, 54 samples of yeast were obtained; 36 (63.7%) from oral colonization, 12 (22.2%) from the blood, and 6 (11.1%) from the catheter. The most frequently encountered species among the samples isolated from the oral mucosa and blood was C. albicans; while C. parapsilosis was the species found most frequently among the samples obtained from catheters. All the samples were considered susceptible to antifungal agents (fluconazole, voriconazole, itraconazole, ketoconazole, amphotericine B and caspofungin). The samples from oral colonization, blood and catheters presented activity of at least one exoenzyme. Among the 12 cases of sepsis, 10 (83.4%) were caused by species of Candida, and of these 10 cases, 6 (60%) were associated with previous oral colonization by the same species and genotypic profile. PFGE type V was predominant in C. albicans, and neonates colonized by this profile were more likely to develop systemic infection (septicemia). In the period of this study, the mortality rate due to septicemia by yeasts was 91.6%, and the mortality rate due specifically to species of Candida was 83.4%. It should be noted that while C. albicans caused septicemia with previous oral colonization, this was not true of C. parapsilosis, which caused the most cases of septicemia without previous oral colonization, but with catheter samples positive for this yeast.

Key words: Candida sp. Neonates. Molecular profile. Colonization. Fungemia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Frequência (%) das espécies de leveduras isoladas do sangue e cateter de neonatos internados na UTIN do Hospital Terciário de São Paulo . 53
Figura 2 - Distribuição dos neonatos internados na UTIN do Hospital Terciário de São Paulo com relação a colonização oral e a sepse
Figura 3 - Comparativo entre presença de candidemia e evolução para o óbito Análise estatística realizada segundo o teste exato de Fisher (p<0,05)
Figura 4 - Comparativo entre colonização oral e fungemia. Análise estatística realizada segundo o teste exato de Fisher (p<0,05). Col.: colonização55
Figura 5 - Distribuição numérica das sepses e evolução para óbito de acordo com o peso dos 23 neonatos internados na UTIN do Hospital Terciário de São Paulo
Figura 6 - Comparativo entre a presença de <i>C. albicans</i> PFGE tipo V e sepse Análise estatística realizada segundo o teste exato de Fisher (p<0,05). CO V colonização por PFGE tipo V de <i>C. albicans</i> ; não V: colonização por demais PFGE tipos
Figura 7 - Comparativo entre a fungemia por <i>C. albicans</i> PFGE tipo V e evolução para óbito. Análise estatística realizada segundo o teste exato de Fisher (p<0,05). Fung CA V: Fungemia por <i>C. albicans</i> PFGE tipo V. Fungemia CAV-: fungemia por demais PFGE tipos
Figura 8 - Comparativo entre a fungemia por <i>C. parapsilosis</i> PFGE tipo XI e evolução para óbito. Análise estatística realizada segundo o teste exato de Fisher (p<0,05). Fung CP IX: fungemia por <i>C. parapsilosis</i> PFGE tipo IX Fungemia CP IX- : outros tipos de PFGE tipo de <i>C. parapsilosis</i>

Figura - 9 - PFGE tipo I das amostras de Candida albicans isoladas de um
único neonato - P17. Linha 1: Padrão de peso molecular de Saccharomyes
cerevisae (Bio Rad); Linhas 2 a 7: correspondem aos perfis genotípicos -
PFGE tipo I das amostras isoladas da cavidade oral ; Linha 8: corresponde ao
perfil genotípico da amostra isolada do sangue61
Figura 10 - PFGE tipo VIII das amostras de C. parapsilosis isoladas de um
único neonato P3. Linha 1: Padrão de peso molecular S. cerevisae; Linha 2:
amostra proveniente da hemocultura; Linha 3: amostra proveniente do cateter;
Linha 4:amostra proveniente da cavidade oral
Figura 11 - PFGE -tipos das amostras de C. parapsilosis isoladas dos
neonatos. 1.Perfil molecular de S. cerevisae; 2. PFGE tipo VIII da amostra
isolada do cateter de P3; 3. PFGE tipo VII da amostra isolada da cavidade oral
de P4; 4. PFGE tipo VIII da amostra isolada de sangue de P3; 5 : PFGE tipo IX
da amostras isolada de cateter; 6 : PFGE tipo IX da amostras isolada de
sangue de P15; 7: PFGE tipo IX da amostra isoladas de cateter de P23; 8:
PFGE tipo IX da amostra isoladas de sangue de P2363
Figura 12 - PFGE tipos de C. albicans. P: Padrão de peso molecular de
Saccharomyces cerevisae; linhas 1, 3, 4, 7: PFGE tipo V dos neonatos P4,
P5,P7 e P11; linha 2: PFGE tipo VI do neonato P14; linhas 5 e 6: PFGE tipo
VI dos neonatos P2264

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Interpretação do comportamento de cepas de Candida sp.
Segundo normas do CLSI (M27A2 - 2002), frente a concentração dos
antifúngicos (µL/mL)44
TABELA 2 - Identificação das espécies de leveduras isoladas de colonização
oral, sangue e cateter, PFGE tipos e óbitos dos neonatos internados na UTIN
de Hospital Terciário de São Paulo
TABELA 3 - Distribuição dos PFGE-tipos dentre as amostras de Candida
isoladas de neonatos internados na UTIN do Hospital Terciário, São Paulo 57
TABELA 4 - Atividade de proteinase e fosfolipase presente nas amostras
leveduriformes isoladas dos neonatos hospitalizados na UCIN, Hospital
Terciário, São Paulo65
TABELA 5 - Sensibilidade antifúngica das espécies de Candida spp isoladas
dos neonatos internados em UTIN do Hospital Terciário, São Paulo67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DP- DESVIO PADRÃO

FC - FREQUÊNCIA CARDÍACA

RN - RECÉM-NASCIDO

PCR – PROTEÍNA C REATIVA

FR – FREQUÊNCIA RESPIRATÓRIA

IG - IDADE GESTACIONAL

FMUSP – FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

HC - HOSPITAL DAS CLÍNICAS

UTIN – UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL

CO - CAVIDADE ORAL

SG - SANGUE

CAT - CATETER

g – GRAMAS

CCIH – CENTRO DE CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR

RR-RISCO RELATIVO

LISTA DE SÍMBOLOS

g - gramas

% - porcentagem

> - maior que

< - menor que

MG/L - miligrama por litro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Local de estudo	39
3.2 Pacientes	39
3.2.1 Critérios de inclusão	39
3.2.2 Critérios de exclusão	40
3.2.3 Definições	40
3.2.3.1 Definição de Síndrome da Resposta Inflamatória sistêmica	40
3.2.3.2 Definição de Sepse Fúngica	40
3.3 Coletas e Semeaduras	40
3.4 Processamento e Identificação das amostras	41
3.5 Fatores relacionados à virulência das leveduras	42
3.5.1 Pesquisa de proteinase	42
3.5.2 Pesquisa de fosfolipase	42
3.6 Teste de sensibilidade aos antifúngicos	42
3.6.1 Processamento do teste	43
3.6.2 Interpretação dos resultados	43
3.7 Técnicas para diferenciação de <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i>	44
3.7.1 Testes fenotípicos	44
3.7.2 Testes genotípicos	45
3.7.2.1 Extração do DNA das amostras de leveduras para diferencia	ção
molecular entre <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i>	45
3.7.2.2 Visualização do DNA extraído	46
3.7.2.3 Reação de PCR	46
3.8 Perfis genéticos das amostras de leveduras	47
3.8.1 Cariotipagem- Eletroforese em campo pulsátil (PFGE)	47
3.9 Análise estatística	48
4 RESULTADOS	50
4.1 Colonização oral	50
4.2 Sangue	50

4.3 Cateter	51
4.4 Associação entre colonização oral e sepse	51
4.5 Associação entre o cateter colonizado e sepse	51
4.6 Óbitos dos neonatos	54
4.7 Associação entre colonização oral, sepse e óbito	54
4.8 Frequência das espécies de leveduras associadas à seps	e e que
evoluíram para óbito	55
4.9 Peso de nascimento do neonato, sepse e óbito	55
4.10 Diferenciação entre <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i>	56
4.11 Cariotipagem (eletroforese em campo pulsátil - PFGE) das a	mostras
de Candida	57
4.11.1 PFGE tipos	57
4.11.2 Colonização oral	58
4.11.3 Sepse	58
4.11.4 Cateter	58
4.11.5 Associações moleculares	58
4.12 Verificação da atividade enzimática – proteinase e fosfolipaso	e 64
4.13 Sensibilidade às drogas antifúngicas -Técnica do E-test	66
5 DISCUSSÃO	68
5.1 Infecção hospitalar por leveduras em neonatos	69
5.2 Septicemia, colonização oral, uso de cateteres e associações .	70
5.3 Mortalidade, espécies de leveduras e peso dos neonatos	75
5.4 Caracterização molecular das leveduras	76
5.4.1 Diferenciação de <i>C.albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i>	77
5.4.2 Marcador Molecular – Técnica de PFGE	77
5.4.2.1 Candida parapsilosis	77
5.4.2.2 Candida albicans	78
5.4.3 Produção de exoenzimas (proteinase e fosffolipase) relacio	nadas à
virulência	80
5.5 Sensibilidade aos antifúngicos	83
6 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS	91

Infecções nosocomiais são importantes causas de morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados (ALMIRANTE e RODRIGUES, 2007; CURTIS et al., 2008, CELEBI et al., 2008). Infecções fúngicas sistêmicas vêm aumentando progressivamente nas últimas décadas (GUDLAUSSON et al., 2003) e tem sido salientadas pelas instituições de saúde, universidades e hospitais de vários países (SANDVEN et al., 2000). Dentre os fungos, *Candida* spp têm sido relatada como agente comum em infecções hospitalares com o aumento de sua frequência, morbidade e mortalidade (PAULA et al., 1999; AGARWAL et al., 2004; BIZARRO et al., 2005; CHANG et al., 2008).

Infecções fúngicas em adultos imunocomprometidos tem sido frequentemente relatadas, porém, é de extrema importância ressaltar pacientes neonatais, em unidade de terapia intensiva (UTIN), os quais representam quase 50% das infecções fúngicas (STOLL et al., 2000; KAUFMAN et al., 2006; GANESAN et al., 2008).

Na maioria das UTINs, as infecções por leveduras ocupam o terceiro lugar dentre as causadoras de infecção nosocomial (STOLL et al., 2000; LACAZ et al., 2002; CAREY et al., 2008; CURTIS et al., 2008).

A infecção nosocomial por *Candida* tem apresentado uma incidência entre 1.6 a 16% (SAIMAN et al., 2000; KAUFMAN et al., 2001; STOLL et al., 2002; ROILIDES et al., 2003; CHAPMAN et al., 2007) acompanhada de uma mortalidade em média entre 25 a 60% nos neonatos. (KOSSOFF et al., 1998; CHAPMAN et al., 2003; AGARWAL et al., 2004; CHAPMAN et al., 2007). A incidência de candidíase sistêmica, nos pacientes internados nas UTINs tem aumentado principalmente em crianças com muito baixo peso (peso de nascimento menor que 1500 gramas) com variação de 2.2%-12.9% (BIZZARRO et al., 2005; ALMIRANTE e RODRIGUES, 2008) e particularmente 5.5% a 16.5% entre as crianças de muitíssimo baixo peso (<1000g). (LACAZ et al., 2002; CAREY et al., 2008; CURTIS et al., 2008).

Kossoff et al. (1998) relatou que candidemia em UTIN aumentou de 2,5 % dentre um período de 5 anos – 1981 a 1985, para 4,6% num período de 4 anos – 1986 a 1990 e 28,5% de 1991 a 1995.

Chapman et al. (2007) relatou mortalidade de aproximadamente 30% devido a infecções da corrente sanguínea por *Candida* em neonatos.

Em um estudo prospectivo em UTIN de Taiwan foi verificado que dentre 60 pacientes com infecção nosocomial, 10,5% foram por *Candida* acompanhada de alta mortalidade - 80% (Su et al., 2007).

No Brasil, Ruiz et al. (2005) estudaram 75 amostras de fungemia, sendo que 32% foram isoladas em UTIN pertencente ao hospital da Faculdade de Medicina de Botucatu, São Paulo, entre os períodos de 1998 a 2001.

Em estudo realizado por Chang et al. (2008) em hospital terciário de Mato Grosso do Sul, entre os períodos de 1998 a 2006, os autores verificaram que 20,8% dos pacientes entre 0 a 30 dias apresentaram candidemia.

Um dos motivos do aumento das infecções fúngicas é a constante busca pela melhoria do tratamento dos pacientes imunocomprometidos, cuja proposta tem se estabelecido como padrão nos setores de internação dos hospitais no mundo inteiro (SMOLINSKI et al., 2005; CELEBI et al., 2008; SU et al., 2007; ORSI et al., 2008; VENDENTUOLLI et al., 2008). Os avanços tecnológicos permitiram a sobrevida dos recém-nascidos de idade gestacional e peso de nascimento cada vez menores. No entanto, neonatos, especialmente os de muito baixo peso (PN < 1500 g, RNMBP), admitidos em UTIN são, geralmente, expostos ao uso de cateter venoso central (CVC), ventilação mecânica, jejum prolongado, uso de antimicrobianos de amplo espectro e de corticóides. Concomitantemente, estes itens auxiliam no aumento dos fatores de risco para o desenvolvimento de candidemia, especialmente neste grupo de pacientes, o qual ainda apresenta sistema imune imaturo (KREMÉRY et al., 2002; BENJAMIN et al., 2006; LABELLE et al., 2008; CELEBI et al., 2008).

Embora *C. albicans* seja o patógeno mais isolado, nestes casos a incidência da infecção de corrente sanguínea por outras espécies tais como, *C. tropicalis, C. krusei, C. parapsilosis, C. glabrata* e *C. lusitaniae* tem sido registrada nos últimos anos (GAGGIANO, 2007; SHIN et al., 2007; WANG et al., 2007; CELEBI et al., 2008). *C. parapsilosis* tem sido cada vez mais isolada de sangue de pacientes hospitalizados (LEVIN et al., 1998; RUIZ et al., 2005; ASBECK et al., 2007; CARTER et al., 2008). A importância de *C. tropicalis* é ressaltada, sendo relatada como agente infeccioso com alta mortalidade e associada com infecção sanguínea. Tem sido também descrita em casos de surtos de candidúria (WINGARD et al., 1995; JANG et al., 2005; SILVA et al.,

2007). A espécie C. krusei é considerada emergente e tem sido isolada geralmente de pacientes com câncer (WESTBROOK et al., 2007; HASHEM et al., 2008). C. glabrata se apresenta em terceiro lugar como causa de infecção hospitalar em uma série de estudos. Ressalta-se a sua ainda a sua resistência ao fluconazol e a outros azóis, fato que contribui com o aumento da infecção onde estas drogas são utilizadas, em muitos casos, como profilaxia (PFALLER et al., 1996; SANGUINETTI et al., 2005; HASHEM et al., 2008). Epidemia por C. guillermondi em pacientes cirúrgicos, após nutrição parenteral e uso de cateter também tem sido descrita (MATSUMOTO et al., 2001; MASALA et al., C. dubliniensis está associada com candidíase da mucosa oral em pacientes infectados pelo HIV (SULLIVAN e COLEMAN, 1997). Esta espécie apresenta características morfológicas e bioquímicas semelhantes a C. albicans, sendo necessária a utilização de métodos moleculares para diferenciá-las (PARK, 2000; MILAN et al., 2001; CHAVASCO et al., 2006). Segundo Mariano et al. (2003), na América do Sul, a prevalência de isolados de C. dubliniensis parece ser menor do que aquela demonstrada por países da América do Norte. Alguns testes fenotípicos são aplicados para a diferenciação das duas espécies, como o uso de "CHROMagar" Candida e capacidade de crescimento a 42 °C (SULLIVAN e COLEMAN, 1998), gerando resultados satisfatórios. Em um estudo anterior realizado em nosso laboratório, Matsumoto et al. (2006) realizaram tanto as técnicas fenotípicas e genotípicas e todas as cepas isoladas foram confirmadas serem C. albicans. Casos de doença superficial e invasiva por espécies emergentes, tais como C. famata, C. rugosa tem sido registradas (HAZEN, 1995; CAGGIANO et al., 2007).

A mudança na etiologia das espécies de leveduras, para alguns autores, está associada ao uso profilático do fluconazol, entretanto, as razões da diversidade e variabilidade das diferentes espécies tem sido descrita em diversos estudos, porém gerando controvérsias entre os autores (KREMERY et al., 2002; DIMOPOULOS et al., 2008). A resistência das espécies não albicans aos antifúngicos, representa uma mudança nas estratégias profiláticas e terapêuticas, uma vez que algumas delas apresentam resistência aos antifúngicos (GUDLAUSSON et al., 2003; TORTORANO et al., 2004; DIMOPOULOS et al., 2008).

As espécies, tais como *C. tropicalis, C. glabrata, C. krusei* também são encontradas nas UTINs (ROILIDES et al., 2003; MANZONI et al., 2007; VENDETUOLLI et al., 2008) correspondendo a quase 10% das infecções fúngicas. *C. parapsilosis* tem se destacado como causadora de candidíase sistêmica neonatal (VENDETUOLLI et al., 2007; GANESAN et al., 2008). Alguns trabalhos têm descrito *C. parapsilosis* em UTINs ocupando o segundo lugar após *C. albicans* (SAIMAN et al., 2001; STOLL et al., 2002; FRIDKIN et al., 2006;. Entretanto, em outros estudos, a prevalência tem mudado de *C. albicans* para *C. parapsilosis* (HUANG et al., 1999; STOLL et al., 2002; BORDERON et al., 2003;RUIZ et al., 2005; ASBECK et al., 2007).

No Brasil, Matsumoto et al. (2001) em estudo realizado no hospital público infantil em São Paulo verificaram que de 80 amostras provenientes de sangue e cateter, as espécies prevalentes foram *C. parapsilosis* (35%) seguida de *C. albicans* (20%). Pasqualoto et al. (2006) realizaram estudo retrospectivo durante o período de 9 anos, 1995 a 2003, em hospital terciário de Porto Alegre e verificaram que 191 pacientes tiveram candidemia, prevalecendo a espécie *C. parapsilosis*.

Saiman et al. (2001) estudaram os fatores de risco para a colonização por *Candida* em seis UTINs. Foi realizado estudo retrospectivo de 15 anos de candidemia em UTIN nos Estados Unidos. Em relação às espécies de leveduras, *Candida albicans* predominou no primeiro período, ou seja, de 81 a 90; *Candida parapsilosis* predominou no período seguinte (91 a 95), sendo responsável por 60% dos casos.

Embora a candidemia em si seja um elemento de alto risco de evolução para óbito, o baixo peso e a colonização têm sido descritos, na literatura, como fatores que muito influenciam ao desenvolvimento da infecção sistêmica, favorecendo à alta taxa de mortalidade em neonatos. Desta maneira, a candidemia representa somente uma fração da candidíase, uma vez que se deve verificar os vários outros fatores que envolvem a patofisiologia da doença, bem como os elementos envolvidos no tratamento dos neonatos. A diversidade de fatores como prováveis causadores da candidíase dificulta os estudos epidemiológicos no que diz respeito a elucidação dos modos de transmissão e colonização por estas leveduras, bem como o potencial de risco para os

neonatos de baixo peso (PAPPU-KATIKANEMI et al., 1990; SHATTUCK et al., 1996; CERIKCIOGLU et al., 2004; FRANÇA et al., 2008).

O sistema imunológico do neonato, especialmente os de tempo gestacional menor que 32 semanas, apresenta-se imaturo contribuindo para a entrada, através da pele e mucosas, de microrganismos do ambiente hospitalar que são potencialmente invasivos. Em neonatos a colonização da mucosa oral pode ser detectada no segundo ou terceiro dia de internação. O estabelecimento de leveduras do gênero *Candida*, como parte da microbiota do recém-nascido, pode ser observado já nas primeiras 24 horas após o nascimento, principalmente na cavidade oral, seguida do trato gastrointestinal (MANZONI et al., 2007a; MANZONI et al., 2007b; CATE et al., 2009).

Manzoni et al. (2007) relataram que, neonatos internados costumam apresentar maior frequência a desordem intestinal uma vez que, são mais susceptíveis a colonização por microrganismos patogênicos. A colonização oral dos neonatos internados nas UTINs não apresentam uma microbiota constante, uma vez que estão sempre sendo manipulados (MANZONI et al., 2007a). Sabemos que o intestino dos neonatos prematuros apresenta motilidade diminuída, facilitando a superpopulação microbiana, translocação fúngica ea disseminação dos mesmos (MANZONI et al., 2007a). O uso de antibióticos de amplo espectro provoca modificações na microbiota normal, levando ao aumento da densidade de microrganismos potencialmente patogênicos (COTTON et al., 2006; CHAPMAN, 2007; LABELLE et al., 2008).

A colonização por *Candida* tem sido destacada por diversos autores como sendo o principal fator de risco para o desenvolvimento da infecção fúngica sistêmica (CANNON e CHAFFIN, 1999, SILVA et al., 2007; MANZONI et al., 2007a; GANESAN et al., 2008; SINGHI et al., 2008; MANZONI et al., 2006;).

Aproximadamente, três quartos dos neonatos admitidos na UTIN têm seu trato gastrointestinal colonizado e mucosa oral no seu primeiro mês de vida e várias pesquisas têm associado colonização fúngica à infecção (MANZONI et al., 2007a; MANZONI et al., 2007b; GANESAN et al., 2008; SINGHI et al., 2008; CATE et al., 2009). Baley et al. (1986) verificaram que um terço dos neonatos de baixo peso desenvolveram candidíase mucocutânea e 8% destes

evoluíram para doença invasiva. Pappu-Katikanemi et al. (1990) demonstraram que metade dos neonatos de baixo peso que estavam colonizados com mais de 8 x 10⁶ UFC no trato gastrointestinal, apresentaram sangue em suas fezes e que 29% destes pacientes desenvolveram candidemia. Shattuck et al. (1996), demonstraram que a colonização da pele por *Candida* estava associada com a fungemia. Cerikcioglu et al. (2004) demonstraram que 6,2% das amostras de leveduras que colonizavam o reto e a cavidade oral foram molecularmente idênticas as que ocasionaram candidemia. Saiman et al. (2000) estudaram culturas de "swab" retal e verificaram uma prevalência da colonização por *Candida* de 23% e que esta colonização prévia foi o fator de risco para a candidemia.

Alguns estudos ressaltam a possibilidade de infecção fúngica por transmissão vertical materna ou através da transmissão horizontal, como por exemplo, a partir das mãos do grupo hospitalar (KHAN et al., 2003; CHOWDHARY et al., 2003; BONASSOLI et al., 2004).

As leveduras do gênero Candida que colonizam a mucosa oral dos neonatos podem ser adquiridas através da transmissão vertical, ou seja, através do canal vaginal da mãe durante o parto (BLASSCKE-HELLMESSEN, 1998). A presença de colonização com grande número de colônias na mucosa vaginal ou casos de vaginite tem sido relatada como um fator de risco para a transmissão e provável aumento da colonização, entre elas a oral em neonatos e consequentemente, levando em consideração as características especiais do neonato, ao desenvolvimento da infecção (CARAMALAC et al., 2007; BLISS et al., 2008). A freqüência elevada de leveduras na cavidade vaginal das mulheres grávidas e posterior presença de leveduras na cavidade oral dos neonatos têm levado vários autores a associarem candidíase vaginal da mãe e candidíase neonatal (KAYA, 1990; CARAMALAC et al., 2007). Cerca de 30% de todos os recém-nascidos adquirem C. albicans durante o parto (BLASCHE-HELLMESSEN et al.,1998). Perfuração intestinal espontânea em neonatos de muito baixo peso (menor que 1000g) tem sido relacionada com a placenta inflamada, porém esta pode conter leveduras, o que facilita a infecção sistêmica (RAGOUILLIAUX et al., 2007). Caramalac et al. (2007) mostrou que 6% de concordância entre a colonização de leveduras na cavidade oral dos

neonatos e colonização vaginal das respectivas mães e, portanto, não sendo a principal rota das leveduras. Porém, neste estudo, a colonização oral foi encontrada em 25% dos neonatos.

Apesar da microbiota vaginal da mãe, e da transferência das leveduras através do canal de parto para o recém-nascido serem fatores relevantes quanto a colonização, outros fatores tais como o uso de cateteres, sondas também são importantes fontes de colonização por levedura, bem como o modo de transmissão que pode envolver o "staff" médico, a presença da própria mãe e demais fômites.

Autores tem descrito a transmissão horizontal em neonatos colonizados por *Candida* e posteriormente desenvolvimento à infecção fúngica (ASBECK et al., 2007).

A formação de biofilmes por Candida parapsilosis tem sido descrita (CARTER et al., 2008). Outros autores mostraram que espécies de C. parapsilosis encontradas no biofilme apresentam alta resistência aos antifúngicos administrados (TUMBARELLO et al., 2007; CARTER et al., 2008). Além disso, o biofilme constitui um fator de proteção do fungo, aumentando o risco de infecção sistêmica no neonato (RAMAGE et al., 2005). As infecções relacionadas ao cateter são, portanto, difíceis de serem tratadas (BROOKER e KEENAN, 2007; CAREY et al., 2008) e exigem a remoção do mesmo, fato que nem sempre é possível, devido à necessidade de nutrição parenteral e medicamentos. Entretanto, para o microrganismo ser capaz de formar biofilme, é necessário a colonização inicial no cateter, muitas vezes decorrente da manipulação do mesmo. Trabalhos têm documentado a transmissão direta de Candida parapsilosis a partir de fonte exógena, muitas vezes veiculada pelas mãos do "saff médico", contribuindo para o aumento da incidência de infecções desta espécie e associação ao cateter (BONASSOLI, 2005; CARTER et al., 2008).

Estudos utilizando técnicas de biotipagem têm demonstrado que pacientes com doença sistêmica foram infectados com o mesmo tipo de levedura que colonizavam a cavidade oral dos pacientes (WESTBROOK et al., 2007).

Waggoner-Fountain et al. (1996) utilizando cariotipagem eletroforética e análise genômica com uso de enzima de restrição, demonstraram que de quatro, três neonatos foram colonizados por *C. albicans* com perfis similares às amostras isoladas das respectivas mães. Interessante é que *C. parapsilosis* foi encontrada em neonatos (colonização retal) sem associação com suas mães, sugerindo uma transmissão horizontal (WAGGONER-FOUNTAIN et al., 1996).

Atualmente, estudos têm sido realizados a respeito das possíveis fontes de transmissão para os neonatos, associando a levedura com o uso de cateter, sondas, mãos contaminadas, porém poucos associam a colonização do neonato e as infecções fúngicas utilizando marcadores moleculares (BLISS, 2008). Os surtos de infecção por *Candida* spp são freqüentes nas UTINs e muitos estão relacionados com a transmissão cruzada (VASQUEZ et al., 1993; SHIN et al., 2000; BONASSOLI et al., 2005; CAREY et al., 2008).

A análise do DNA genômico permite estabelecer as variações genéticas entre as cepas, sendo estes métodos muito importantes em investigações epidemiológicas, esclarecendo surtos hospitalares bem como, em alguns casos têm auxiliado na elucidação dos mecanismos de adaptação das leveduras (ROILIDES et al., 2004; SHIN et al., 2004). Shin et al. (2004) conduziram estudo utilizando técnica de "Southern blot" com uso de um fragmento de 0.98-kb da sonda Ca3 e a técnica de eletroforese em campo pulsátil (PFGE) para examinar os isolados seriados de *C. albicans* de 15 pacientes utilizando cateter venoso em associação a candidemia, durante o período de 3 anos. Por meio destas técnicas, comprovou-se esta associação, além de observarem que algumas amostras de *C. albicans* sofreram microevolução durante a colonização do cateter, fato que não aconteceu com as amostras isoladas de sangue, urina ou líquor.

A técnica de PFGE é realizada em gel de agarose que permite a separação de moléculas grandes de DNA, incluindo os cromossomos. Os cromossomos de diferentes isolados variam no tamanho, e cada amostra é caracterizada por um perfil particular ou cariótipo. Devido ao seu excelente poder discriminatório e reprodutibilidade, o PFGE é um dos métodos mais comumente utilizados em análises epidemiológicas para *Candida albicans*, *C.*

glabrata, C. tropicalis, dentre outras espécies (VRIONI et al., 2001; SHIN et al., 2005; SHIN et al., 2007; WANG et al., 2007).

Além disso, *Candida* spp tem sido avaliada quanto à susceptibilidade aos agentes antifúngicos, porém estes estudos foram melhores descritos em pacientes adultos imunocomprometidos(TAKAKURA et al., 2007).

A anfotericina B convencional tem sido utilizada como droga de escolha para infecções por *Candida* spp em neonatos, mas causa efeitos colaterais severos, como nefrotoxicidade (BALEY et al., 1984;BLISS et al., 2003). A anfotericina B lipossomal mostrou-se efetiva e segura no tratamento de neonatos(KREBS et al., 1999; BLISS et al., 2003).

O uso terapêutico e profilático de agentes tais como anfotericina B e os azóis, menos tóxicos, que são freqüentemente administrados por períodos prolongados, tem dado origem a casos alarmantes de resistência aos antifungicos (DIAZ-GUERRA et al., 1998; PFALLER et al., 1998; PFALLER et al., 2006; PFALLER et al., 2007). Porém, sabe-se que algumas espécies de Candida como C. krusei e C. glabrata apresentam susceptibilidade reduzida aos triazólicos e, desta maneira, os pacientes devem ser tratados com outros antifúngicos (PFALLER et al., 2007; PFALLER et al., 2008). Efeitos colaterais menos sérios do que os causados pela anfotericina B e a sua fácil administração tem tornado os azólicos, fármacos bastante utilizados. aumento da ocorrência de espécies de Candida spp potencialmente resistentes às drogas azólicas de primeira e segunda gerações, levou ao desenvolvimento de novas drogas antifúngicas, como o voriconazol, que apresenta um amplo espectro de ação e vem mostrando resultados promissores contra espécies de Candida resistentes a outros azóis, como o fluconazol (DRAGO et al., 2004; PFALLER et al., 2007). Kullberg et al. (2005) verificaram que o vor iconazol é tão eficaz quanto o esquema da anfotericina seguida de fluconazol para tratamento de pacientes não neutropenicos. O voriconazol é considerada um fármaco seguro para os neonatos (KOHLI et al., 2008).

A caspofungina pertence a uma nova classe de compostos antifúngicos que inibe a síntese da β-1,3-D-glucana, o maior componente da parede celular da levedura. É a primeira equinocandina a ser lincenciada e seu espectro está limitado às espécies de *Candida* e *Aspergillus* (MORA-DUARTE et al., 2001;

STONE et al., 2002; WALSH et al., 2002). Estudos tem sido relatados sobre a ação da caspofungina em neonatos (VASQUEZ et al., 1997; WALSH et al., 2002; LEHNRBECKER e GROLL, 2008).

A micafungina é outra equinocandina que demonstra ser uma droga fungicida de amplo espectro contra espécies de *Candida*, incluindo aquelas resistentes aos azóis, tanto in "vitro" como in "vivo". (TAWARA, 2000; MIKAMO et al., 2000; IKEDA et al., 2000). Estudo realizado por Heresi et al., 2006 mostrou que na dose de 3,0mg/kg é tolerável em prematuros com peso > 1000 gramas.

No Brasil, os principais grupos de antifúngicos utilizados contra *Candida* spp são os poliênicos, anfotericina B e nistatina, e os azólicos como cetoconazol e miconazol (imidazólicos) ou itraconazol, fluconazol e voriconazol (triazólicos) (KREBS et al., 1999; RUIZ et al., 2005; MATSUMOTO et al., 2006; FRANÇA et al., 2008).

A escolha terapêutica inicial depende do estado clínico do paciente, da presença de insuficiência renal, do conhecimento da espécie de *Candida* e, especialmente, quanto a sensibilidade da levedura às drogas antifúngicas.

O documento M27-A ("Clinical and Laboratory Standards Institute" -CLSI, 1997) apresenta testes de susceptibilidade antifúngica para leveduras constituindo de técnicas padronizadas, reprodutíveis e confiáveis com a finalidade de auxiliar no acompanhamento terapêutico do paciente. São descritos métodos de macro e microdiluição em caldo para testes com Candida e Criptococcus neoformans, definindo a espécies de (concentração inibitória mínima) dos antifúngicos 5-fluorcitosina, fluconazol e itraconazol. Mais tarde, em 2002, foi descrito o documento M27-A2 recomendando a utilização de microplacas no método da microdiluição. O suplemento M27-S3 de 2008 complementa as informações da terceira edição M27-A3. O documento E. dis. 7.1. ("European committee antimicrobiol susceptibility testing" - EUCAST, 2002) também descreve técnicas de padronização da microdiluição em caldo. Ambas as técnicas são equivalentes embora apresentam diferenças quanto ao método e interpretação dos "breakpoints" (CHRYSSANTHOU e CUENCA-ESTRELLA, 2006; CLAUDINO et al., 2008).

Estudos comparativos têm sido publicados e discutidos quanto ao melhor inóculo, tempo de incubação e meio de cultura (.REVANKAR et al., 1998; MARR et al., 1999; CHRYSSANTHOU e CUENCA-ESTRELLA,2006).

O "kit" comercial Etest tem sido descrito como um bom método para uso em rotina laboratorial, sendo rápido e de fácil execução. O fundamento da técnica é baseado na difusão de concentrações graduadas do antifúngico, impregnadas numa única fita, em meio sólido, fornecendo a CIM da droga sobre a levedura avaliada. Estudos têm relatado a boa correlação do Etest com os métodos preconizados como o do CLSI considerados de referência no que diz respeito ao fluconazol e anfotericina B para espécies de *Candida*. (PFALLER et al., 1996; SILVA et al., 2002; DIAS et al., 2006; MATSUMOTO et al., 2007; CLAUDINO et al., 2008)

Estudos sobre a atividade das proteinases e fosfolipases tem sido relatados com objetivo de compreender os mecanismos de virulência de *Candida*. O destaque da espécie como patógeno está relacionado a vários fatores incluindo a secreção destas enzimas (SATIB et al., 2002). Esta atividade pode ser monitorada "in vitro" (RUCHEL et al., 1982; PRICE et al., 1982). Segundo Oksuz et al. (2007), as atividades enzimáticas foram mais baixas em amostras colonizantes do que em amostras isoladas de infecção. Cerikrioglu et al. (2004), sugerem que a atividade enzimática, durante a colonização, por longo tempo, pode contribuir para o desenvolvimento de candidemia em neonato pré termo.

Um dos maiores problemas que o clínico enfrenta no estudo da candidíase neonatal é a inespecificidade dos sinais e sintomas para diagnosticar esta infecção fúngica. O diagnóstico de candidíase neonatal é dado após a positividade da hemocultura (FRANÇA et al., 2008), mas muitos autores relatam que a cultura de sangue para fungos, apesar de mostrar especificidade de 100%, possui baixa sensibilidade. Portanto, o diagnóstico presuntivo é realizado para iniciar um tratamento empírico. A união dos fatores de risco, tais como, idade gestacional, peso de nascimento, colonização, uso de cateteres bem como as características da levedura aumentam o risco para a infecção fúngica (ROWEN et al., 2001; BENJAMIN et al., 2003; MENDIRATTA et al., 2006; FARMAKI et al., 2007; CAREY et al., 2008).

Esses fatores em conjunto com o perfil de sensibilidade aos antifúngicos, presença de atividade enzimática produzida pela levedura, e o estudo dos perfis moleculares contribuem para o aprimoramento de medidas estratégicas para um melhor tratamento dos pacientes como também de medidas preventivas para diminuição do fungo no meio ambiente das UTINs.

Após a revisão da literatura e todos os aspectos assinalados, verificamos a importância da colonização por leveduras em neonatos de alto risco, ressaltando-se a colonização oral e sua implicação com quadros de fungemia, ainda com poucas pesquisas, especialmente no Brasil.

Objetivos 36

Considerando que os trabalhos relacionados com candidemia, desde a sua transmissão, colonização do hospedeiro pelas leveduras, sensibilidade aos antifúngicos e marcadores moleculares, têm sido voltados para pacientes adultos e poucos são os trabalhos envolvendo neonatos, especialmente os de alto risco. A gravidade das infecções fúngicas em neonatos; as questões relativas aos agentes etiológicos, tais como a associação entre as amostras isoladas, patogenicidade destas leveduras, sensibilidade aos antifúngicos e a sua variabilidade genética, precisam ser melhor elucidadas; a colonização inicial é principalmente a cavidade oral, seguida do trato intestinal e que pode ocorrer modificações da etiologia destas infecções.

Os objetivos deste estudo prospectivo foram:

- 1. Isolar e identificar, por métodos tradicionais, as leveduras colonizantes da mucosa oral, e as leveduras provenientes de sangue e cateter de neonatos de alto risco internados na UTIN (Unidade de Terapia Intensiva Neonatal) do Berçário Anexo à Maternidade do HC-FMUSP (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- 2. Verificar a frequência das espécies de leveduras isoladas da cavidade oral, sangue, cateter durante o período de estudo (nove meses).
- 3. Estudar as leveduras isoladas quanto a sua produção enzimática proteinase e fosfolipase (fatores relacionados a virulência).
- 4. Estudar as leveduras quanto a sensibilidade aos antifúngicos: anfotericina B, fluconazol, voriconazol, cetoconazol, itraconazol e caspofungina por meio da técnica de difusão em ágar (E test).
- 5. Estabelecer os PFGE-tipos das amostras de leveduras isoladas dos neonatos.
- 6. Correlacionar os achados laboratoriais para as amostras de leveduras consideradas colonizadoras da cavidade oral com os resultados obtidos para as amostras de levedura isoladas de sangue e cateter e provenientes dos neonatos com infecção sistêmica.

Objetivos 37

7. Determinar as possíveis associações (colonização oral/sangue; cateter/sangue; colonização oral/sangue/cateter) por meio do estudo dos perfis genotípicos utilizando-se da técnica de PFGE.

3.1 Local de estudo

UTIN do Hospital Terciário de São Paulo: O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HCFMUSP) é uma autarquia estadual vinculada à Secretaria de Estado da Saúde para fins de coordenação administrativa e associada à Faculdade de Medicina da USP para fins de ensino, pesquisa e prestação de ações e serviços de saúde de alta complexidade (nível terciário).

O Berçário Anexo à Maternidade do HC-FMUSP constitui centro de referência terciário para atendimento de recém-nascidos gravemente enfermos e para treinamento de profissionais de saúde especializados. Recebe em média 180 recém-nascidos por mês. Contém 63 leitos, sendo 40 destinados à assistência neonatal de nível terciário. A coleta de dados para a pesquisa foi realizada nos pacientes admitidos na UTI neonatal.

3.2. Pacientes

Para todos os recém-nascidos com fatores de risco para infecção perinatal e / ou suspeita clínica de infecção adquirida são colhidos hemograma, hemocultura e dosagem de proteína C reativa, no momento da suspeita de infecção, conforme a rotina do serviço.

Os pacientes de maior gravidade e/ou com peso de nascimento inferior a 1500g são admitidos nos setores de UTI (26 leitos). Nestes locais foi realizada a coleta de dados para o trabalho prospectivo. Foram estudados 125 neonatos internados no Berçário Anexo à Maternidade do HC-FMUSP.

A coleta de dados foi realizada no período de nove meses (julho de 2006 a março de 2007).

3.2.1 Critérios de inclusão

- recém-nascido pré-termo (idade gestacional inferior a 37 semanas de gestação);
- recém-nascido com fatores de risco para infecção perinatal (mãe com febre intraparto, fisometria);
- recém-nascido com malformação do sistema digestivo.

3.2.2 Critérios de exclusão

• recém-nascido sem indicação de internação em UTI neonatal.

3.2.3 Definições

Define-se sepse como a presença de Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) associada à infecção presumida ou comprovada. (Haque, 2005).

3.2.3.1 Definição de Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica

Define-se Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica como a presença de instabilidade térmica (febre ou hipotermia) ou alteração na contagem de leucócitos (leucocitose, leucopenia ou > 10% neutrófilos imaturos) e pelo menos um dos seguintes critérios:

- Taquicardia (FC média > 2 DP acima do normal para a idade na ausência de estímulo externo, medicações crônicas, ou estímulo doloroso, ou elevação persistente e inexplicada da FC com duração de 0,5 a 4 horas).
- Bradicardia (diminuição da FC, persistente, não explicada, por um período superior a 0,5 h).
- Taquipnéia (FR média > 2 DP acima do normal ou ventilação pulmonar mecânica para um processo agudo não relacionado a doença neuromuscular de base, nem uso de anestesia.

3.2.3.2 Definição de Sepse Fúngica

Define-se sepse fúngica como a presença de sinais e sintomas de infecção com isolamento de fungo em hemocultura ou em urocultura colhida por punção supra-púbica ou como a presença de laudo de necrópsia mostrando doença invasiva por fungo.

3.3 Coletas e Semeaduras

Foram coletadas 282 amostras provenientes de mucosa oral de pacientes neonatais (n= 125) no momento do nascimento, após 24 horas e

depois, semanalmente, até o momento da alta. Neste período de estudo, obtivemos por meio de semeadura do sangue em meio de cultura bifásico BACTEC, 12 hemoculturas positivas para fungo. No caso do estudo de ponta de cateteres (n=6) pesquisamos os mesmos utilizados em pacientes com septicemia. Estes materiais foram semeados em ágar sangue pela técnica de rolamento. Foi considerada colonização positiva quando o crescimento se deu ≥ 15UFC (semiquantitativa) ou maior que 10³(quantitativa) em segmento da ponta de cateter, conforme descrito por Bovento, 2007. As leveduras foram semeadas depois em meio de ágar Sabouraud dextrose (Difco, Massachussets, EUA) e em placa contendo meio de Chromagar (Difco, Massachussets, EUA).

O material coletado da mucosa oral através de "swab" estéril alginatado (Cefar, Brasil) foi semeado em placas contendo meio de ágar Sabouraud dextrose (Difco) e em outra placa contendo meio Chromagar . Alíquotas (0,2mL) de hemoculturas positivas para fungo foram transferidas do meio bifásico BACTEC para um tubo contendo o meio ágar Sabouraud dextrose (Difco). As culturas de leveduras isoladas de cateter foram transferidas para tubos contendo ágar Sabouraud dextrose (Difco). Todos estes materiais foram colocados em caixas, identificados e transportados para o laboratório de Leveduras Patogênicas do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo (USP). Em todos os casos de leveduras provenientes do cateter houve a confirmação de sepse neonatal.

3.4 Processamento e Identificação das amostras

As placas e tubos, previamente semeados, foram mantidos em estufa a 25 °C, por até 15 dias. Foram selecionadas apenas colônias leveduriformes e estas foram identificadas segundo técnicas do Manual "The Yeasts" (KURTZMAN e FELL, 1998) e as amostras de *Trichosporon* foram identificadas segundo Gueho et al., 1992.

3.5 Fatores relacionados à virulência das leveduras

3.5.1 Pesquisa de proteinase

Este estudo foi baseado no procedimento descrito por Ruchel et al., 1982. O meio básico esterilizado foi resfriado a 50 °C, na qual foi adicionado o meio de albumina e então, a mistura foi distribuída em placas de Petri em volume de 20 mL. Após a solidificação da mistura foram semeados quatro isolados de leveduras por placa com alça de platina calibrada. As placas foram incubadas à 37 °C durante 96 horas. A presença da enzima foi detectada pela formação de um halo claro de degradação da albumina ao redor das colônias de leveduras. A atividade enzimática (Pz) foi medida de acordo com a técnica de Price et al., 1982.

3.5.2 Pesquisa de fosfolipase

O meio básico foi preparado contendo 1% de peptona, 2% de dextrose, 6 % de cloreto de sódio, 0.06% de cloreto de cálcio. Este meio foi enriquecido com gema de ovo e posteriormente distribuído em placas. Foram semeados quatro isolados de leveduras por placa com alça de platina calibrada. As placas foram incubadas à 37 °C durante 96 horas. A presença da enzima foi detectada pela formação de um halo opaco de precipitação ao redor da colônia de levedura. A atividade enzimática (Pz) foi medida de acordo com a técnica de Price et al., 1982 da mesma maneira que para a atividade de proteinase.

3.6 Teste de sensibilidade aos antifúngicos

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antifúngicos – "kit" comercial Etest (AB Biodisk, Solna, Suécia)

Neste teste foi utilizado o sistema comercial E-test (AB-Biodisk, Solna, Suécia), incluindo os antifúngicos seguintes: fluconazol, itraconazol, cetoconazol, voriconazol, anfotericina B e caspofungina.

3.6.1 Processamento do teste

Inicialmente, 48 amostras de leveduras foram subcultivadas em ágar Sabouraud-dextrose (Difco) por 24 horas a 37 °C. O inóculo de cada amostra de levedura foi preparado a partir de suspensão em salina estéril ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland. A amostra foi, então, semeada em estrias na superfície de placas de Petri contendo ágar RPMI 1640 + 2% de glicose + MOPS conforme recomendado pelo fabricante. As fitas do Etest produzidas pela AB Biodisk (Solna, Suécia) são plásticas e contém um gradiente definido e contínuo do antifúngico. Cada fita contém um gradiente de concentração correspondente a 0,016 a 256μg/mL para fluconazol e 0,002 a 32μg/mL para cetoconazol, itraconazol, voriconazol, anfotericina B e caspofungina. Estas fitas contendo os antifúngicos foram aplicadas cuidadosamente sobre a superfície do ágar e então incubadas a 35° C durante 24 – 48 horas. Para controle, foram incluídas no teste, *C. parapsilosis* ATCC (American type culture collection) 22019 e *C. krusei* ATCC 6258.

A leitura do teste foi feita de acordo com as instruções da AB Biodisk (1993) considerando a CIM de cada antifúngico para cada uma das amostras.

3.6.2 Interpretação dos resultados

O critério de sensibilidade/resistência aos antifúngicos fluconazol e voriconazol foi aquele recomendado pelo CLSI (documento M27-A2, 2002 e suplemento M27-S3, 2008) que preconiza de acordo com a tabela abaixo os seguintes valores de concentrações de antifúngicos para avaliar a sensibilidade ou resistência aos fármacos pela técnica da microdiluição.

TABELA 1 – Interpretação do comportamento de cepas de *Candida* sp. segundo normas do CLSI (M27A2 – 2002), frente a concentração dos antifúngicos (μL/mL).

Agentes	Sensíveis	Sensível Dose	Desistants	
antifúngicos	Sensiveis	Dependente	Resistente	Referência
Fluconazol	≤8	16-32	≥64	M27-A2/2002
Itraconazol	≤0,125	0,25-0,5	≥1	M27-A2 /2002
Anfotericina B	-	-	>2 (sugere-se)	M27-A2 /2002
Voriconazol	≤1	2	≥4	M27-S3 /2008
Caspofungina	≤2	-	-	M27-S3/2008

O critério da TABELA 1 estipula valores de 5-fluorcitosina, mas não citamos aqui uma vez que não utilizamos este antifúngico. O critério não estipula valores para cetoconazol que é considerada uma droga fungistática. Apenas indica que a maioria dos valores são encontrados entre 0,03 e 16μg/mL para os isolados clínicos (M27-A2,CLSI). Neste estudo, valores acima de 16μg/mL foram considerados como resistência.

Para voriconazol, cepas com CIMs acima de $4\mu g/mL$ foram consideradas resistentes, segundo o documento do M27-S3, 2008. Para caspofungina, as cepas foram consideradas resistentes quando mostravam CIMs maiores que 2 $\mu g/mL$ (Pfaller et al., 2008).

3.7 Técnicas para diferenciação de C. albicans e C. dubliniensis

3.7.1 Testes fenotípicos

As amostras identificadas pelo método tradicional como sendo *C. albicans* foram semeadas em meio cromogênico (CHROMagar *Candida*, Difco, EUA) e incubadas a 32 °C por até 3 dias. A presença de colônia verde clara foi indicativo de *C. albicans* e colônias verde escura indicativo de *C. dubliniensis*. O teste do crescimento a 42 °C foi realizado segundo Sullivan e Coleman, 1998. Amostras que semeadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco-Massachussets, EUA) com crescimento a esta temperatura foi sugestivo de *C. albicans* e amostras que não cresceram sugestivas de *C. dubliniensis*. Para

controle positivo utilizamos a cepa *C. albicans* ATCC 64548 e *C. dubliniensis* ATCC 777.

3.7.2 Testes genotípicos

3.7.2.1 Extração do DNA das amostras de leveduras para diferenciação molecular entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*

Foi realizada a técnica de PCR, com extração de DNA de acordo com Scherer e Stevens, 1987. Amostras de C. albicans foram cultivadas em tubos contendo 5 mL de YPD ("Yeast Peptone Dextrose" - Difco, Detroit, EUA) líquido por 18 horas, sob agitação a 37 °C. Após a incubação, o meio líquido contendo o crescimento da levedura foi transferido para Eppendorf de 1,5 mL contendo 1,0 mL de tampão SET (Tris 20 mM, EDTA 25 mM, NaCl 75 mM, pH 8,0) para serem lavadas. Foram então adicionados 300 µL de lisozima (Amersham-Pharmacia, EUA) em uma concentração de 3,0 mg/mL em tampão SET, e os tubos foram incubados a 37 °C durante uma hora. A seguir, cerca de 5 μL de RNase a 10,0 mg/mL (Amersham-Pharmacia, EUA) foi adicionada e a mistura foi incubada a 37 °C por 30 minutos. Após, foi acrescentados 50 µL de SDS (Sodium dodecyl sulphate – Sigma, St. Louis, EUA) a 10 % e 10 µL de proteinase K a 10,0mg/mL (Invitrogen, Brasil). A mistura foi incubada a 37 °C por uma hora, após o qual foram acrescentados 150 µL de acetato de sódio (Merck, Germany) a 3 Me mantidos em gelo durante 20 minutos. Cerca de 500 µL da mistura fenol-clorofórmio-álcool isoamílico na proporção 25: 24: 1 (Amersham-Pharmacia, EUA) foi adicionada, misturadas 50x por inversão e cenfrifugadas a 5000 rpm por 30 minutos a tempertura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro tubo Eppendorf de 1,5 mL. A mistura clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 foi adicionada e após serem 50 vezes misturados por inversão, foram centrifugados a 5000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido em outro Eppendorf com igual volume de álcool isopropílico (Amersham-Pharmacia). O tubos foram mantidos em gelo seco por 20 minutos. Os tubos foram centrifugados durante 30 minutos 10000 x g e o sobrenadante descartado. Etanol a 70 % adicionado à mistura e centrifugados a 10000 x g durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado novamente, e o tubo foi secado a temperatura

ambiente. O DNA presente no sedimento dentro do tubo foi ressuspendido em 25 μL de tampão TE 1X (Tris 0,01 M, EDTA 1 mM e pH 7,5). A quantificação do DNA extraído foi realizada por dosagem espectrofométrica a 260nm (Beckman DU 640, EUA).

3.7.2.2 Visualização do DNA extraído

Gel de agarose 0,8% foi preparado com tampão TBE (Tris 0,09 M; ácido bórico 0,09 M, EDTA 2 mM, pH8,0) 1X. O tampão de corrida foi a solução TBE 1X. O gel teve capacidade para 8 poços. No primeiro poço foi depositado a mistura de 1 µL do marcador de peso molecular − fago □ digerido com *Hind III* (Amersham-Pharmacia) com 4 µL de corante azul de bromofenol (Invitrogen, Brasil) e 4 µL de TE. Nos demais poços foi depositada a mistura de 5 µL de DNA da amostra e 5µL de corante. A corrida foi realizada a 90V por 30 minutos, posteriormente corado com solução de 2 µg/mL de brometo de etídio (Sugma, St. Louis, EUA) durante 15 minutos. A visualização do DNA extraído foi realizada com auxílio do equipamento GEL DOC 1000 sob iluminação de luz ultravioleta, com o programa "Molecular Analyst" (Versão 1.4.1. Bio-Rad).

3.7.2.3 Reação de PCR

Para a reação de PCR foi utilizado dois pares de primers: um para *C. albicans* e um para *C. dubliniensis* (Maranelli et al., 1998).

C. albicans:

Sense: CAL 5 5' TGT TGC TCT CTC GGG GGC GGC CG 3'

Anti-sense: NL4CAL 5' AAG ATC ATT ATG CCA ACA TCC TAG GTA AA 3'

C. dubliniensis:

Sense: CDU2 5' TGT TGC TCT CTC GGG GGC GGC CG 3'

Anti-sense: NL4CAL 5' AAG ATC ATT ATG CCA ACA TCC TAG GTA AA 3'

Para o preparo do mix de 25 μL foram colocados em tudo Eppendorf, tampão com 2 mM de MgCL2 (Biotools, Brasil), 0,2 mM de dNTP (Biotools, Brasil), 0,5 mM de cada primer (Invitrogen, Brasil), 1,2U de taq polimerase (Biotools, Brasil), 10 ng de DNA da amostra e H₂O miliQ para completar o volume. A amplificação foi realizada em termociclador (MJ Bio Research, EUA)

com a programação: denaturação inicial 3' a 98 °C seguida de 35 ciclos de 1' a 95 °C (denaturação); 1,5' a 52 °C (anelamento); 1,5' a 72 °C (extensão) e extensão final de 10' a 72 °C. A presença do fragmento amplificado ou não foi analizada por eletroforese em gel de agarose a 1,2 % e utilização do peso molecular de 100 pb (Invitrogen, Brasil). O gel foi corado com brometo de etídio (Sigma, St. Louis, EUA) (2 μg/mL) e a visualização do produto do PCR foi realizada com auxílio do equipamento GEL DOC 1000 sob iluminação de luz ultravioleta com o programa "Molecular Analyst ™" (versão 1.4.1., Bio Rad) As cepas utilizadas para os testes genotípicos foram os mesmos dos testes fenotípicos: ATCC 64548 (*C. albicans*) e 777 (*C. dubliniensis*)

3.8 Perfis genéticos das amostras de leveduras

3.8.1 Cariotipagem- Eletroforese em campo pulsátil (PFGE)

Somente amostras de *Candida* foram analisadas por PFGE. Adequamos o método descrito por Branchini et al. (1994) com algumas modificações. As amostras em associação do mesmo neonato (sangue/sangue; cavidade oral/sangue; cateter/sangue; cavidade oral/sangue/cateter) foram analisadas.

3.8.1.1 Extração, corrida e visualização cromossomal

As amostras de leveduras foram previamente semeadas em ágar YPD ("yeast peptone dextrose" – Difco, Detroit, EUA) incubando-se a 37 °C. As colônias de leveduras foram transferidas para tubos Ependorff até completarem o volume equivalente a 300 μL e então adicionado o mesmo volume de EDTA (Sigma, St. Louis, EUA) 0,05 M, pH 8,0, as quais foram lavadas de três a quatro vezes. Posteriormente, a solução contendo as leveduras foram incubadas com "lyticase" [(1250U) (Sigma,St. Louis, EUA)] por uma hora a 37 °C. A seguir, gel de agarose "low-melt" (Bio Rad) a 1%, previamente fundido a 55 °C, foi misturado gentilmente com a solução contendo as células. Após solidificação do gel, os blocos formados foram incubados em solução de tampão NET [(Tris 1 M; 20 U/mg; EDTA 0,5 M pH8,0; laurosarcosyl 1% mais 1 mg /mL de proteinase K(20U/mg, Invitrogen, Brasil)]

durante 18 horas a 50 °C. Posteriormente, a solução foi desprezada e ao tubo foi adicionada uma solução de EDTA 0,5 M, pH 9.0 para lavagem (3 vezes) a temperatura ambiente e depois para estocagem a 4 °C.

Para a corrida eletroforética em campo pulsátil, os blocos contendo as amostras cromossomais foram introduzidos em orifícios feitos no gel de agarose a 1% (Sigma, St. Louis, EUA). A corrida eletroforética foi feita através do equipamento CHEF-MAPPER (Bio Rad) a 125 volts utilizando-se 2,5 litros de tampão TBE 0,5 x a 14°C. As condições para a eletroforese foram divididas em dois tempos, sendo o primeiro com intervalos de pulsos de 120 a 120s durante 23 horas, e o segundo com intervalos de 240s durante 11 horas. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio (Sigma, St Louis, EUA) na concentração de 1 μg/mL em tampão TBE (Tris 0,09 M; ácido bórico 0,09 M, EDTA 2 mM, pH 8,0) 0,5 x e descorado com água destilada por 1 hora.

As bandas de DNA cromossomal foram vizualizadas sob luz ultravioleta, com o auxílio de um transluminador Gel Doc 1000 (Bio Rad, EUA)) e o gel fotografado. O resultado obtido foi interpretado segundo Barchiesi et al.,1995 com base na observação visual das diferenças de peso molecular das bandas. Foi observada a presença de bandas não levando em consideração a intensidade das mesmas.

Como controle para medida do peso molecular, foi utilizado Sacharomyces cerevisae "Chef DNA size standard" (Bio Rad,EUA).

3.9 Análise estatística

Para os dados observados nesta pesquisa, foi utilizado o coeficiente de correlação de Yule, o Cálculo de Risco Relativo e as hipóteses foram testadas pelo teste exato de Fisher e foram considerados significativos aquelas com p<0,05.

No período de 01 de junho de 2006 a 30 de março de 2007, foram estudados 125 neonatos internados na UTIN do Berçário anexo a Maternidade da Faculdade de Medicina da USP que preencheram os critérios de inclusão.

Dentre estes neonatos, 14,4% (18/125) apresentaram colonização oral por leveduras; 9,6% (12/125) dos neonatos apresentaram fungemia e destes recém-nascidos, 4,8% (6/125) apresentaram cateter venoso positivo para levedura. Dos 125 neonatos, 18,4% (23/125) tiveram ou colonização oral e/ou septicemia totalizando 54 amostras de leveduras a serem estudadas. Destas, 66,7% (36/54) foram isoladas da colonização oral, 22,2% (12/54) foram isoladas de sangue e 11,1 % (6/54) isoladas de cateter. Destes 23 pacientes 65%(15/23) eram do sexo masculino. Denominamos P como sigla para paciente, seguido de um número representando os 23 neonatos com cultura positiva para leveduras, como por exemplo, P1 (paciente 1).

4.1 Colonização oral

Foram isoladas, dos 18 neonatos com colonização positiva, 36 amostras de colonização oral, sendo que 72,2% (26/36) foram identificadas como *C. albicans*, seguida de 11,1% (4/36) de *Trichosporon asahii*; 8,5% (3/36) de *C. parapsilosis*; 5,4% (2/36) de *C. krusei* e 2,8% (1/36) de *Rhodotorula rubra*.

Destes 18 neonatos com colonização positiva, 75% (6/18) deles apresentaram amostras seqüenciais dentre o período de 9 meses de estudo. (TABELA 2). O paciente P22 apresentou 2 amostras seqüenciais de *C. albicans*. Os pacientes P10 com 4 amostras de *Trichosporon asahii* e P20 com 4 amostras de *C. albicans*; P18 apresentou 2 amostras seqüenciais por *C. parapsilosis*, seguida de 3 amostras seqüenciais de *C. albicans* (TABELA 2). O paciente P17 apresentou colonização com 8 amostras seqüenciais de *C. albicans* totalizando, nestes 5 neonatos, 23 amostras. Os outros 13 neonatos colonizados apresentaram uma amostra positiva.

4.2 Sangue

A septicemia foi confirmada em 12 neonatos durante o período de estudo. *C. albicans* foi isolada do sangue em 50% (6/12) dos neonatos; *C. parapsilosis* foi isolada em 33,5% (4/12) dos neonatos Um neonato

desenvolveu sepse por *Pichia anômala* (8,25%) e outro por *Pichia angusta* (8,25%) (TABELA 2 e FIGURA 1).

4.3 Cateter

Dos 12 neonatos internados com sepse fúngica, 6 apresentaram cateter venoso com cultura positiva, sendo 66,7% (4/6) cateteres colonizados por *C. parapsilosis* e 33,3% (2/6) por *C. albicans* (TABELA 2 e FIGURA 1).

4.4 Associação entre colonização oral e sepse

Dentre os 23 neonatos com colonização e/ou septicemia, observamos que 26% (6/23) deles apresentaram associação entre a colonização oral com a sepse e pela mesma espécie; 4,0% (1/23) apresentaram colonização por levedura de espécie diferente da que causou a sepse; 48,0% (11/23) dos neonatos apresentaram colonização oral, mas não desenvolveram sepse e 22,0% (5/23) dos neonatos desenvolveram sepse sem estarem colonizados na cavidade oral (FIGURA 2).

Dentre os 12 casos de sepse, 83,4% (10/12) foram causadas por espécies de *Candida*, sendo que, destas 10 candidemias, 60% (6/10) estiveram associadas com colonização oral prévia pela mesma espécie, 5 por *C. albicans* e uma por *C. parapsilosis* (TABELA 2).

4.5 Associação entre o cateter colonizado e sepse

Na TABELA 2 observamos que os pacientes 10, 15 e 23 apresentaram cateter e sepse por *C. parapsilosis* sem colonização oral pela mesma espécie.

C. albicans encontrada em cateter também foi isolada da colonização oral dos pacientes 11 e 20. Nenhuma amostra de C. albicans foi isolada somente e unicamente em cateter associado diretamente com a sepse.

TABELA 2 - Identificação das espécies de leveduras isoladas de colonização oral, sangue e cateter, PFGE tipos e óbitos dos neonatos internados na UTIN de Hospital Terciário de São Paulo.

					PFGE	
P	N	Cavidade oral	Sangue	Cateter	tipos	Óbito
1	1	Candida albicans	-		II	-
2	1	C. krusei	-		X	-
3	3	C. parapsilosis	C. parapsilosis	C. parapsilosis	VIII	X
4	2	C. albicans	C. albicans		V	X
5	2	C. albicans	C. albicans		V	-
6	1	-	Pichia anomala		-	X
7	1	C. albicans	-		V	X
8	1	-	Pichia angusta		-	X
9	1	Rhodotorulla rubra	-		-	-
10	6	Trichosporon asahii(4)	C. parapsilosis	C. parapsilosis	-/VII	X
11	3	C. albicans	C. albicans	C. albicans	V	X
12	1	C. albicans	-		V	-
13	1	-	C. albicans		V	X
14	1	C. albicans	-		VI	-
15	2	-	C. parapsilosis	C. parapsilosis	IX	X
16	1	C. albicans	-		III	-
17	9	C. albicans(8)	C. albicans		I	X
18	5	C. parapsilosis (2)/ C. albicans(3)	-		VII/IV	-
19	1	C. albicans	-		I	-
20	6	C. albicans(4)	C. albicans	C. albicans	V	-
21	1	C. krusei	-		X	-
22	2	C. albicans(2)	-		VI	-
23	2	-	C. parapsilosis	C. parapsilosis	IX	X
Total	54	36	12	6	-	-

P : número do paciente ; n : número de amostras; x : evolução para óbito.

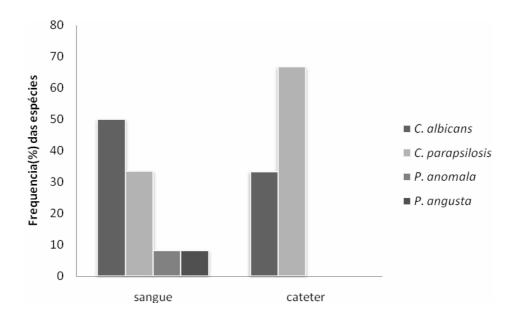


FIGURA 1 - Frequência (%) das espécies de leveduras isoladas do sangue e cateter de neonatos internados na UTIN do Hospital Terciário de São Paulo.

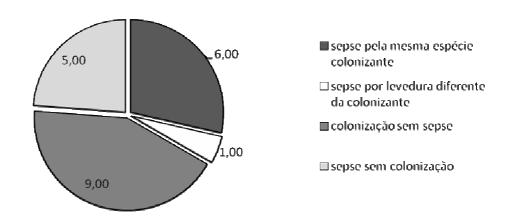


FIGURA 2 - Distribuição dos neonatos internados na UTIN do Hospital Terciário de São Paulo com relação a colonização oral e a sepse.

4.6 Óbitos dos neonatos

Dos 23 neonatos com cultura positiva para leveduras, 48% (11/23) evoluíram para óbito. Destes 11 óbitos, 91,0% (10/11) foram decorrentes da sepse. Um neonato que evoluiu para óbito, não desenvolveu sepse, porém tinha colonização oral. Existiu uma correlação positiva entre ocorrência de fungemia (candidemia) e evolução para o óbito, sendo que o risco relativo da ocorrência de fungemia para o óbito foi de 94,17, sendo esta observação estatisticamente significativa (p<0,05) (FIGURA 3).

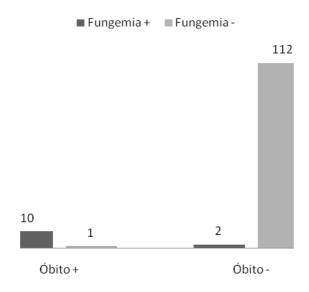


FIGURA 3 - Comparativo entre presença de candidemia e evolução para o óbito. Análise estatística realizada segundo o teste exato de Fisher (p<0,05).

4.7 Associação entre colonização oral, sepse e óbito

Dos 6 neonatos que apresentaram colonização oral e sepse pela mesma espécie, 66,7% (4/6) morreram. O neonato que apresentou colonização oral com sepse por outra espécie levedura evoluiu para óbito. Dos 11 neonatos que apresentavam colonização oral sem o desenvolvimento da sepse, 18% (2/11) faleceram e dos 5 neonatos com septicemia, porém, sem colonização oral, 80% (4/5) faleceram (TABELA 2). Observou-se uma correlação positiva entre colonização oral por leveduras e evolução para fungemia, sendo que o risco relativo (*RR*) da colonização oral em relação a fungemia foi de 8,32 quando

comparado com pacientes sem colonização oral, sendo esta observação estatisticamente significativa (P<0,05). (FIGURA 4).

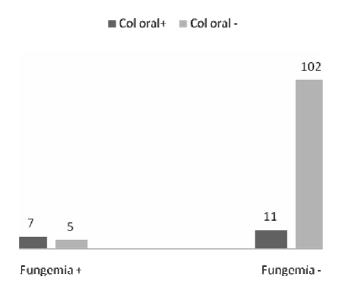


FIGURA 4 - Comparativo entre colonização oral e fungemia. Análise estatística realizada segundo o teste exato de Fisher (p<0,05). Col.: colonização

4.8 Frequência das espécies de leveduras associadas à sepse e que evoluíram para óbito

Dos 12 neonatos com sepse, 6 casos foram por *C. albicans*, na qual 70,0% (4/6) evoluíram para óbito, sendo que de 4 neonatos com sepse por *C. parapsilosis*, todos evoluíram para óbito. Os dois neonatos, um com sepse por *P. anômala* e outro por *P. angusta* também evoluíram para óbito (TABELA 2).

4.9 Peso de nascimento do neonato, sepse e óbito

Destes 23 recém-nascidos com cultura positiva para leveduras, 9 nasceram com peso < 1000g (Pacientes P1 ao P9), 6 com peso entre 1000 e 1500g (P10 ao P15) e 8 nasceram com peso > 1500 g (P16 ao P23) (TABELAS 2 e FIGURA 5).

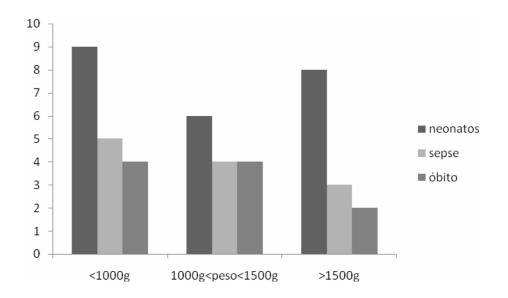


FIGURA 5 - Distribuição numérica das sepses e evolução para óbito de acordo com o peso dos 23 neonatos internados na UTIN do Hospital Terciário de São Paulo.

Neonato abaixo de 1000 g possui RR (risco relativo) de 2,8 em para a ocorrência de colonização oral e de 2,75 vezes em relação a evolução para o óbito. Neonato abaixo de 1500 g possui Risco Relativo de 2,06, ou seja 2 vezes maior probabilidade de evoluir para o óbito do que aqueles com peso acima de 1500g.

4.10 Diferenciação entre C. albicans e C. dubliniensis

Testes fenotípicos e genotípicos para a diferenciação de C. albicans e C. dubliniensis. Através dos testes fenotípicos para diferenciar C.albicans de C. dubliniensis, constatamos que todas as 34 amostras classificadas como C. albicans apresentaram cor verde claro no meio cromogênico e crescimento a 42 °C. Quanto ao teste genotípico, através da técnica de PCR, obtivemos o produto da reação específico para C. albicans pela presença da banda de 175 pb em 100% das amostras. Portanto, não ocorreu isolamento de C. dubliniensis.

4.11 Cariotipagem (eletroforese em campo pulsátil - PFGE) das amostras de *Candida*

Quanto ao perfil molecular foram avaliadas somente amostras de *Candida* em um total de 47 amostras. Dos 23 neonatos estudados, 87,0% (20/23) estiveram colonizados e/ou com sepse por *Candida spp*.

4.11.1 PFGE tipos

A técnica de cariotipagem mostrou diferenças inter e intra-específicas com relação às amostras de *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Encontramos 10 perfis genotípicos, os quais denominamos de PFGE-tipos e categorizamos em número romano. Para *C. parapsilosis* encontramos 3 PFGE-tipos: VII,VIII e IX, que variaram de 3 a 5 bandas. Para *C. albicans* encontramos 6 PFGE-tipos: I,II,III,IV,V,VI cujas bandas variaram de 3 a 6. *C. krusei* demonstrou o PFGE-tipo X com 3 bandas. A TABELA 3 mostra as amostras de leveduras de acordo com seus PFGE tipos.

TABELA 3 - Distribuição dos PFGE-tipos dentre as amostras de *Candida* isoladas de neonatos internados na UTIN do Hospital Terciário, São Paulo.

-				
Espécies (n)	Ν	Tipos de	nº de	Variação de
		PFGE	bandas	peso
				molecular*
Candida albicans				
(34)				
	10	1	4	1020 a 2200kb
	1	II	4	1125 a 2200kb
	1	III	4	945 a 2200kb
	3	IV	4	945 a 2200kb
	16	V	5	825 a 2200kb
	3	VI	6	825 a 2200kb
C. parapsilosis (11)				
	2/ 18,2	VII	4	825 a 2200kb
	5/ 45,5	VIII	3	945 a 2200kb
	4/ 36,3	IX	5	825 a 2200kb
C. krusei (2)				
, ,	2/ 100	X	3	1020 a 2200kb

n : número de amostras; *Variação de peso molecular, de acordo com o padrão S. cerevisae (Bio Rad).

4.11.2 Colonização oral

Dos 20 neonatos analisados quanto ao perfil molecular de suas amostras de *Candida*, 13 estiveram colonizados por *C. albicans* e as amostras apresentaram os perfis genotípicos de I a VI, ou seja, dois neonatos estiveram colonizados com amostras de *C. albicans* com perfil molecular PFGE tipo I; um neonato com PFGE tipo II; um neonato com PFGE tipo III e um neonato com colonização oral por amostra de *C. albicans* PFGE tipo IV. Seis neonatos apresentaram PFGE tipo V e dois por PFGE tipo VI. Para os neonatos colonizados com *C. parapsilosis*, um neonato apresentou amostra com perfil molecular PFGE tipo VIII e outro neonato com amostra PFGE tipo VII (TABELA 2 e 3).

4.11.3 Sepse

Dos neonatos analisados quanto ao cariótipo, 10 apresentaram casos de sepse por *Candida* durante o período de estudo. Destes 10 neonatos, 6 apresentaram sepse por *C. albicans*, as quais apresentaram perfil molecular PFGE tipo I (um neonato) e cinco neonatos apresentaram amostra com perfil molecular tipo V. Nos 4 casos de sepse por *C. parapsilosis*, um neonato apresentou amostra PFGE tipo VII; um neonato com amostra PFGE tipo VIII e dois neonatos com amostras PFGE tipo IX (TABELA 2 e 3).

4.11.4 Cateter

Dos 20 neonatos analisados, 6 utilizavam cateteres sendo que 4 foram colonizados *C. parapsilosis* PFGE tipos VII, VIII e IX . Estes neonatos são os mesmos que apresentaram sepse por *C. parapsilosis*. Os outros dois cateteres estavam colonizados por *C. albicans* PFGE tipos V.

4.11.5 Associações moleculares

A associação molecular entre a amostra de colonização oral e de sepse foi observada em 6 neonatos, ou seja, um neonato que apresentou colonização oral e sepse por *C. parapsilosis* demosntrou PFGE tipo VIII . Dos 5 neonatos que apresentaram *C. albicans* na colonização oral e sepse, quatro

demonstraram PFGE tipo V e um neonato PFGE tipo I . Convém ressaltar que as amostras seqüenciais da colonização oral isoladas de um mesmo neonato tiveram PFGE tipo similares. E estas amostras de leveduras apresentaram o mesmo PFGE tipo da respectiva amostra isolada de sepse e/ou cateter. (TABELA 2).

Houve correlação positiva entre a colonização de *C. albicans*, PFGE tipo V e o desenvolvimento de sepse apresentando *RR* de 9,92. (FIGURA 6). Também houve correlação positiva entre a ocorrência de fungemia por *C. albicans* PFGE tipo V e evolução para o óbito apresentando RR de 13,71 (FIGURA7) assim como correlação positiva entre neonato com sepse por PFGE tipo IX de *C. parapsilosis* e evolução para óbito com *RR* de 13,67 (p<0,05) (FIGURA 8). Os demais agentes isolados não mostraram resultados significativos (TABELA 2 e FIGURAS 6, 7 e 8).

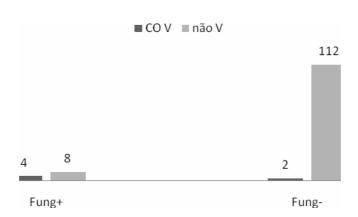


FIGURA 6 - Comparativo entre a presença de *C. albicans* PFGE tipo V e sepse. Análise estatística realizada segundo o teste exato de Fisher (p<0,05).CO V: colonização por PFGE tipo V de *C. albicans*; não V: colonização por demais PFGE tipos.

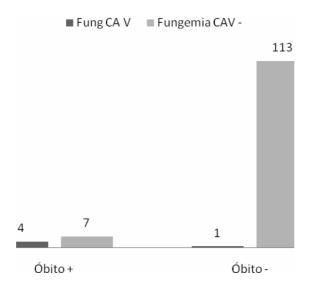


FIGURA 7. Comparativo entre a fungemia por *C. albicans* PFGE tipo V e evolução para óbito. Análise estatística realizada segundo o teste exato de Fisher (p<0,05). Fung CA V: Fungemia por *C. albicans* PFGE tipo V. Fungemia CAV-: fungemia por demais PFGE tipos.

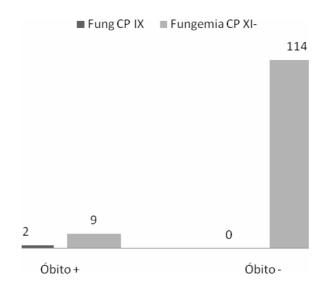


FIGURA 8 - Comparativo entre a fungemia por *C. parapsilosis* PFGE tipo XI e evolução para óbito. Análise estatística realizada segundo o teste exato de Fisher (p<0,05). Fung CP IX: fungemia por *C. parapsilosis* PFGE tipo IX; Fungemia CP IX- : outros tipos de PFGE tipo de *C. parapsilosis* .

Na FIGURA 9, o neonato P17 apresentou colonização oral por *C. albicans*, cerca de um mês, antes do desenvolvimento da infecção sanguínea. Foi tratado com anfotericina B, obteve melhora clínica, porém, ainda assim apresentou colonização oral por *C. albicans*. Trinta dias depois, desenvolveu

novamente sepse e evolução para óbito (TABELA 2). As amostras sequenciais da cavidade oral isoladas do neonato P17 com amostra isolada da sepse por *C.albicans* mostrou o PFGE tipo I. As linhas de 2 a 7 demonstram os perfis moleculares de *C. albicans* isoladas, semanalmente, da cavidade oral. A linha 8 corresponde ao perfil molecular da amostra de levedura isolada de sangue do mesmo paciente com sepse após a prévia colonização oral (FIGURA 9).

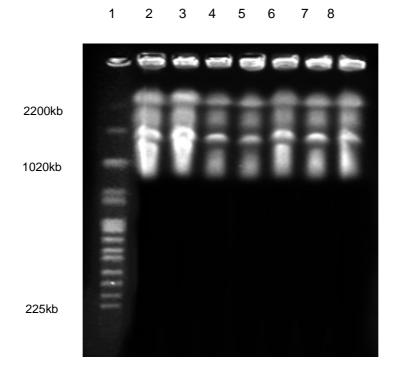


FIGURA 9 - PFGE tipo I das amostras de Candida albicans isoladas de um único neonato - P17. Linha 1: Padrão de peso molecular de Saccharomyes cerevisae (Bio Rad); Linhas 2 a 7: correspondem aos perfis genotípicos - PFGE tipo I das amostras isoladas da cavidade oral; Linha 8: corresponde ao perfil genotípico da amostra isolada do sangue.

A Figura 10 mostra os perfis moleculares similares (Tipo VIII) das amostras isoladas de cavidade oral, sangue e cateter do neonato P3 com sepse por *C. parapsilosis*.

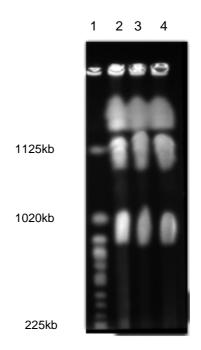


FIGURA 10 - PFGE tipo VIII das amostras de *C. parapsilosis* isoladas de um único neonato P3. Linha 1: Padrão de peso molecular *S. cerevisae;* Linha 2: amostra proveniente da hemocultura; Linha 3: amostra proveniente do cateter; Linha 4:amostra proveniente da cavidade oral.

Os neonatos P15 e P23 estavam internados no mesmo setor com suas incubadoras lado a lado no mesmo período, sendo que o neonato P15 foi a óbito. Estes neonatos não apresentaram colonização oral (TABELA 2, FIGURA 11).

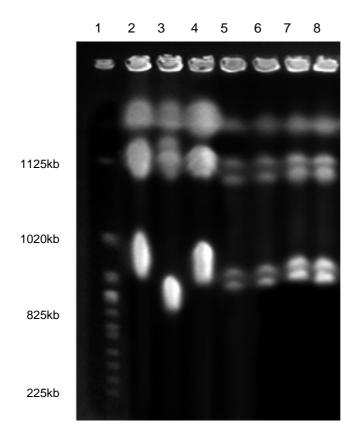


FIGURA 11. PFGE -tipos das amostras de *C. parapsilosis* isoladas dos neonatos.

1.Perfil molecular de S. cerevisae; 2. PFGE tipo VIII da amostra isolada do cateter de P3; 3. PFGE tipo VII da amostra isolada da cavidade oral de P4; 4. PFGE tipo VIII da amostra isolada de sangue de P3; 5 : PFGE tipo IX da amostras isolada de cateter; 6 : PFGE tipo IX da amostras isolada de sangue de P15; 7: PFGE tipo IX da amostra isoladas de cateter de P23; 8: PFGE tipo IX da amostra isoladas de sangue de P23.

A FIGURA 12 mostra alguns PFGE tipos de *C. albicans* isoladas de neonatos. PFGE tipo V foi o mais freqüente (TABELA 2 e FIGURA 12).

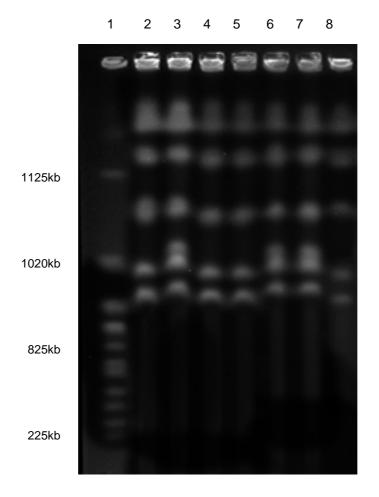


FIGURA 12 – PFGE tipos de *C. albicans*. 1: Padrão de peso molecular de *Saccharomyces cerevisae*; linhas 2, 4, 5 e 8: PFGE tipo V dos neonatos P4,P5,P7 e P11; linha 3: PFGE tipo VI do neonato P14; linhas 6 e 7: PFGE tipo VI dos neonatos P22.

4.12 Verificação da atividade enzimática – proteinase e fosfolipase

Com relação à produção de enzimas, 37,0% das 54 amostras de leveduras isoladas apresentaram reação positiva para proteinase e 50% para fosfolipase (índice 2) ao passo que 14.8% apresentaram atividade fortemente positiva para proteinase (índice 3), enquanto que somente 3.7% apresentaram fosfolipase fortemente positiva. Do total das 34 amostras de *C. albicans*, 13 produziram proteinase positiva (índice 2) e 27 amostras foram positivas para fosfolipase (índice 2). Em se tratando dos isolados de *C. parapsilosis* observamos que, do total de 11 amostras, 7 (63,6%) foram positivas e 3 (27,3%) fortemente positivas para proteinase sendo todas isoladas de sangue

e cateter . Estas amostras de *C. parapsilosis* não apresentaram atividade para fosfolipase.(TABELA 4).

As culturas de *P. anômala, P. angusta* e *Rhodotorula rubra* não apresentaram atividade enzimática. A levedura *Trichosporon asahii* apresentou atividade proteolítica índice 3 (TABELA 4).

As culturas de *P. anômala, P. angusta* e *Rhodotorula rubra* não apresentaram atividade enzimática. A levedura *Trichosporon asahii* apresentou atividade proteolítica índice 3 (TABELA 4).

TABELA 4 - Atividade de proteinase e fosfolipase presente nas amostras leveduriformes isoladas dos neonatos hospitalizados na UCIN, Hospital Terciário, São Paulo.

Espécies de leveduras Índice de atividade enzimática(Pz)							
	1		2		3		
	PRO	FOS	PRO	FOS	PRO	FOS	Total
Candida albicans	21	5	13	27	-	2	34
C. parapsilosis	1	11	7	-	3	-	11
C. krusei	1	2	-	-	1	-	2
Trichosporon asahii	-	4	-	-	4	-	4
Pichia anômala	1	1	-	-	-	-	1
Pichia angusta	1	1	-	-	-	-	1
Rhodotorula rubra	1	1	-	-	-	-	1

Pro: atividade proteolítica; Fos: atividade fosfolipídica; Pz: valores da atividade enzimática de acordo com Price et al⁵⁵, índice 1= ausência de atividade enzimática; índice 2 representa atividade enzimática positiva 0.64≤ Pz⋅1; índice 3 representa atividade enzimática fortemente positiva Pz⋅0.64.

Das 36 amostras isoladas de colonização oral, 25% (9/36) das amostras produziram proteinase índice 2 (positiva) sendo 7 amostras de *C. albicans* e 2 de *C. parapsilosis*. Uma amostra de *C. krusei* e 4 amostras de *Trichosporon asahii* produziram proteinase índice 3 (fortemente positiva).

Das 36 amostras de colonização oral, 55,6% (20/36) das amostras produziram fosfolipase índice 2 e uma amostra apresentou fosfolipase índice 3, todas sendo *C. albicans*.

Das 12 amostras isoladas nos casos das 12 sepses, 66,7% (8/12) produziram proteinase índice 2, sendo 5 amostras de *C. albicans* e 3 amostras de *C. parapsilosis*. Uma única amostra de *C. parapsilosis* produziu índice 3

pela mesma enzima. Das 12 amostras isoladas de casos de sepse, 41,7% (5/12) produziram fosfolipase índice 2 e uma amostra produtora de fosfolipase índice 3, todas *C. albicans*.

Das 6 amostras isoladas de cateter, 50% (3/6) produziram proteinase índice 2 sendo uma amostra de *C. albicans* e duas amostras de *C. parapsilosis*. Duas amostras de C. parapsilosis (33,4%) produziram proteinase índice 3. Quanto a produção de fosfolipase, duas amostras de *C. albicans* isoladas de cateter produziram fosfolipase índice 2. Não houve produção de fosfolipase índice 3 nas amostras de cateter.

Nenhuma amostra de *C.albicans* produziu proteinase índice 3. Somente *C. albicans* produziu fosfolipase. Todas as amostras de *C. parapsilosis* isoladas de sangue e cateter produziram proteinase (índice 2 ou 3). Todas as amostras de *C. albicans* isoladas de cateter e sangue foram produtoras de fosfolipase.

Todas as amostras isoladas de sangue e cateter produziram pelo menos uma das enzimas (proteinase e/ou fosfolipase).

4.13 Sensibilidade às drogas antifúngicas -Técnica do E-test

Os dados de sensibilidade aos fármacos estão mostrados na TABELA 5 Todas as amostras de *Candida* e *Pichia* foram sensíveis frente aos antifúngicos estudados de acordo com os "breakpoints" da CIM recomendado para fluconazol (CIM ≥64µg/mL-resistente) pelo documento M27- A2, 2002 voriconazol (CIM ≥4µ/mL-resistente) pelo documento M27-S3, 2008. A maior CIM 50 do fluconazol foi de *C. albicans* seguida de *C. parapsilosis*. A maior CIM 90 do fluconazol foi obtida para *C. krusei* seguida de *C. albicans* e *C. parapsilosis*. *C. albicans* também mostrou a maior CIM50 para voriconazol, sendo para *C. parapsilosis* obteve-se as maiores CIM50 para cetoconazol, itraconazol e anfotericina B. Todas as amostras testadas (*Candida spp, Pichia angusta, P anômala e Rhodotorula rubra*) apresentaram sensibilidade às drogas segundo o método do E-test e os critérios do M27-S3, 2008.

Para *Pichia anomala* foram observadas as seguintes CIMs: fluconazol 0.75 μg/mL; voriconazol 0.002 μg/mL; itraconazol 0.032 μg/mL; cetoconazol 0.047 μg/mL e anfotericina B 0.032 μg/mL. Para *Pichia angusta* os seguintes valores foram encontrados: fluconazol 0.50 μg/mL; voriconazol 0.002 μg/mL; itraconazol 0.125 μg/mL; cetoconazol 0.047 μg/mL; anfotericina B 0.023 μg/mL.

Para *Rhodotorula* os valores de CIM foram: fluconazol $0.064~\mu g/mL$; voriconazol $0.003~\mu g/mL$; itraconazol $0.004~\mu g/mL$; cetoconazol $0.012~\mu g/mL$; anfotericina B $0.047~\mu g/mL$.

TABELA 5 - Sensibilidade antifúngica das espécies de *Candida* spp isoladas dos neonatos internados em UTIN do Hospital Terciário, São Paulo.

	CIM (µg/mL)				
Espécies (n°)	Agente antifúngico	CIM 50	CIM 90	CIM Range	
C. albicans(34)	Fluconazol	0.39	0.60	0.016-0.75	
	Voriconazol	0.005	0.02	0.002-0.032	
	Itraconazol	0.002	0.27	0.004-0.32	
	Cetoconazol	0.003	0.009	0.002-0.012	
	Anfotericina	0.012	0.27	0.008-0.38	
	Caspofungina*	0.079	0.48	0.023-0.50	
C. parapsilosis	Fluconazol	0.24	0.59	0.064-0.75	
(11)	Voriconazol	0.004	0.02	0.003-0.023	
	Itraconazol	0.013	0.37	0.004-0.125	
	Cetoconazol	0.006	0.018	0.003-0.023	
	Anfotericina	0.090	0.19	0.008-0.16	
	Caspofungina	0.35	0.40	0.25-0.50	
C. krusei(2)	Fluconazol	0.125	0.625	0.125-0.75	
	Voriconazol	0.002	0.0036	0.004	
	Itraconazol	0.032	0.04	0.032-0.047	
	Cetoconazol	0.004	0.02	0.0040023	
	Anfotericina	0.008	0.25	0.008-0.32	
	Caspofungina	0.023	0.40	0.047-0.50	

(nº): número de isolados ; CIM: Concentração inibitória mínima * : com número de amostras igual a 31.

5.1 Infecção hospitalar por leveduras em neonatos

O hospital é um espaço particular, onde a internação concomitante de indivíduos debilitados, imunodeprimidos, a constante necessidade da realização de procedimentos invasivos, o uso de antimicrobianos e a presença e rotatividade da equipe de saúde formam o conjunto de um ambiente ideal, para maior probabilidade de transmissão de infecções fúngicas. O avanço tecnológico tem permitido o tratamento de doenças consideradas incuráveis no passado, porém o paciente tornou-se mais suscetível às infecções.(CAREY et al., 2008).

Embora o estudo da candidíase disseminada seja bem conhecido em pacientes adultos, os relatos das infecções fúngicas em neonatos são relativamente recentes (CAREY et al., 2008).

Estudos realizados a partir do ano 2000, em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal, têm destacado a importância da Candida spp, que ocupa a terceira e quarta posição como causa de sepse neonatal tardia (que ocorre após 72 h de vida) (STOLL et al., 2002). A ocorrencia varia de 2.2%-12.9% entre as crianças de baixo peso (< 1500g) e de 5.5% a 16.5% entre as crianças de muito baixo peso (<1000g) (CAREY et al., 2008). Em nosso estudo, obtivemos uma ocorrência de sepse fúngica, nestes 9 meses, de 9,6%, sendo esta porcentagem mais alta que as encontradas em algumas UTINs. ocorrência fúngica em neonatos foi maior do que dados acumulados no CDC (Centers of Disease Control) na qual a ocorrencia de candidemia entre 1995 a 1999 foi de 3,51% e entre 2000 a 2004 foi de 2,68% (KOSSOFF et al., 1998; FRIDKIN et al., 2006). A ocorrência de candidemia pode variar de hospital para hospital conforme mostram alguns trabalhos (STOLL et al., 1996; STOLL et al., 2002; FRIDKIN et al., 2006. Em um estudo retrospectivo realizado em um único hospital, Makhoul et al. (2002) verificaram que a ocorrência de sepse fúngica entre 1989 e 1992 variou de 3,8% a 5,6%. A ocorrência de candidemia em nosso trabalho vem de acordo com dados obtidos no trabalho acima anos de 1993 a 1995 cujas porcentagens variaram de 9,6% a 12,9%. Entretanto, nosso resultado foi maior do que os trabalhos publicados no Brasil, como indica França et al. (2008) que relataram uma incidência de 1,27 por 1000 internações em hospital do Paraná. Hinrichsen et al. (2008) em estudo prospectivo, avaliaram a incidência de quatro episódios de candidemia por 1000 admissões

em hospital terciário de Recife no período de setembro de 2003 a março de 2004. Rueda (2009) verificou a incidência de 1,6 casos por 1000 admissões em hospital terciário de Vitória, Espírito Santo. Em São Paulo, a incidência de infecção fúngica sistêmica variou de 0,39 a 0,83 por paciente/dia. Em 4 centros médicos da cidade de São Paulo, a taxa de candidemia foi de 1,66 casos por 1000 admissões (COLOMBO et al., 2007). Em estudo anterior, Colombo et al. (2006) estudaram onze centros hospitalares distribuídos em nove cidades, durante o período de março de 2003 a dezembro de 2004 e verificaram uma incidência de 2,49 por 1000 admissões. Porém, estes estudos incluem pacientes de diferentes UTIs, com raros trabalhos verificando a incidência somente nas UTINs brasileiras.

No presente trabalho, foram estudadas amostras de leveduras isoladas da cavidade oral, sangue, cateter de neonatos de alto risco, internados na UTIN de hospital terciário. *C. albicans* foi a espécie mais isolada dentre o total de amostras (63,0 %) seguida de *C. parapsilosis* (20,5%). Nossos achados corroboram com os achados de vários autores, cujas duas espécies vêm apresentando destaque entre as doenças sistêmicas causadas por fungos em neonatos (CHAPMAN et al., 2003; CLARK et al., 2004; DURAN et al., 2005; CAREY et al., 2008; CARTER et al., 2008).

5.2 Septicemia, colonização oral, uso de cateteres e associações

Em se tratando das 12 amostras provenientes do sangue verificamos que *C. albicans* foi a mais frequente em 50,0% (6/12) dos casos, seguida de *C. parapsilosis*. Em amostras de cateter, *C. parapsilosis* foi a mais freqüente (66,7%), seguida de *C. albicans*. Estes dados estão de acordo com vários trabalhos os quais citam *C. albicans* como a espécie mais frequente seguida de *C. parapsilosis* isoladas de neonatos internados nas UTINs (HUANG et al., 1999; SAIMAN et al., 2001; STOLL et al., 2002; TUMBARELLO et al., 2007; LABELLE et al., 2008), embora alguns trabalhos citem *C. parapsilosis* como sendo a mais freqüente (KOSSOFF et al., 1998; CAGGIANO et al., 2007). No Brasil, autores relatam que *Candida parapsilosis* é a espécie mais frequentemente isolada de sangue e de cateteres intravasculares de crianças (MATSUMOTO et al., 2001; MOREIRA, 2005; MEDRANO et al., 2006). Em um estudo realizado durante o período de 1998 a 2006 na UTIN do hospital

universitário, em Mato Grosso do Sul, Xavier et al. (2008) verificaram que *Candida albicans* foi a espécie mais freqüente em candidemia seguida de *C. parapsilosis*.

Em UTINs onde *Candida albicans* predomina, *C. parapsilosis* tem sido a espécie não – *albicans* mais freqüente entre os recém-nascidos (HAJJEH et al., 2004; ZAOUTIS et al., 2007, PFALLER et al., 2007). Outras, tais como, *C. glabrata* e *C. guillermondi* também tem sido descritas como causadoras de septicemia em neonatos (FAIRCHILD et al., 2002; MANZONI et al., 2007, RUAN et al., 2008; SINGHI et al., 2008). *C. tropicalis* tem sido associada com câncer, em outros grupos de pacientes, porém tem sido descrito casos de surto hospitalar em neonatos (ROILIDES et al., 2003) por esta levedura.

Ainda, com relação às amostras de sangue, isolamos *Pichia anomala e Pichia angusta*, provenientes de sepse seguida de óbito. *Pichia* spp é uma levedura ascosporada que pode ser encontrada em água, solo e fazendo parte da microbiota transitória (KURTZMAN e FELL, 1998). Estudos têm demonstrado que espécies do gênero podem fazer parte da microbiota intestinal e da pele, não sendo um patógeno comum, porém tem sido causa de doença sistêmica neste grupo de pacientes (BAKIR et al., 2004; PAULA et al., 2006). No nosso estudo, dois neonatos apresentavam peso menor que 1000 g, sendo um fator de risco a mais para a infecção. Estes achados estão de acordo com os previamente relatados por BALEY et al., 1984; MANZONI et al., 2006; Benjamin, 2008). Singh et al. (1999) demonstraram que 71% dos neonatos hospitalizados por mais de sete dias foram colonizados por fungos e 22% desenvolveram fungemia com predomínio de *P. anômala* (62.5%). Em nosso trabalho, não encontramos a colonização oral prévia pelas espécies de *Pichia*.

A colonização é o maior fator de risco à infecção fúngica, e sabe-se que a colonização se dá inicialmente na cavidade oral seguida da intestinal (BALEY et al., 1986; HUANG et al., 1998; MANZONI et al., 2006; MANZONI et al., 2007; MANZONI et al., 2008; CATE et al., 2009). A colonização tem sido descrita como o maior fator para desenvolvimento da infecção sistêmica e que pode se apresentar no neonato logo após o nascimento por meio do contato (EL MARSY et al., 2002). O conhecimento dos tipos de leveduras encontradas nas diferentes unidades neonatais pode definir o perfil etiológico de infecções

únicas ou epidêmicas que poderiam acometer os recém-nascidos que ali permanecem (CÉCCON et al., 2009; KREBS et al., 2009). *Candida* spp presente na cavidade oral serve como um reservatório leveduras fato que pode levar este microrganismo para todas as áreas do corpo podendo ocasionar infecção sistêmica (CATE et al., 2009). Uma vez estabelecida a colonização, esta pode servir como fonte de infecção a qual associada a características individuais do paciente e da levedura, determinam a evolução para a sepse.

Dos 125 neonatos estudados, 18 (14,4%) tiveram colonização oral positiva para leveduras. Estes dados são menores do que o estudo de Cerikcioglu et al., 2004, no qual obtiveram 32,8% da colonização oral e dos dados demonstrados por Mendiratta et al. (2006) que obtiveram 42,8% de leveduras na cavidade oral sendo esta o sítio colonizado mais precocemente.

Observamos que leveduras do gênero *Candida* foram as mais encontradas na cavidade oral com 86% (31/36) sendo que *C. albicans* foi a levedura mais encontrada. Esta espécie tem sido descrita como uma das mais freqüentes em colonização, não só da cavidade oral, mas também de amostras provenientes de "swab" retal, pele e trato intestinal. (GIUSIANO et al., 2004; MANZONI et al., 2007; BRECHT et al., 2008).

C. albicans pode colonizar qualquer sítio anatômico do corpo desde a cavidade oral até o reto (STOLL et al., 2002; MANZONI et al., 2006). A entrada da levedura na cavidade oral não é suficiente para a colonização. É necessário que ela consiga se manter no local. A cavidade oral é um local que apresenta um fluxo salivar contínuo onde células leveduriformes são retiradas e deglutidas a menos que consigam se aderir e replicar. Não há praticamente nenhum crescimento na saliva dentro da cavidade oral, a menos que este local esteja em contato com suplementação com glicose (SAMARANAYAKE et al., 1986). Portanto, a adesão é um passo importante para a colonização. Esta aderência é mediada pelas proteínas de superfícies da parede da levedura que interagem com moléculas de superfície da mucosa oral (CANNON e CHAFFIN, 1999). Isto pode explicar a freqüência mais alta desta espécie na cavidade oral dos neonatos. Entretanto, outras espécies de Candida

também são encontradas. Caramalac et al. (2007) estudaram a presença de leveduras da mucosa oral de neonatos e verificaram que *C. guilliermondi* (39,0%) foi a mais freqüente seguida de *C. albicans* (21,0%).

No presente trabalho, *C. krusei* foi isolada da cavidade oral de dois neonatos, mas sem desenvolvimento de sepse, porém esta espécie tem sido encontrada em cavidade oral predispondo à infecção sanguínea em pacientes pediátricos (SINGHI et al., 2008).

Cerikcioglu et al. (2004) realizaram a cultura de vários locais do corpo (axilas, reto, cavidade oral e umbigo) de neonatos com peso < 1500 g e entre 1500 e 2500 g. A colonização oral fúngica foi detectada em 32,8%. Somente 6,2% dos neonatos colonizados desenvolveram septicemia por *C. albicans*.

Apesar das pesquisas mostrarem uma porcentagem maior de colonização oral, comparado ao nosso presente trabalho, nós tivemos uma porcentagem maior de neonatos colonizados e que desenvolveram sepse (BALEY et al., 1986; PAPPU-KATIKANENI et al., 1990; SAIMAN et al., 2000; CERIKCIOGLU et al., 2004). Ou seja, dos 18 neonatos colonizados na cavidade oral, 33,4% (6/18) desenvolveram sepse pela mesma espécie. Tivemos 12 neonatos com sepse no período de estudo. Encontramos colonização prévia em 60% destes casos, sendo que 50% foram por *C. albicans*.

A maior freqüência de *C. albicans* encontrada na colonização oral e associada com a sepse, pode ser explicada, por fenômenos intrínsecos da levedura tais como, adesão, capacidade em mudar a sua forma de levedura em pseudo-hifa e hifa verdadeira, conferindo a esta espécie propriedade invasiva e apresentando assim oportunidade de causar infecção sistêmica (CATE et al., 2009). O maior arsenal de glicoproteínas presentes na parede celular da levedura e as interações moleculares que promovem uma sequência de eventos (formação da hifa, adesão, biofilme e "quorum sensing") são complexos e tem sido estudados por alguns autores (NOBILE e MITCHEL, 2006; CATE et al., 2009).

Nós encontrados outras leveduras na cavidade oral: *Trichosporon asahii* e *Rhodotorula rubra*. A levedura *Trichosporon asahii* tem sido registrada como

causadora de infecção nosocomial, considerada emergente e determinando alta mortalidade. Trichosporon spp está relacionado a lesões benignas, como casos de piedra branca, porém, atualmente, também tem sido considerada infecções leveduras que produzem sistêmicas em indivíduos imunocomprometidos, tendo sido relatada em neonatos (WALSH et al., 2004). Apesar da colonização por Trichosporon ser pouco frequente, a maioria das espécies isoladas são encontradas em pacientes de baixo peso, com uso de antibióticos de largo espectro, tempo de internação prolongado, que pode ocasionar manifestações clínicas inespecíficas e acompanhadas de alta mortalidade. (TÉLLEZ-CASTILLO et al., 2008; CHAGAS-NETO et al., 2008). Em nosso estudo, encontramos um paciente com colonização oral por T. asahii, mas que apresentou infecção sistêmica e óbito por C. parapsilosis. Apesar da colonização ter sido por Trichosporon asahii e a infecção ter sido por C. parapsilosis é imprescindível a atenção no primeiro agente, uma vez que relatos também associam Trichosporon spp com o uso de cateteres (WALSH et al., 2004).

Rhodotorula rubra também foi isolada da cavidade oral de um neonato, mas que não desenvolveu sepse, porém é importante ressaltar que espécies de Rhodotorula tem sido consideradas emergentes causando infecções sistêmicas associadas ao uso de cateteres (ZAAS et al., 2003).

Com relação as amostras isoladas de cateteres, C. parapsilosis foi a Aparentemente, esta levedura não necessita de espécie mais isolada. colonização oral prévia para causar infecção (CARTER et al., 2008). O papel de C. parapsilosis como um patógeno adquirido de fonte exógena e produtor de biofilme, é bem conhecido e tem sido associado à alimentação parenteral, uso de dispositivos invasivos, e soluções contaminadas (MATSUMOTO et al., 2001; ALMIRANTE et al., 2005; ASBECK et al., 2007; CARTER et al., 2008). Apesar de alguns autores mencionarem que a principal fonte de infecção hospitalar por leveduras é a microbiota endógena, alguns autores tem relatado que as mãos dos profissionais de saúde também são considerados como fontes de colonização e infecção, especialmente por *C. parapsilosis* (CELEBI et al., 2008; ASBECK et al., 2007; CARTER et al., 2008). Bonassoli et al. (2005) verificaram a presença de leveduras nas mãos de profissionais de saúde e também de pessoas da comunidade da mesma cidade, verificaram que C.

parapsilosis foi a espécie mais isolada (51%) independente da origem e produtoras de biofilme. Saiman et al. (2001) associou a virulência da levedura à capacidade de aderir a superfícies plásticas e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de candidemia relacionado ao cateter. *C. parapsilosis* é capaz de proliferar em soluções com alta concentração de glicose, produzindo grande quantidade de material extracelular, formando biofilme na superfície do cateter, tendo capacidade de permanência e multiplicação no local, promovendo a sua disseminação (DOUGLAS, 2003; CARTER et al., 2008).

5.3 Mortalidade, espécies de leveduras e peso dos neonatos

Dos 125 neonatos estudados, 12 apresentaram sepse por levedura, dos quais 11 evoluíram para óbito. Portanto, a mortalidade devido a infecção sistêmica por leveduras, no período de estudo, foi de 91.6% (11/12). A mortalidade devido somente ocasionada por espécies do gênero *Candida*, foi de 83,4% (10/12). Este dado foi bem maior do que os achados de Chapman et al. (2003), que relataram uma mortalidade atribuída a candidemia em neonatos de 30%. Sendo assim, os dados encontrados, em nosso trabalho, foram maiores do que vários trabalhos publicados. Estes estudos relatam mortalidade em neonatos por candidemia de 17% (JOHNSSON e EWALD, 2004); entre 26% a 32% (MILLER et al., 2005); e de 52,6% (AGARWAL et al., 2004).

Vários trabalhos relatam que a mortalidade por *C. albicans* é maior do que as ocasionadas por *Candida* não-albicans. Candida albicans é mais virulenta do que as demais espécies e tem sido associada à maior invasão dos órgãos e, consequentemente, com maior mortalidade (BENJAMIN et al., 2003; AVILA-AGUERO et al., 2005; BENJAMIN et al., 2006). A distribuição de *Candida albicans*, ao longo deste estudo, foi maior do que *C. parapsilosis* porém, nos neonatos com sepse por *C. parapsilosis*, todos evoluíram para óbito, independente do peso do neonato. Este fato pode ser devido à característica da própria levedura, como também pela sua entrada no organismo facilitada por meio do cateter.

Também, observamos que a maioria dos neonatos que evoluíram para óbito apresentavam peso < 1500g. Por meio da estatística, observamos que neonatos com peso <1500g, quando apresentam septicemia, tem 2 vezes mais

probabilidade em evoluir para óbito. Nossos dados corroboram com Fratarelli et al. (2004) na qual 2-4,5% dos pacientes que pesaram abaixo de 1500g desenvolveram infecção fúngica do qual 50% dos casos foram fatais.

Obervamos também, por meio de estatística, que neonatos com peso < 1000 gramas tem 3 vezes mais probabilidade de apresentar colonização fúngica. Verificamos, por meio das Figuras 3 e 4, que pacientes com presença de colonização oral tem 8 vezes mais probabilidade em desenvolver sepse. Neonato com candidemia (sepse) tem 94 vezes mais probabilidade em evoluir para óbito. Portanto, neonatos com peso < 1000g apresenta alto risco em evoluir para óbito devido a colonização oral. Estes dados corroboram com vários trabalhos os quais evidenciam que pacientes com peso < 1000 g são extremamente vulneráveis à infecção fúngica e, consequentemente, à óbito (STOLL et al., 2002; MANZONI et al., 2007). A incidência por leveduras aumenta conforme diminui o peso dos neonatos, facilitando a colonização e promovendo maior oportunidade ao desenvolvimento da sepse acompanhada de alta mortalidade (BALEY et al., 1986; BENJAMIN et al., 2000; MAKHOUL et al., 2002; BENJAMIN et al., 2006). Su et al., 2007 verificaram que os neonatos que evoluíram para óbito, com infecção por Candida spp apresentavam peso < 750 gramas. Pacientes criticamente enfermos, duração do tempo de internação, insuficiência renal, respiratória e neutropenia já são preditores de mortalidade, como tem sido descrito por diversos autores (GUDLAUGSSON et al., 2003; HAJJEH et al., 2004; ALMIRANTE et al., 2005; AVILA – AGUERO et al., 2005; MANZONI et al., 2006). Estes mesmos fatores são preditores de sepse fúngica que aumenta mais ainda a taxa de mortalidade nas UTINs. No presente trabalho, estes fatores não foram analisados, porém analisamos as espécies de leveduras e seus tipos moleculares.

5.4 Caracterização molecular das leveduras

A colonização oral e de cateter associada à infecção tem sido demonstrada por meio das técnicas moleculares (CERIKCIOGLU et al., 2004; SHIN et al., 2005; BLISS et al., 2008). Esta interação tem contribuído para o conhecimento dos tipos e fontes de transmissão (ROILIDES et al., 2003; ASBECK et al., 2007; BLISS et al., 2008; TAY et al., 2009). Desta maneira, nós

estudamos as amostras com a finalidade de elucidar os prováveis tipos de transmissão dentro da UTIN do Hospital Terciário de São Paulo.

5.4.1 Diferenciação de C.albicans e C. dubliniensis

Todas as amostras de leveduras identificadas fenotipicamente como sendo C. albicans foram testadas para a diferenciação de C. dubliniensis. Esta espécie tem sido associada com candidíase oral em indivíduos HIV postitivos e pacientes com Aids (SULLIVAN, 2005). Porém, esta levedura já foi isolada em urina, secreção vaginal e sangue de pacientes não - HIV. Desta maneira, utilizamos outras técnicas fenotípicas e genotípicas para diferenciá-las, uma vez que são, através da identificação fenotípica tradicional semelhantes (GIAMMANCO et al., 2002). Todas as nossas amostras foram confirmadas serem da espécie C. albicans por meio da técnica de PCR. Este resultado está de acordo com a baixa incidência de C. dubliniensis no Brasil (MARIANO et al., 2003; CHAVASCO et al., 2006), bem como pode ser explicado devido ao fato de pacientes HIV utilizarem antifúngicos. C. dubliniensis é mais resistente aos derivados azólicos e alguns autores sugerem que esta espécie pode substituir C. albicans em vários sítios anatômicos do hospedeiro. (MARTINEZ et al., 2002) Este fato, provavelmente, não aconteceria nos neonatos estudados, uma vez que não se empregou azóis como profilaxia somente nos casos após confirmação da infecção ou em casos de tratamento empírico. Baradkar et al. (2008) relataram um caso de sepsticemia por C. dubliniensis, entretanto não encontraram a fonte de infecção.

5.4.2 Marcador Molecular – Técnica de PFGE

A cariotipagem por PFGE (marcador molecular) tem sido descrita como método excelente, com alto poder discriminatório e boa reprodutibilidade (BRANCHINI et al., 1995; DIB et al., 1996; SARACLI et al., 2005). Das 54 amostras isoladas, analisamos as 47 espécies de *Candida*. De acordo com os dados obtidos, a técnica de PFGE mostrou-se ser interespecífica e intraespecífica.

5.4.2.1 Candida parapsilosis

Shin et al., 2005 observaram variabilidade cromossomal em *C.* parapsilosis, não encontrando um perfil predominante. Neste estudo, os perfis

predominantes de *C. parapsilosis* foram PFGE-tipo IX e VII. O PFGE-tipo IX foi obtidos a partir de amostras isoladas de cateteres ou sangue de dois pacientes internados no mesmo período (P15 e 23, TABELA 2 e FIGURA 11). O PFGE-tipo VII foi isolado de cavidade oral de um paciente sem desenvolvimento de sepse (P18, TABELA 2); e de sangue e cateter de outro paciente (P10, TABELA 2). Os dados moleculares obtidos, juntamente com dados da literatura, sugerem que *C. parapsilosis* pode ter causado infecção sistêmica nos pacientes P10, P15 e 23 a partir de fonte exógena.

Observamos apenas um caso de colonização oral prévia por *C. parapsilosis* seguida de sepse confirmada por técnica molecular, apresentando perfil genotípico VIII (P3, TABELA 2). Neste caso, as amostras da cavidade oral, cateter e hemocultura apresentaram perfis genotípicos similares (FIGURA 10). É provável que a levedura tenha colonizado inicialmente a cavidade oral e por via endógena alcançado o sangue e cateter, como já descrito anteriormente por Klempp-Selb et al. (2000). Porém, não devemos esquecer que a epidemiologia de *C. parapsilosis* é complexa e que muitas vezes envolvem pacientes e a equipe médica. Devido a sua habilidade em aderir a materiais plásticos hospitalares,como já ressaltamos, é possível que este isolado tenha sido oriundo de fonte exógena e que teve a oportunidade de aderir a materiais veiculados ao neonato por meio das mãos da equipe médica ou por meio de aparelhos hospitalares contaminando a cavidade oral do paciente.

5.4.2.2 Candida albicans

Por meio da técnica de PFGE observamos associação dos perfis genotípicos das amostras de *C. albicans* isoladas do mesmo paciente e oriundas da cavidade oral, sangue e cateter com perfil genotípico I (P17, Tabela 2, Figura 9).

Em sete neonatos estudados, verificamos que 30,0% (16/47) das amostras avaliadas por meio da técnica de PFGE apresentaram perfis similares (PFGE tipo V) distribuídos entre cavidade oral, cateter e hemocultura. Todos estes sete neonatos estavam internados no mesmo setor e mesmo período, sugerindo que a aquisição da levedura tenha sido de fonte comum, fato já descrito em trabalhos anteriores (HUANG et al., 1998; HUANG et al., 2004). Verificamos que no prazo de uma semana, 6 destes 7 neonatos foram

colonizados pela levedura PFGE tipo V (P 4,5,7,11,12 e 20; TABELA 2). Destes 6, quatro desenvolveram sepse (P 4,5,11 e 20; TABELA 2) os quais dois destes foram a óbito (P4 e 11). Devemos salientar que o estudo foi realizado na cavidade oral que é, também, um sítio exposto a fontes externas. Isto poderia explicar a presença frequente do PFGE tipo V de *C. albicans*.

Neste estudo, outro neonato sofreu sepse sem colonização oral positiva (P13, TABELA 2). Neste caso, é provável que *C. albicans* PFGE tipo V tenha invadido a corrente sanguínea do neonato de outra maneira. *C. albicans* tem sido estudada quanto a formação de biofilmes por meio de testes "in vitro" (TUMBARELLO et al., 2007).

Com exceção do PFGE tipo V e I, nenhum outro PFGE tipo de *C. albicans* foi isolada causando sepse.

Com os dados representados pelas FIGURAS 6 e 7, notamos que, neonatos colonizados com *C. albicans* PFGE – tipo V tiveram 10 vezes mais probabilidade para desenvolver septicemia e 13 vezes mais probabilidade em evoluir para óbito. Os neonatos com *C. albicans* com PFGE tipo V apresentaram maior número de sepse e óbito, porém salientamos que seis deles apresentaram peso inferior a 1500 gramas, ao passo que neonatos com isolados de *C. albicans* PFGE tipo VI apresentaram peso superior a 1500 gramas. Portanto, nestes casos, tanto os fatores relacionados a virulência da levedura, como o baixo peso do neonato podem ter influenciado na morbidade e mortalidade dos pacientes.

Dois neonatos, com suas incubadoras lado a lado, apresentaram mesmo marcador molecular PFGE tipo VI para *C. albicans* encontrada na cavidade oral sem sepse (P14 e 22; Tabela 2, Figura 12). Este fato pode estar relacionado a característica da levedura como fatores relacionados a virulência, ou outros que influenciam na sepse destes pacientes. Quanto a apresentarem o mesmo PFGE tipo, pode ser devido a manipulação de um neonato e logo após a manipulação do, outro; bem como pode ser devido ao perfil molecular similar de uma levedura endógena.

As demais amostras de *C. albicans* isoladas da cavidade oral, do sangue ou cateter com outros PFGE-tipos (I, II, III e IV) foram encontrados em pacientes internados em setores e períodos diferentes. Sugerimos que estas amostras possam ser de origem endógena.

Desta maneira, a técnica de PFGE foi o rastreamento de transmissões como também alguns autores citam (HUANG et al., 2004; SHIN et al., 2007). Seria interessante a padronização da técnica molecular e homogeinização dos PFGE tipos. Assim, poderíamos comparar nossos achados moleculares com os PFGE tipos encontrados em outros trabalhos e, realizados do mesmo modo, a fim de conhecermos melhor a epidemiologia molecular mundial das espécies de *Candida*.

5.4.3 Produção de exoenzimas (proteinase e fosffolipase) relacionadas à virulência

O aumento da sobrevida dos neonatos reforça a importância quanto a assistência deste grupo vulnerável, bem como as dificuldades encontradas para a prevenção e controle das infecções por fungos.

Desta maneira, tem-se notado uma maior necessidade em se estudar os fatores de patogenicidade das leveduras com o intuito de melhor compreensão dos mecanismos pelos quais os fungos causam a doença. Deste modo, auxiliar no desenvolvimento de novas propostas terapêuticas. Um dos fatores estudados foi a produção de exoenzimas, tais como proteinases e fosfolipases.

Dentre as amostras isoladas da colonização, somente as amostras de *Trichosporon asahii* e uma de *C. krusei* produziram proteinase fortemente positiva (índice 3), porém sem desenvolver septicemia nos neonatos. E 25% das amostras da colonização oral produziram proteinase positiva (índice 2), mas sem associação com o desenvolvimento da sepse.

Nossos dados mostraram que, das 26 amostras de *C. albicans* isoladas da colonização oral, somente 7 amostras (27%) produziram proteinase positiva. Porém, das 6 amostras de *C. albicans* isoladas de sangue de neonatos com septicemia, 86,4% produziram esta enzima.

Desta maneira, estudos mostram que a proteinase tem apresentado um papel importante na virulência (MATSUMOTO et al., 2001; SILVA et al., 2007). Matsumoto et al. (2001) mostraram que 87,5% das amostras de *C. albicans* isoladas de sangue e cateter produziram proteinase fortemente positiva. Silva et al. (2007) mostraram que 92,8% das amostras de *C. albicans* isoladas de candidúria produziram proteinase. Alguns estudos mostram que a atividade proteolítica extracelular é um fator de virulência importante em *C. albicans* e

está associada com as proteínas aspárticas secretadas (SAPs), que são codificadas por uma família de pelo menos 10 genes expressando, 10 tipos diferentes de proteinases. Estas enzimas assumem papéis variados durante o processo de infecção no hospedeiro, uma vez que cada uma delas tem funções diferentes, como por exemplo, SAP2, SAP 9 são fortemente expressas nas infecções sistêmicas (SCALLER et al., 2005).

Em nosso estudo, observamos que, das amostras de *C. parapsilosis* 91,0% produziram proteinase, ou seja, 63,3% (7/11) índice 2 e 27,3% (3/11) índice 3, o que contradiz alguns estudos, os quais relataram que espécies não – *albicans* não são produtoras ou com baixa produção de proteinase quando comparadas às *C. albicans* (GOKCE et al., 2007; RORIG et al., 2009). Todas estas amostras com produção de proteinase foram isoladas de cateter e sangue. Nossos dados corroboram com os de Bonassoli et al. (2005) na qual todas as *C. parapsilosis* estudadas foram produtoras de proteinase. Matsumoto et al. (2001) observaram que 96,4% das suas amostras de *C. parapsilosis* isoladas de sangue e cateter produziram proteinase fortemente positivas.

Nenhuma outra espécie de levedura salvo *C. albicans*, apresentou atividade fosfolipídica. Este dado corrobora com os achados de Ibrahim et al. (1995) que mostra somente *C. albicans* como produtora da enzima. Em nosso estudo, das 26 amostras de *C. albicans*, isoladas da cavidade oral, 77,0% mostraram atividade fosfolipídica índice 2 e uma amostra foi fortemente positiva para esta enzima. A maioria das amostras de *C.albicans* isoladas na cavidade oral foram mais produtoras de fosfolipase do que de proteinase.

Todas as amostras de *C. albicans* isoladas de cateter e sangue foram produtoras de fosfolipase positiva ou fortemente positiva, ao passo que nem todas estas mesmas amostras foram produtoras de proteinase.

Nós também observamos que, das 5 amostras de *C. albicans* que colonizaram na cavidade oral dos neonatos (P4,5,11,17 e 20) e que depois desenvolveram sepse, 4 (80%) apresentaram produção de fosfolipase, incluindo a amostra fortemente positiva.

A fosfolipase está presente na extremidade da forma filamentosa desta levedura e está relacionado com maior capacidade em invadir o tecido. Algumas funções da fosfolipase durante a infecção têm sido postuladas, entre

elas: penetração à célula do hospedeiro, adesão às células epiteliais e invasão de epitélio oral humano (SCHALLER et al., 2005).

Observamos que amostras de *C. albicans* isoladas de colonização oral e posteriormente do sangue do mesmo neonato apresentavam PFGE tipo V e produziram proteinase e/ ou fosfolipase, com índices 2 ou 3 . Somente uma amostra PFGE tipo V (P12, Tabela 2) não apresentou produção destas enzimas. E amostras isoladas de um neonato (P17) com PFGE tipo I produziram enzimas, tanto proteinase, como fosfolipase. Os demais PFGE tipos de *Candida albicans* (II,III,IV e VI) apresentaram pelo menos produção de uma destas enzimas, porém nenhum destes neonatos com amostras destes perfis desenvolveram septicemia.

Portanto, salientamos que PFGE tipo V, o mais freqüente nas amostras de *C. albicans*, pode apresentar pelo menos um dos fatores de virulência estudados neste trabalho.

Apesar das amostras de *C. albicans* isoladas da colonização oral, e que desenvolveram sepse, apresentarem PFGE tipo V, os perfis enzimáticos foram diferentes.

Estes mecanismos de produção destas enzimas variam de paciente para paciente e apresentam uma complexidade de resultados. Os genes que expressam estas enzimas podem ser reprimidos ou não de acordo com o estímulo dado pelo paciente ou de acordo com a necessidade em produzir estas enzimas para invadir o tecido do hospedeiro (SCHALLER et al., 2005).

As amostras de *Pichia* não produziram estas enzimas, mostrando que sua patogenicidade pode estar relacionados a outros fatores de virulência, uma vez que outros estudos tem também demonstrado a ausência de produção das mesmas (PAULA et al., 2006). Ressaltamos que houve produção fosfolipase de na maioria das amostras de colonização oral associadas a sepse.

Todas as amostras do gênero *Candida* isoladas de sepse e cateter foram produtoras de pelo menos uma exoenzima.

Portanto, não houve uma correlação significativa da produção de proteinase e fosfolipase com relação a espécies de leveduras encontradas assim como, com as amostras isoladas da colonização oral, sangue e cateter. Embora, as amostras isoladas de sangue e cateter tenham produzido pelo menos uma das enzimas estudadas.

Estudos mais acurados com relação à produção destas exoenzimas devem ser realizados, tal como, estudos em meio líquido e realização de técnicas de eletroforese.

5.5 Sensibilidade aos antifúngicos

Em relação aos testes de sensibilidade, todos os isolados de leveduras avaliados apresentaram 100% de sensibilidade "in vitro", pelo método de Etest segundo critérios de leitura adotados e segundo a categorização descrita nos documentos CLSI (M27 A2, 2002; M27-S3, 2008).

Alguns autores recomendam que pacientes de risco para candidemia e que apresentam febre e que não respondem a antifungicoterapia, recebam terapia empírica e, uma vez diagnosticada a infecção por leveduras, submetam-se ao início imediato do tratamento. A escolha terapêutica inicial depende do estado clínico do paciente, da presença de insuficiência renal, do conhecimento da espécie de *Candida* e da sensibilidade ao antifúngico.

C. albicans é a levedura mais isolada nas colonizações, mas também é a espécie mais invasiva e foi descrita sendo a mais sensível ao fluconazol com CIM 90 ≤1 µg/mL (SAFDAR et al., 2001). Em nosso estudo, a maior CIM 50 para o fluconazol foi encontrada nas amostras de *C. albicans*, seguida de *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Porém, a maior CIM 90 para fluconazol foi observada para *C. krusei*, seguida de *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Apesar de *C. krusei* ser uma espécie relatada como intrinsicamente resistente ao fluconazol (WINGARD et al., 1991) o teste "in vitro" mostrou sensibilidade das amostras frente a este antifúngico. Estes dados corroboram com os achados de MATSUMOTO et al., 2001; MATSUMOTO et al., 2007). Estas cepas deverão ser melhor estudadas e podemos realizar outros testes de sensibilidade "in vitro" como o CLSI e EUCAST. O fluconazol é o azol mais estudado em neonatos, incluindo sua farmacocinética (SAXEN et al., 1993). A dosagem utilizada neonatos foi descrita em estudo empregando este fármaco como profilático durante, uma epidemia por *C. parapsilosis*. (SAXEN et al., 1995).

Convém salientar que as maiores CIMs foram encontradas em amostras provenientes do sangue e cateter. Apesar dos valores serem menores que 1µg/mL é importante relatarmos os dados obtidos uma vez que a administração de antifúngicos, especialmente do fluconazol, tem sido descrita como uma

forma de reduzir a colonização e, consequentemente, a infecção por leveduras (BERTINI et al., 2005; HEALY et al., 2005). *C. glabrata* e *C. parapsilosis* vêm mostrando resistência após exposição ao fluconazol fato que pode modificar a prevalência de *C. albicans* por espécies não *albicans* (CASTAGNOLA et al., 2004). Porém, há controvérsias, conforme Manzoni et al. (2008) têm relatado o uso de fluconazol como um antifúngico que não seleciona cepas resistentes. É importante ressaltar que o uso profilático por antifúngicos deve ser melhor estudado levando-se em conta a gravidade do estado geral do neonato. Já tem sido descrito casos de infecção por fungos filamentosos em substituição as infecções por *Candida* spp devido ao amplo uso de triazólicos em pacientes imunocomprometidos (CASTAGNOLA et al.,2004).

As amostras de *C. parapsilosis* mostraram maior CIM 50 para anfotericina B, e maior CIM 90 para fluconazol. Pappas et al. (2004) relataram que anfotericina B e fluconazol são as drogas de escolha para tratar candidemia em neonatos. A anfotericina B deoxicolato é nefrotóxica e esta toxicidade para os neonatos é similar à dos adultos (FRATTARELLI et al., 2004). As formulações lipídicas da anfotericina são indicadas como tratamento de primeira linha, bastante utilizado por neonatologistas, quando pacientes de alto risco desenvolvem intolerância à anfotericina B, ou quando apresentam outros problemas, inclusive insuficiência renal (ROWEN, 2001; RUEDA, 2006).

Krebs et al., 1999 avaliaram a eficácia da formulação lipídica da anfotericina B em neonatos com candidíase sistêmica, durante o período de 1994 a 1996. Concluíram que o tratamento com formulação lipídica foi mais efetivo e com diminuição dos efeitos colaterais em comparação com o uso da anfotericina convencional.

A CIM 50 do voriconazol foi maior frente a *C. albicans*. O voriconazol é um derivado sintético do fluconazol e tem sido ativo contra cepas de *C. krusei e C. glabrata*. Tem tem sido descrito como um fármaco seguro em neonatos (KULLBERG et al., 2005; KOHLI et al., 2008).

A maior CIM 50 do itraconazol foi averiguada em *C. krusei*. Este antifúngico assim, como cetoconazol raramente são utilizados em neonatos (ROWEN, 2001). Itraconazol é uma droga recente em relação ao cetoconazol e provoca menos hepatotoxicidade. Porém ambos tem demonstrado efeito

fungistático o que não justifica substituir a anfotericina B em associação com fluconazol no tratamento dos neonatos (BLISS et al., 2003).

Caspofungina é uma droga pertencente a classe das equinocandinas e tem sido descrita como ativa com ação fungicida, sobre as espécies de *Candida*, inclusive com relação as espécies resistentes ao fluconazol. Esta droga tem sido estudada em crianças e adultos, e tem se revelado como antifúngico eficaz e seguro podendo ser, futuramente, um fármaco de escolha para o tratamento em neonatos (BLISS et al., 2003).

Portanto, as amostras de leveduras isoladas em nosso estudo foram sensíveis "in vitro", porém mesmo com o tratamento com antifúngicos, a mortalidade encontrada foi alta. Os óbitos observados foram associados com a infecção fúngica, mas não foi possível concluir se o antifúngico, administrado ao paciente, não foi eficaz a tempo ou se os fatores não-infecciosos associados ao neonato influenciaram na alta mortalidade dos mesmos.

Sabe-se que não existe um procedimento padrão ideal para a realização do antifungigrama. Empregamos, neste estudo, o "kit" comercial Etest que é uma técnica reprodutível, de fácil execução mostrando alta concordância com técnicas de microdiluição padronizadas pelo CLSI (DIAS et al., 2006; MATSUMOTO et al., 2007). Porém, parâmetros de sensibilidade e resistencia às drogas, pelos testes acima citados, são ainda controvérsos. Ainda não há uma correlação consistente entre a sensibilidade "in vitro" e os resultados clínicos, fato que dificulta a escolha terapêutica.

Vários estudos levam em consideração a presença de colonização oral como um sinaleiro biológico, levando o neonato a uma possível infecção fúngica sistêmica. Medidas profiláticas devem ser impostas após a averiguação da colonização. Estudos mostram que a colonização inicial ocorre nas duas primeiras semanas de vida (BALEY et al., 1986; CANNON e CHAFFIN, 1999; CARAMALAC et al., 2007; MANZONI et al., 2007; Cate et al., 2009). Este é o mesmo período relacionado com as infecções fúngicas após colonização, salientando a urgência em se isolar e identificar as leveduras (MENDIRATTA, 2006; CHAPMAN, 2007). Desta maneira, a detecção precoce da colonização oral e identificação da levedura pode auxiliar no controle das infecções fúngicas e no aparecimento de possíveis surtos hospitalares.

Salientamos que neste estudo, pudemos averiguar colonização oral, coloinização no cateter, casos septicemia e de óbito. Porém, outros sítios anatômicos devem ser estudados assim com outros fatores predisponentes à infecção fúngica.

A colonização oral mostrou ser um importante fator para o desenvolvimento de sepse fúngica sendo um sinaleiro biológico. Também convém salientar o papel de cateter colonizado. Todas as amostras de isoladas de sangue e cateter produziram, pelo menos,uma das duas enzimas, sendo que estes resultados devem ser melhor estudados. Dentre os perfis moleculares das leveduras, o PFGE tipo V de *C. albicans* foi o mais frequente e teve associação com colonização oral e o desenvolvimento de sepse, assim como candidemia e posterior óbito. Outro parâmetro que deve ser levado em consideração foi o baixo peso dos neonatos que aumentou a probabilidade de colonização oral e o desenvolvimento de sepse e óbito. Desta maneira, apesar dos parâmetros estudados, com resultados importantes, outros fatores devem ser pesquisados com relação aos neonatos de alto risco para assim diminuir a ocorrência de leveduras e a mortalidade destas crianças.

À nosso ver, a importância direta destes resultados é propiciar ao médico uma estimativa dos fatores de risco, direcionar prognósticos e, talvez, auxiliar em terapias mais adequadas, nos casos de alto risco para óbito.

Conclusões 88

Dos 125 neonatos estudados, 14,4% apresentaram colonização oral;
 9,6% desenvolveram septicemia por fungos e 4,8% apresentaram colonização no cateter.

- 2. As leveduras mais frequentes foram: colonização oral *C. albicans* (72,2%); cateter *C. parapsilosis* (66,7%) e sangue *C. albicans* (50%).
- 3. Entre os 12 casos de septicemia, 11 (91,3%) evoluíram para óbito. *Candida albicans* foi mais isolada em septicemia neonatal (50%), seguida de *C. parapsilosis* (33,5%).
- 4. Com relação a produção de fatores relacionados a virulência (proteinase e fosfolipase) as amostras de leveduras isoladas de cateter e sangue produziram pelo menos uma das duas enzimas.
- Não houve correlação entre as amostras isoladas de boca, cateter e sangue em relação a produção de exoenzimas.
- 6. Todas as amostras de leveduras pertencentes ao Candida, Trichosporon e Pichia foram avaliadas foram sensíveis frente aos antifúngicos: anfotericina B, fluconazol, itraconazol, cetaconazol, voriconazol e caspofungina, empregando-se o método de E-test.
- 7. As amostras de leveduras do gênero Candida apresentaram diversos PFGE-tipos sendo, para *C. albicans* que o tipo V (5 bandas; com variação de peso molecular de 825 a 2200kb) foi o mais freqüente.
- Colonização oral por PFGE tipo V de *C.albicans* tem 9,92 vezes maior probabilidade (RR-risco relativo)em desenvolver septicemia quando comparada com outros PFGE tipos da mesma espécie, independente do peso do neonato.
- Septicemia por PFGE tipo V de C. albicans tem 13,71 vezes maior probabilidade (RR) em evoluir levar o neonato ao óbito, quando comparada com outros PFGE tipos da mesma espécie, independente do peso do neonato.
- 10. Por meio da técnica de PFGE observamos que, dos 10 casos de sepse causado por espécies de *Candida*, 60% estiveram associados com a colonização oral prévia pela mesma espécie, e com perfis moleculares similares, sendo que destes, 66,7% foram PFGE do tipo V.
- 11.Os neonatos com colonização oral possuem um RR de 8 para desenvolver septicemia..

Conclusões 89

12.Os neonatos com septicemia por leveduras, tem um RR de 94 evoluir para óbito.

13.Os neonatos abaixo de 1000 g possuem RR de 3,0 para a ocorrência de colonização oral e de 2,8 em relação a evolução para o óbito.

AGARWAL, J.; BANSAL, S.; MALIK, GK. Trends in neonatal septicemia: emergence of non-albicans Candida. **Indian. Pediatr.**, v.41, p.712-5, 2004.

ALMIRANTE, B.; RODRIGUES, D. Antifungal agents in neonates. **Pediatric Drugs.**, v. 9,p. 311-321, 2007.

ASBECK, E.C.; HUANG, Y.C.; MARKHAM, A.N. *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source and review of published studies. **Mycopathologia**, v. 164, p. 287–293, 2007.

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 units in Costa Rica. Intern. **J. Infect. Dis.**, v.9, p. 90-95, 2005.

BAKIR, M.; CERIKCIOĞLU N. TIRTIR, A.; BERRAK, S.; OZEK, E.; CANPOLAT, C. *Pichia anomala* fungaemia in immunocompromised children. **Mycoses**, v.47 p. 231-5, 2004.

BALEY, JE.; KLIEGMAN, R.M.; BOXERBAUM, B.; FANAROFF, AA. Fungal colonization in the very low birth weight infant. **Pediatrics**, v. 78, p. 225-32, 1986.

BALEY, J.E.; KLIEGMAN, R.M.; FANAROFF, A.A. Disseminated fungal infections in very low-birth-weight infants: clinical manifestations and epidemiology. **Pediatrics**, v.73, p. 144-52, 1984.

BARADKAR, V.P.; MATHUR, M.; KUMAR, S. Neonatal septicemia in a premature infant due to *Candida dublinienis*. **Indian J. Am. Med. Microbiol.**, v. 26, p. 382-385, 2008.

BARCHIESI, F.; HOLLIS, R.J.; MESSER, S.A. Eletrophoretic karyotype and in vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates from aids patients. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 23, p. 99-103, 1995.

BENJAMIN, D. K. First, Do No Harm. **Pediatrics**, v. 121, p. 831-832, 2008.

BENJAMIN, D.K.; ROSS, K.; MCKINNEY, R.E; AUTEN, R.; FISHER, R.G. When to suspect fungal infection in neonates: a clinical comparison of Candida albicans and Candida parapsilosis fungemia with coagulase-negative staphylococcal bacteremia. **Pediatrics**, v.106, p.712–8, 2000.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BENJAMIN, D.K.; STOLL, B.J.; FANAROFF, A.A,.; MCDONALD, S.A.; HIGGINS, R.D.; DUARA, S.; POOLE, K.; LAPTOOK, A.; GOLDBERG, R. National institute of child health and human development neonatal research network neonatal candidiasis among extremely low birth weight infants: risk factors, mortality rates, and neurodevelopmental outcomes at 18 to 22 months. **Pediatrics**, v. 117, p. 84-92, 2006.

BENJAMIN, D.K.; DELONG, E.R.; STEINBACH, W.J.; COTTON, C.M.; WALSH, T.J; CLARK, R.H. Empirical therapy for neonatal candidemia in VLBW infants. **Pediatrics**, v. 112, p. 543–7, 2003.

BERTINI, G.; PERUGI, S.; DANI, C.; FILIPPI, L.; PRATESI, S.; RUBALTELLI, F.F.J. Fluconazole prophylaxis prevents invasive fungal infection in high-risk, very low birth weight infants. **Pediatrics**, v. 147, p. 162-5, 2005.

BIZARRO, M.J.; RASKIND, C.; BALTIMORE, R.S. Seventy-five years of Neonatal Sepsis at Yale: 1928-2003. **Pediatrics**, v. 116, p. 595-602, 2005.

BLASSCHKE-HELLMESSEN, R. Vertical transmission of candida and its consequences. **Mycoses**, v. 41, p. 31-6, 1998.

BLISS, J.M.; WELLINGTON, M.; GIGLIOTTI, F. Antifungal pharmacotherapy for neonatal candidiasis. **Semin. Perinatol.**, v.27, p. 365-374, 2003.

BLISS, J.M.; BASAVEGOWDA, K.P.; WATSON, W.J. SHEIKH, A.U.; RYAN, R.M. Vertical and Horizontal Transmission of *Candida albicans* in Very Low Birth Weight Infants Using DNA Fingerprinting Techniques. **Pediatr. Infect. Dis. J,** v. 27, 2008.

BOCCIA, S.; POSTERARO, B.; LA SORDA, M.; VENTO, G.; MATAZA, P.G.; TEMPERA, A.; PETRUCCI, S.; FADDA, G. Genotypic analysis by 27 a DNA fingerprinting of *Candida albicans* strains isolated during an outbreak in a neonatal intensive care unit. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**,v. 23, p. 281-184, 2002.

BONASSOLI, L.A.; BERTOLIA, M.; SVIDZINSK, T.I.E. High frequency of Candida parapsilosis on the hands of healthy hosts. **J. Hosp. Infect.**, v. 59, p. 159–162, 2005.

BORDERON, M.; THERIZOL-FERLY, E.; SALIBA, J. Prevention of *Candida* colonization prevents infection in a neonatal unit. **Biol Neonate**, v. 84, p.37–40. 2003.

BRANCHINI, M.L.M.; GEIGER, D.C.P.; FISCHMAN, O.; PIGNATARI, A.C. Molecular typing of *Candida albicans* strains isolated from nosocomial candidemia. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v., 37, p. 483-487, 1995.

BRECHT, M.; CLERIHEW, L.; MCGUIRE, W. Prevention and treatment of invasive fungalinfection in very low birthweight infants. **Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal**, v. 94, p. 65-69, 2009.

BROOKER, R.W.; KEENAN, W.J. Catheter related bloodstream infection following PICC removal in preterm infants. **J. Perinatol.** v. 27p.171–174, 2007.

CAGGIANO, G.; LATTA, R.; LANEVE, A.; MANCA, F.; MAONTAGNA, M.T. Observational study on candidaemia at a university hospital in southern Italy from 1998 to 2004. **Mycoses**, v.51, p.123–128, 2007.

CANNON, R.D. & CHAFFIN, W.L. Oral colonization by candida albicans. **Crit Rev. Oral. Biol Med.**, v. 10, p. 359-383, 1999.

CARAMALAC, D.A, DA SILVA, R.L, BATISTA, G.C.M.; BIRMANE, C.; DUARTE, W.M.; HAHN, R.; PAULA CR. *Candida* isolated from vaginal mucosa of neonates: occurrence and biotypes concordance. **Pediatric. Infect Dis.**, v. 26, p.553-7, 2007.

CAREY, A.J.; SAIMAN, L.; POLIN, R.A. Hospital-acquired infections in the nicu: epidemiology for the new millennium. **Clin Perinatol.**, v. 35, p.223-49, 2008.

CARTER, J.E.; LAURINI, J.A.; EVANS, T.N.; ESTRADA, B. Neonatal *Candida parapsilosis* meningitis and empyema related to epidural migration of a central venous catheter. **Clin. Neurol. Neurosurg.**, v.110, p. 614-8, 2008.

CASTAGNOLA, E.; MACHETTI, M.; BUCCI, B.; VISCOLI, C. Antifungal prophylaxis with azole derivatives. **J. Clin. Microbiol.**, v.15, p. 86-95, 2004.

CATE, J.M.; KLIS, F.M.; PEREIRA-CENCI, T.; CRIELAARD, W.; GROOT, P.W.J. Molecular and Cellular Mechanisms That Lead to Candida Biofilm Formation. **Dent Res.**, v. 88; 105-108, 2009.

CHAVASCO, J. K.; PAULA, C. R.; HIRATA, M.H.; ALEVA, N.A.; MELO, C.E.; GAMBALE, W; RUIZ, L.S.; FRANCO, M.C. Molecular identification of Candida dubliniensis isolated from oral lesions of HIV-positive and HIV-negative patients in São Paulo, Brazil. **Rev. Med. Trop. São Paulo**, v. 48, p. 21-26, 2006.

CELEBI, S.; HACIMUSTAFAOGLU, M.; OZDEMIR, O. Nosocomial candidemia in children: results of a 9-year study. **Mycoses**, v. 51, p. 258-257, 2008.

CERIKÇIOĞLU, N.; ILKI, A.; BILGEN, H.; OZEK, E.; METIN, F.; KALAÇA, S. The relationships between candidemia and candidal colonization and virulence

factors of the colonizing strains in preterm infants. **Turk. J. Pediatr.,** v.46, p. 245-50, 2004.

CHAGAS-NETO, T.C.; CHAVES, G. M.; COLOMBO, A.L. Update on the Genus *Trichosporon.* **Mycopathologia**, v.166, p.121–132, 2008.

CHANG, M.R.; CORREIA, F.P.; COSTA, L.C.; XAVIER P.C.N.; PALHARES, D.B.; TAIRA, D.L.; PANIAGO, A.M.M.; PONTES, E.R.J.C.; MACHADO, V.E. *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil . **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**., v. 50, p. 265-268, 2008.

CHAPMAN, R.L.; FAIX, R.G. Invasive neonatal candidiasis: an overview. **Semin. Perinatol.**, v. 27, p. 352-6, 2003.

CHAPMAN, R.L. Prevetion and Treatment of Candida infectious in neonates. **Seminar. Perinatol.**, v. 31, p. 39-46, 2007.

CHRYSSANTHOU, E. e CUENCA-ESTRELLA, M. Comparison of the EUCAST-AFST broth dilution method with the CLSI reference broth dilution method (M38-A) for susceptibility testing of posaconazole and voriconazole against *Aspergillus* spp. **Med.Clin. Microbiol. Infect.**, v.12, p. 901-4, 2006.

CLARK, T.A.; SLAVINSKI, S.A.; MORGAN, J.; LOTT, T.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; BRANDT, M.E.; WEBB, R.M.; CURRIER, M.; FLOWERS, R.H.; FRIDKIN, S.K.; HAJJEH, R.A. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 4468-72, 2004.

CLAUDINO, A.L.; PEIXOTO, R.F.; MELHEM, M.S; SZESZS, M.W.; LYON, J.P.; CHAVASCO, J.K.; FRANCO, M.C. Correlation between CLSI, EUCAST and Etest methodologies for amphotericin B and fluconazole antifungal susceptibility testing of Candida spp. clinical isolates. **Die Pharm.**, v. 63, p. 286, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference Method For Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing For Yeasts; Approved Standard M27 - A. Wayne, Pa.: CLSI, 1997. (Document M27-A).

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference Method For Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing For Yeasts; Approved Standard M27-A2. Wayne, Pa: CLSI, 2002 (Document M27-A2).

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Informational Supplement. 3rd ed. Wayne, Pa.: CLSI, 2008 (Document M27-S3).

COLEMAN, D.C; RINALDI, M.G.; HAYNES, K.A.; REX, J.H.; SUMMERBELL, R.C.; ANAISSIE, J. LI, A.; SULLIVAN, D.J. Importance of Candida species other *Candida albicans* as opportunistic pathogens. **Med. Mycol.**., v. 36, p. 156-165, 1998.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; PARK, B.J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, p. 2816-23, 2006.

COLOMBO, A.L., GUIMARÃES, T.; SILVA L.R. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 28, p. 570-6, 2007.

COTTON, C.M.; McDONALD, S.; STOLL B. The association of third-generation

cephalosporin use and invasive candidiasis in extremely low birth-weight infants. **Pediatrics**, v. 118, p. 717-722, 2006.

CURTIS C, SHETTY N. Recent trends and prevention of infection in the neonatal intensive care of unit. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 21, p. 350–356, 2008.

DIAS, A.L.T.; MATSUMOTO, F.E.; MELHEM, M.S.C.; SILVA, E.G.; AULER, M.E.; SIQUEIRA, A.M.; PAULA, C.R. Comparative analysis of Etest and broth microdiluition method (AFST-EUCAST) for trends in antifungal drug susceptibility testing of brazilian *Cryptococcus neoformans* isolates. **J. Med. Microbiol.**, v.55, p. 1693-1699.

DIAZ-GUERRA, T.M.; MARTINEZ-SUAREZ, J.V.; LAGUNA, F.; VALENCIA, E.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. Change in fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans* isolated. **AIDS**, v. 12, p. 1601-1610, 1998.

DIB, J.C.; DUBE, M.; KELLY, C.; RINALDI, M. G.; PATTERSON, J. E. Evaluation of pulsed-field gel eletroforesis as a typing system for *Candida rugosa* comparison of karotype and restriction fragment length polymorphisms. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 1494-6, 1996.

DIMOPOULOS, G.; NTZIORA, F.; RACHIOTIS, G.; ARMAGANIDIS, A.; FALAGAS, M.E. *Candida Albicans* Versus Non-*Albicans* Intensive Care Unit-Acquired Bloodstream Infections: Differences in Risk Factors and Outcome. **Crit. Car. Traum.**, v. 106, 2008.

DIVEKAR, A.; REBEKUA, I.M.; SONI, R. Late onset *Candida parapsilosis* endocarditis after surviving nosocomial candidemia in an infant with structural heart disease. **Ped. Infect. Dis. J.**,v. 23, p. 472-475, 2004.

DOUGLAS, L.J. Candida biofilms and their role in infection. **Trend. Microbiol.**, v. 11, p. 30—36, 2003.

DRAGO, M.; SCALTRIO, M. M.; MORACE, G.; GISIA, M. In vitro activity of voriconazole and other antifungal agents against clinical isolates of *Candida krusei*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 23, p. 619-624, 2004.

DURÁN, E.; RAMIREZ, D.; OCZARIZ, J.; VENTURA, P.; RUBIO, C. Candidemia: *Candida parapsilosis* in a neonatology unit. **Rev. Iberoamer. Micol.**, v. 41, p. 521-528, 2005.

DURAN, M. T.; VELASCO, D.; CANICHE, D.; MOURE, R.; VILLANUEVA, R. Susceptibilidad antifúngica de aislados de candida spp de hemocultivos en un período de cinco años (1997-2001). **Enferm. Infect. Microbiol. Clin.,** v. 21, p. 488-492, 2003.

EL MASRY, F. A.; NEAL, T. J.; SUBHEDAR, N. N. Risk factors for invasive fungal infection in neonates. **Acta Paediatri.**, v. 91, p. 198-202, 2002.

EUROPEAN COMMITEE ON ANTIMICROBIOL SUSCEPTIBILITY. **Method for determination of minimal inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts.** Taufkirchen, Germany: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2002 (document E.dis. 7.1).

FAIRCHILD, K.D.; TOMKORIA, S.; SHARP, E.C.; MENA, F.V. Neonatal Candida glabrata sepsis: clinical and laboratory features compared with other Candida species. **Pediatr. Infetc. Dis. J.**, v. 21, p. 39-43, 2002.

FRANÇA, J.C.B.; RIBEIRO, C.E.L.; QUEIROZ-TELLES, F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência freqüência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**; v. 41, p. 23-28, 2008.

FRATTARELLI, D.A.; REED, M.D.; GIACOIA G.P. Antifungals in systemic neonatal candidiasis. **Drugs**, v. 64, p. 949-68, 2004.

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. 1680-7, 2006.

GANESAN, K.; HARIGOPAL, S.; NEAL, T. Profilatic oral nystatin for preterm babies under 33 weeks gestation decreases fungal colonization invasive fungaemia. **Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal.**, v. 26, p.1-23, 2008.

GIAMMANCO, G.M.; PIZZO, G.; PECORELLA, S. Identification of *Candida dubliniensis* among oral yeast isolates from a Italian population of humam

immunodeficiency vírus-infected subjects. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.17, p. 89-94, 2002.

GIUSIANO, G.E.; MANGIATERRA, M.; ROJAS, F.; GÓMEZ, V. Yeasts species distribution in neonatal intensive care units in northeast Argentina. **Mycoses**., v. 47, p. 300-3, 2004.

GODOY, P.; TIRABOSHI, I.; SEVERO, L.C.; BUSTAMANTE, B.; CALVO, B.; ALMEIDA, L.P.; MATTA; D. A.; COLOMBO, A.L. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from latin americam hospitals. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** .; v. 98, p. 401-405, 2003.

GOKCE, G.; CERIKCIOGLU, N. YAGCI, A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of Candida species isolated from blood cultures. **Mycopathologia**, v. 164, p. 265-9, 2007.

GROLL, A. H.; LEHMBECHER, T. Posaconazole for paediatric patients: status of development and future perspectives. **Mycoses**., v. 51, p. 5-11, 2008.

GUDLAUSSON, O.; GILLESPIE, S.; LEE, K.; VENDBERG, J.; HU, J.; MESSER, S.; HERWALDT, L.; PFALLER, M.; DIEKEMA, D. Attributable mortality of nosocomial candidemia. **Clin. Infect. Dis.**, v. 37, p. 1172-1177, 2003.

GUEHO E, SMITH MT, HOOG GS, BILLON-GRAND G, CHRISTEN R, BATENBURG-VAN DER VEGTE WH. Contribuitions to a revision of the genus *Trichosporon*. **Ant. Van Leeuwenhoek**.,v. 61, p.289-316, 1992.

GUPTA P, FARIDI MMA, RAWAT S. Clinical profile and risk factors for oral candidosis in sick newborns. **Indian Pediatrics**.; 33: 299-303, 1996.

HAJJEH, R.A.; SOFAIR, A.N.; HARRISON, L.H.; LYON, G.M.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; MIRZA, S.A. Incidence of bloodstream infections due to candida species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population based active surveillance program. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 1519-27, 2004.

HAQUE, K. N. Definitions of bloodstream infection in the newborn. **Pediatr. Crit. Care Med.**, v.6, p. 2-8, 2005.

HEALY, C.M.; BAKER, C.J.; ZACCARIA, E.; CAMPBELL, J.R. Impact of fluconazol e prophylaxis on incidence and outcome of invasive candidiasis in a neonatal intensive care unit. **J. Pediatr.**, v. 147, p.135-41, 2005.

HERESI, G.P.; GERSTMANN, D.R.; REED, M.D.; VAN DEN ANKER, J.N.; BLUMER, J.F.; KOVANDA, B.A.; KEIRNS, J.J.; BUEL, D.N.; KEARNS, G.L.

The Pharmacokinetics and Safety of Micafungin, a Novel Echinocandin, in Premature Infants. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 25, 2006.

HINRICHSEN, S. L. FALCÃO, E.; VILELLA, T. A. S.; COLOMBO, A.L.; NUCCI M.; MOURA L.; RÊGO L.; LIRA C.; ALMEIDA L. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.41, 2008.

HUANG, Y.C.; LI, C.C.; LIN, T.Y.; LIEN, R.I.; CHOU, Y.H.; WU, J.L.; HSUEH C. Association of fungal colonization and invasive in very low birth weight infants. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.17: 819-822, 1998.

HUANG, Y.C.; SU, L.H.; WU, T.L.; LIN, T.Y. Genotyping analysis of colonizing candidal isolates from very-low-birthweight infants in a neonatal intensive care unit. **J. Hosp. Infect.**, v. 58, p. 200-203, 2004.

HUANG, Y.C.; SU, L.H.; WU, T.L.; LIN TY. Genotyping analysis of colonizing candidal isolates from very-low-birthweight infants in a neonatal intensive care unit. **J. Hosp. Infect..**, v. 58, p. 200-203, 2004.

IBRAHIM, A.S.; MIRBOD, F.; FILLER, S. G. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *C. albicans*. **Infect. Immun**.,v. 63, p.1993-8, 1995.

IMRAN, S.; GORMAN, F. Occurrence of *Candida* infectious in the neonatal intensive care unit. **Ir. Med. J., v.** 97, p. 6, 2004.

JANG, S.J.; HAN, H.L.; LEE, S.H.; RYU, S.Y.; CHAULAGAIN, B.P.; MOON, Y.L.; KIM, D.H.; JEONG, O.Y.; SHIN, J.H.; MOON, D.S.; PARK, Y.J. PFGE – based epidemiological study of an outbreak of *Candida tropicalis* candiduria: the importance of medical waste as a reservoir of nosocomial infection. **Jpn J. Infect. Dis.**, v. 5, p. 263-7,2005.

JASSER, A.M.A; ELKHIZZI, N.A. Distribuition of *Candida* species among bloodstream isolates. **Saudi Med. J.**., v. 25, p. 566-569, 2004.

JOHNSSON, H.; EWALD U. The rate of candidaemia in preterm infants born at a gestational age of 23–28 weeks is inversely correlated to gestational age. **Acta Paediatr.**, v. 93, p. 954–958, 2004.

JUSTER-REICHER, A.; FLIDEL-RIMON, O.; AMITAY, M.; EVEN-TOV, S.; SHINWELL, E.; LEIBOVITZ, E. High-Dose liposomal amphotericin B in the therapy of systemic candidiasis in neonates. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** V.22, p. 603-607, 2003.

KAREN D. FAIRCHILD, M.D.; TOMKORIA S, SHARP EC, MENA FV. Neonatal *Candida glabrata* sepsis: clinical and laboratory features compared with other *Candida* species. **Pediatr. Infect. Dis. J.**,v. 21, p. 39–43, 2002.

KAUFMAN D, BOYLE R, HAZEN KC, PATRIE JT, ROBINSON M, DONOWITZ LG. Fluconazole prophylaxis against fungal colonization and infection in preterm infants. **N. Engl. J. Med.**, v. 345, p. 1660–1666, 2001.

KAYA, E.; SOYUER, O.; KILIC, H. Vulvovaginal candidiasis in parturients infestation of the neonate. **Rev. Iberoam. Micol.** v.7, p.113–115, 1990.

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

KLEMPP-SELB, B.; KAPPE, R. Karotyping of *Candida albicans* and *Candida glabrata* from patients with *Candida* sepsis. **Mycoses**., v. 43, p. 159-163, 2000.

KOHLI, V.; TANEJA, V.; SACHDEV, P.; JOSHI R. Voriconazole in newborns. **Indian Pediatr.**, v. 45, p. 236-8, 2008.

KOSSOFF EH, BUESCHER ES, KARLOWICZ MG. Candidemia in a neonatal intensive care unit: Features of 111 cases. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 17, p.504–508, 1998.

KREBS, V.L.J.; GALVANI ALS, FEFERBAUM R, DINIZ EMA, CECCON MEJ, DÓRIA FILHO U, VAZ FAC. Treatment of systemic neonatal candidiasis with lipic formulations of amphotericin B. 40 World Congress Of Perinatal Medicine. April, 1999.

KREBS, V.L.J.; DINIZ, E.M.A.; VAZ, F.A.C. Infecção fúngica neonatal. **Rev. Bras. Med.,** v. 8, p. 32-43, 2009.

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

KULLBERG, B.J.; SOBEL, J.D.; RUNHKE, M.; PAPPAS, P.G.; VISCOLI, C.; REX, J.H. Voriconazole versus a regimen of amphotericin B followed by fluconazole for candidemia in non-neutropenic patients: a randomized non-inferioity trial. **Lancet.**, v. 366, p. 1435-42.

KURTZMAN, M.B.; REX, J.H. Glucan synthase inhibitors as antifungal agents . **Adv. Protein. Chem.**v. 56, p. 463-475, 2001.

KURTZMAN, C.P; FELL. J.W. **The Yeast**: A Taxonomic Study. New York, Pp. 1055, 1998.

LABELLE, A.J., MICEK, S.T., ROUBINIAN. N, KOLLEF, M.H. Treatment-related risk factors for hospital mortality in *Candida* bloodstream infections. **Crit. Care Med.** v. 36, p. 110-111, 2008.

- LACAZ, C.S, PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**, 5° ed. São Paulo, Brazil: Savier. 2002.
- LAI C.C.; TAN C.K.; HUANG Y.T.; SHAO P.L.; HSUEH P.R. Current challenges in the management of invasive fungal infections. **J. Infect. Chemother**, v. 14, p. 77–85, 2008.
- LEVIN, A.S.; COSTA, F.S.; MUSSI, N.S.; BASSO, M.; SINTO, S.I.; MACHADO, C.; GEIGER DC, VILLARES, M.C.; SCHREIBER, A.Z.; BARONE, M.; BRANCHINI M.L. *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semi-implantable central venous catheters and the hands of health care workers. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 30, p. 243-249, 1998.
- LEVY, I.; RUBIN, L.G.; VASISHTHA, S.; TUCCI, V.; SOOD, S.K. Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia in children. **Olin. Infect. Dis.**, v. 26, p.1086-1088, 1998.
- LUPETTI, A.; TAVANTI, A.; DAVINI, P.; GHELARDI, E.; CORSINI, V.; MERUSI, I.; BOLDRINI, A.; CAMPA, M.; SENESI, S. Horizontal transmission of *candida* parapsilosis candidemia in a neonatal intensive care unit. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, p. 2363-2369, 2002.
- BAKIR, M.N.; CERIKCIOGLU, A.; TIRTIR, S.; BERRAK, E.; OZE, K.; CANPOLAT, C. Pichia anomala fungaemia in immunocompromised children. **Mycoses**,v. 47, p. 231–235, 2004.
- MAKHOUL, I.R.; SUJOV, P.; SMOLKIN, T.; LUSKY, A.; REICHMAN, B. Epidemiological, clinical, and microbiological characteristics oflate-onset sepsis among very low birth weight infants inIsrael: a national survey. **Pediatrics**., v. 109, p. 34–9, 2002.
- MANNARELLI, B. M.; URZTMAN, C.P. Rapid identification of Candida albicans and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 1634-1641, 1998.
- MANZONI P, FARINA D, LEONESSA M, D'OULX E A, GALLETO P, MOSTERT M, MEINIERO R, GOMIRATO G. Risk factors for progression to invasive fungal infection in preterm neonates with fungal colonization. **Pediatrics**.,v. 116, p. 2359-2364, 2006.
- MANZONI, P.; LEONESSA, M.; GALLETTO, P.; LATINO, M.A.; ARISIO, R.; MAULE, M.; AGRIESTI, G.; GASTALDO, L.; GALLO, E.; MOSTERT, M.; FARINA, D. 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, p. 731-7, 2008.

MANZONI, P. Use of *Lactobacillus casei* subspecies *Rhamnosus GG* and gastrointestinal colonization by Candida species in preterm neonates. **J Pediatr Gastr Nutr.**, v. 45, p. 190-194, 2007.

MANZONI, P.; FARINA, D.; GALLETO, P.; LEONESSA, M.; PRIOLO, C.; ARISIO, R.; GOMIRATO, G. Type and number of sites colonized by fungi and risk of progression to invasive fungal infection in preterm neonates in neonatal intensive care unit. **J. Perinat. Med.**, v. 35 p. 220–226, 2007.

MARIANO, P. L. S.; MILAN, E. P.; MATTA, D. A. *Candida dubliniensis* identification in Brazilian yeast stock collection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 533-538, 2003.

MARR, K.A.; RUSTAD, T.D.; REX, J.H.; WHITE, T.C. The trailing endpoint phenotype in antifungal susceptibility testing is pH dependent. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, v. 43, p. 1383-1386, 1999.

MARTINEZ, M..; LÓPEZ-RIBOT, J.L.; KIRKPATRICK, W.R.; COCO, B.J.; BACHMANN, S.P.; PATTERSON, T.F. Replacement of *Candida albicans* with *C. dubliniensis in* human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, p. 3135-3139, 2002.

MASALA, L.; LUZZATI, R.; MACCACARO, L.; ANTOZZI, L.; CONCIA, E.; FONTANA, R. Nosocomial cluster of *Candida guillermondii* fungemia in surgical patients. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., v.** 22, p. 686-688, 2004.

MATSUMOTO, F.E. Candidemia em hospital publico de São paulo: caracterização genotípica das leveduras em associação e sensibilidade aos antifúngicos. 128 f. Dissertação (Doutorado Em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade De São Paulo, São Paulo, 2006.

MATSUMOTO, F.E.; GANDRA, R.F.; RUIZ, L.S.; AULER, M.E.; MARQUES, S.A.V.; GAMBALE, W.; PIRES, M.F.C.; PAULA, C.R. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a Public Hospital of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia.**, v. 154, p. 63-69, 2001.

MATSUMOTO, F.E.; DIAS, A.L.T.; MELHEM, M.S.C.; SZESZS, M.A.; AULER, M.E.; RUIZ, L.S.; SILVA, E.G.; GANDRA, R.F.; PAULA, C.R. Antifungal susceptibility of bloodstream yeasts isolated at a public children's hospital in Brazil: comparison of the Etest and the AFST-EUCAST microdilution method. **Can. J. Microbiol.**, v.53, p. 1300-1306, 2007.

MEDRANO, D.J.A.; BRILHANTE, R. S. N., CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.G.; RABENHORST, S.H.B.; SIDRIM, J.J.C. Candidemia in a brazilian hospital: the importance of Candida parapsilosis . **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 48, p. 17-20, 2006.

- MENDIRATTA, D.K.; RAWAT, V.; THAMKE, D.; CHALURVEDI, P.; CHHABRA, S.; NARANG, P. *Candida* colonization in preterm babies admitted to neonatal intensive care unit in the rural setting. **Indian J. Med. Microbiol.**,v. 24, p. 263-7, 2006.
- MIGUEL, L.G.S.; PLA, J.N.; COBO, J.; NAVARRO, F.; SANCHEZ-SOUZA, A.; ALVAREZ, M.E.; MARTOS, I.; MORENO, S. Morphotypic and genotypic characterization of sequencial *Candida parapsilosis* from na outbreak in a pediatric intensive care unit. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 49, p. 189-196, 2004.
- MIKAMO, H.; SATO, Y.; TAMAYA, T. In vitro antifungal activity of FK463, a new water-soluble echinocandin-like lipopeptide. **J. Antimicrob. Chemother.**,v. 46, p. 485–487, 2000.
- MILAN, E.P.; COLOMBO, A.L.; LAET SANT, A.N.; LEWI, D.S.; MELO, A.S.A. Primeiro isolamento de C. dubliniensis no Brasil: In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE INFECTOLOGIA** (1999), São Paulo. Resumos.
- MILLER, L.G, PERDREAU-REMINGTON, F., RIEG, G. Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Los Angeles. **N. Engl. J. Med.**, v. 352, p. 1445–53, 2005.
- MOREIRA, M. E. L. Controversies about the management of invasive fungal infections in very low birth weight infants. **J. Pediatr.**, v. 81, p. 52-58, 2005.
- NEGRI, M.F.N. Leveduras do gênero *Candida* isoladas de colonização em infecção hospitalar: caracterização fenotípica e sensibilidade aos antifúngicos. 107 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- NG, K.P.; SAW, T.L.; NA, S.L.; SOO-HOO, T.S. Systemic *Candida* infection in University Hospital 1997-1999: The Distribution of *Candida* Biotypes and antifungal susceptibility patterns. **Mycopathologia**, v. 149, p. 141-146, 2000.
- NOBILE, C.J.; MITCHELL, A.P. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. **Cell Microbiol.**, v. 8, p. 1382-1391, 2006.
- OLSUZ, S.; SAHIN, I.; YILDIRIM, M.; GULCAN, A.; YAVUZ, T.; KAYA, D.; KOC, A.N. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adult. **Jpn. J. Infect. Dis.**,v. 60, p. :280-3, 2007.
- ORSI, G.B.; D'ETORRE, G.; PANERO, A. Hospital Acquired infection surveillance in a neonatal intensive care unit. **Am. J. Infet. Control.**,v. 11, p. 1-3, 2008.

- PAPPAS, P.G, REX, J.H, SOBEL, J.D. Guidelines for treatment of candidiasis. **Clin. Infec. Dis.,** v. 38, p. 161–89, 2004.
- PAPPU-KATIKANENI, L.D.; RAO, K.P.; BANISTER, E. Gastrointestinal colonization with yeast species and *Candida* septicemia in very low birth weight infants. **Mycoses**.,v. 33, p. 20–23, 1990.
- PARK, S.; WONG, M.; MARRAS, S. A.; CROSS, E. W.; KIEHN, T. E.; TYAGI, V.; PASQUALOTTO, A.C.; NEDEL, W.L.; MACHADO, T.S.; SEVERO, L.C. Risk factors and outcome for nosocomial breakthrough candidaemia. **J. Infect.**, v.52, p. 216-22, 2006.
- PAULA, C.R.; KREBS, V.L.; AULER, M.E.; RUIZ, L.S.; MATSUMOTO, F.E.; SILVA, E.H.; DINIZ, E.M.; VAZ, F.A. Nosocomial infection in newborns by *Pichia anomala* in a brazilian intensive care unit. **Med. Mycol.**,v. 44, p. 479-84, 2006.
- PAULA, C.R.; MATSUMOTO, F.E.;MARQUES, S.A.; MELO, T.A.; GAMBALE W. Nosocomial yeast infection in a Puclic Children's Hospital of São Paulo, Brazil. In: Trends in Invasive Fungal Infections 5. 1999. **Abstracts...** Washington: American Society for Microbiology, 1999. p.152.
- PELLETIER, R.; LORANGER, L.; MARCOTTE, H.; CAROLIS, E. Voriconazole and fluconazole susceptibility of *Candida* isolates. **J. Med. Microbiol**.,v. 51, p. 479-483, 2002.
- PERLIN, D.S. Rapid identification of *C. dubliniensis* using a species specific molecular. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 2829–2836, 2000.
- PFALLER, M.A. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. **Clin. Infect. Dis.**, v 22, p. 89-94, 1996.
- PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; BOLMSTROM, A. Evaluation of E-test for determining in vitro susceptibility of yeast isolates to amphotericin B. **Diagn. Microbiol.**,v. 32, p. 223-227, 1998.
- PFALLER, M.A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R.J. Global surveillance of in vitro activity of micafungin against Candida: a comparison with caspofungin by CLSI-recommended methods. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 3533-8, 2006.
- PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. GIBBS,D.L. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 20, p. 133-63, 2007.
- PFALLER, M.A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R.J. In vitro susceptibility of invasive isolates of Candida spp. to anidulafungin, caspofungin and micafungin: six years of global surveillance. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p. 150-6, 2008.

PRICE, M.F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.O. Plate method for detesction of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**., v. 20, p. 7-17, 1982.

RAGOUILLIAUX, C.J.; KEENEY, S.E.; HAWKINS, H.K.; ROWEN, J.L. Maternal factors in extremely low birth weight infants who develop spontaneous intestinal perforation. **Pediatrics**., v. 120, p. 1458-64, 2007.

REAGAN, D.R.; PFALLER, M.A.; HOLLIS, R.J. Characterization of thesequence of colonization and nosocomial candidemia using DNA fingerprinting and a DNA probe. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, p. 2733–38, 1990.

REISSA, E.; LASKER, B.A.; IQBAL, N.J.; JAMES, M.J.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A. Molecular epidemiology of *Candida parapsilosis* sepsis from outbreak investigations in neonatal intensive care units. **Infect. Genet. Evol.**, v. 8, p. 103-9. 2008.

REVANKAR, S.G.; KIRKPATRICK, W.R.; McATEE, R.K.; FOTHERGILL, A.W.; REDDING, S.W.; RINALDI, M.G.; PATTERSON, T.F. Interpretation of trailing endpoints in antifungal susceptibility testing by the National Committee for Clinical Laboratory Standards method. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 153-156, 1998.

RICHARDS, M.J.; EDWARDS, J.R.; CULVER, D.H.; GAYNES, R.P. Nosocomial infections in medical intensive care units in the united states. national nosocomial infections surveillance system. **Crit. Care Med.**, v. 27, p. 887-892, 1999.

ROILIDES, E.; FARMAKI, E.; EVDORIDOU, J.; DOTIS, J.; HATZIIOANNIDIS, E.; TSIVITANIDOU, M.; BIBASHI, E.; FILIOTI, I.; SOFIANOU, D.; GIL-LAMAIGNERE, C.; MUELLER, M.; KREMENOPOULOS, G. Neonatal candidiasis: analysis of epidemiology, drug susceptibility, and molecular typing of causative isolates. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 23, p. 745-750, 2004.

ROILIDES, E.; FARMAKI, E.; EVDORIDOU, J. *Candida tropicalis* in a neonatal intensive care unit: epidemiologic and molecular analysis of an outbreak of infection with an uncommon neonatal pathogen. **J. Clin. Microbiol.**,v. 41, p. 735-741, 2003.

ROWEN, J.L. Fungal infections in the neonatal intensive care unit. Seminars in **Ped. Infect. Dis.**, v. 12, p. 107-114, 2001.

RUAN, S.Y.; LEE, L.N.; JERNG, J.S.; YU, C.J.; HSUEH, P.R. *Candida glabrata* fungaemia in intensive care units. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.14, p.136-140, 2008.

- RUCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, T.M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**., v. 20, p. 233-244, 1982.
- RUEDA, J.O. Descrição dos episódios decandidemia de origem nosocomial no hospital universitário Cassiano Antonio de Moraes. 110 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, 2006.
- RUIZ, L.S.; SUGIZAKI, M. F.; MONTELLI, A. C.; MATSUMOTO, F. E.; PIRES, M. F.C.; DA SILVA, B. C. M.; SILVA, E. H.; GANDRA, R. F.; SILVA, E.G.; AULER M. E.; PAULA, C. R. Fungemia by yeasts in brazil: occurrence and phenotypic study of strains isolated at the Public Hospital, Botucatu, São Paulo. **J. Mycol. Med.**, v.15, p.12-21, 2005.
- RUNHKE, M.; SCHIMIDT-WESTHAUSEN, A.; TRAUTMANN, M. In vitro activies of voriconazole (UK- 109.496) against fluconazole-susceptible and resistant *Candida albicans* from oral cavities of patients with human immudeficiency virus infection. **Antimicrob. Agents Chemother.**,v. 41, p. 575-7, 1997.
- SADVEN, P. Epidemiology of candidemia. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 17, p. 73-81. 2000.
- SAFDAR, A.; VAN, R. F.; HENSLEI-DOWNEY, S. P.; SINGHAL, S.; MENTA, J. *Candida glabrata* and *Candida krusei* fungemia after high-risk allogenic marrow transplantation: no adverse effect of low dose fluconazole profilaxis on incidence and outcome. **Bone Marrow Transplant.**, v. 28, p. 873-8, 2001.
- SAIMAN, L.; LUDINGTON, E.; PFALLER, M.; RANGEL-FRAUSTO, S.; WIBLIN, T.; DAWSON, J.; BLUMBERG, H.M.; PATTERSON, J.E.; RINALDI, M.; EDWARDS, J.E.; WENZEL, R.P.; JARVIS, W. Risk factors for candidemia in neonatal intensive care unit patients. **Pediatr. Infect. Dis. J.**,v. 19, p.319-324, 2001.
- SAIMAN, L.; LUDINGTON, E.; PFALLER, M.; RANGEL-FRAUSTO, S.; WIBLIN, R.T.; DAWSON, J. Risk factors for candidemia in neonatal intensive care unit patients. The National Epidemiology of Mycosis Survey study group. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 19, p.319–24, 2000.
- SAMARANAYAKE, L.P.; HUGHES, A.; WEETMAN, D.A.; MACFARLANE, T.W. Growth and acid production of Candida species in human saliva supplemented with glucose. **Oral Pathol.**, v. 15, p. 251-254, 1986.
- SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; FIORI, B.; RANNO, S.; TORELLI, R.; FADDA, G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. **Antimicrob. Agents Chemother**. V. 49, p. 668-79, 2005.

- SARACLI, M.A.; YILDIRAN, S.T.; GONLUM, A.; DOGANCI, L. Genotyping of *Candida albicans* strains isolated from nosocomial fungemia patients by pulsed-field electrophoresis. **Mikrobiol. Bul.**, v. 39, p. 191-198, 2005.
- SAXEN, H.; HOPPU, K.; POHJAVUORI, M. Pharmacokinetics of fluconazole in very low birth weight infants during the first two weeks of life. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 54, p. 269 –277, 1993.
- SAXEN H, VIRTANEN M, CARLSON P, HOPPU K, POHJAVUORI M, VAARA M. Neonatal Candida parapsilosis outbreak with a high case fatality rate. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.14, p. 776–81,1995.
- SCHALLER, M.; KORTING, H.C.; BORELLI, C. Candida albicans secreted aspartic proteinases modify the epithelial cytokine response in vitro a model of vaginal candidiasis. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 2758-65, 2005.
- SHATTUCK, K.E.; COCHRAN, C.K.; ZABRANSKY, R.J. Colonization and infection associated with Malassezia and *Candida* species in a neonatal unit. **Hosp. Infect.**, v. 34, p. 123–9, 1996.
- SHEEHAN, D.J.; HITCHOCK, C.A.; SIBLEY, C.M. Current and emerging azole antifungal agents. **Clin. Microbiol. Rev.,** v. 12, p. 40-79, 1999.
- SCHERER, S.; STEVENS, D.A. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of Candida. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, p. 675-679, 1987.
- SILVA, M.M.R.; COSTA, M.R.; MIRANDA, A.T.B.; FERNANDES, O.F.L.; COSTA, C.R.; PAULA, C.R. Evalution of Etest and macrodiluition broth for antifungal methods susceptibility testing of *Candida* sp strains isolated from oral cavities of Aids patients. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo,** v. 44, p.121-125, 2002.
- SHIN, J.H.; KOOK, H.; SHIN, D.H.; HWANG, T.J.; KIRN, M.; SUH, S.P.; RYANG, D.W. Nosocomial cluster of *Candida lipolytica* fungemia in pediatric patients. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 19, p. 344-349, 2000.
- SHIN, J.H.; CHAE, M.J.; SONG, J.W.; JUNG, S.I.; CHO, D.; KEE, S.J.; KIM, S.H.; SHIN, M.G.; SUH, L.; RYANG, D.W. Changes in Karyotype and Azole Susceptibility of Sequential Bloodstream Isolates from Patients with *Candida glabrata C*andidemia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 2385–2391, 2007.
- SHIN, J.H.; OG, Y.G.; CHO, D.; KEE, S.J.; SHIN, M.G.; SUH, S.P.; RYANG, D.W. Molecular epidemiological analysis of bloodstream isolates of *Candida albicans* from a university hospital over a five-year period. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 546-554, 2005.

- SHIN, J.H.; PARK, M.R.; SONG, J.W.; SHIN, D.H.; JUNG, S.I.; CHO, D.; KEE, S.J.; SHIN, M.G.; SUH, S.P.; RYANG, D.W. Microevolution of candida albicans strains during catheter-related candidemia. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, p. 4025-31. 2004.
- SILVA, E.H.; RUIZ L.S.; MATSUMOTO F.M.; AULER M.A.; GIUDICE M.G., MOREIRA, D.; SZESZS W.; PAULA C.R. Candiduria In A Public Hospital Of São Paulo (1999-2004): Characteristics Of The Yeast Isolates. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 49, p. 349-353, 2007.
- SINGH, K.; CHAKRABARTI, A.; NARANG, A.; GOPALAN, S. Yeast colonisation and fungaemia in preterm neonates in a tertiary care centre. **J. Med. Res.**, v. 110, p.169-73, 1999.
- SINGHI, S.; RAMAN RAO, D. S. V.; CHAKRABARTI, A. . *Candida* colonization and candidemia in a pediatric intensive care unit. **Pediatr. Crit. Care Med.**, .v. 9,p.191-95, 2008.
- SMOLINSKI, K.N.; SHAH, S.S.; HONIG, P.J. Neonatal cutaneous fungal infections. **Curr. Opin. Pediatr.**, v.17, p. 486-93, 2005.
- STAIB, P.; KRETSCHMAR, M.M.; NICHTERLEIN, T.M.; HOF, H.M.; MORSCHHAUSER, J. Transcriptional regulators cph1 and efg 1 mediate activation of the *Candida albicans* virulence gene sap5 during infection. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 921-927, 2002.
- STOLL, B.J.; HANSEN, N.; FANAROFF, A.A. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. **Pediatrics**, v. 110, p. 285–291, 2002.
- SU, H.; HSIEH, H.Y.; CHIU, H.Y.; LIN, H.C. Nosocomial infection in a neonatal intensive care unit: a prospective study in Taiwan. **Am. J. Infect. Control.**, v. 35,p. 190-5, 2007.
- SULLIVAN, D. J..; MORAN, G. P.; COLEMAN, D.C. *Candida dubliniensis*: ten years on. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 253, p. 9-17, 2005.
- SULLIVAN, D.; COLEMAN, D. *Candida dubliniensis*: Characteristics and identification. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 329-334, 1998.
- TAKAKURA, S.; FUJIHARA, N.; SAITO, T.; KUDO, T.; IINUMA, Y.; ICHIYAMA, S. Japan Invasive mycosis surveillance study group clinical factors associated with fluconazole resistance and short-term survival in patients with candida bloodstream infection. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.23, p. 380-8, 2004.

TAWARA, S.; IKEDA, F.; MAKI, K. In vitro activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK463, against a variety of clinically important fungi. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p. 57–62, 2000.

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

TÉLLEZ-CASTILLO, C. J.; FORTUÑO M.G.; CENTELLES-SALES, I.; SABATER-VIDAL, S.; SERRANO F.P. *Trichosporon asahii* fatal infection in a preterm newborn. **Rev. Child Infect.**, v. 25, p. 213-215, 2008.

TORTORANO, A. M.; CASPANI, L.; RIGONI, A. L.; BIRAGHI, E.; SICIGNANO, A.; VIVIANI, M. A. Candidosis in the intensive care unit: a 20-year survey. **J. Hosp. Infect.,** V. 57, 8–13, 2004.

TUMBARELLO, M.; POSTERARO, B.; TRECARICHI, E.M.; FIORI, B.; ROSSI, M.; PORTA, R.; DONATI, K.G.; LA SORDA, M.; SPANU, T.; FADDA, G.; CAUDA, R.; SANGUINETTI, M. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. **J. Clin. Microbiol.,**v.45, p. 1843–1850, 2007.

VAZQUEZ, J.A.; SÁNCHEZ, V.; DMUCHOWSKI, C.; DEMBRY, L.M.; SOBEL, J.D.; ZERVOS, M.J. Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: an epidemiologic study. **J. Infect. Dis.**,v. 168, p. 195-201, 1993.

VENDETUOLLI, V.; TANA, M.; TIRONE, C. The role of *Candida* surveillance cultures for identification of a preterm subpopulation at highest risk for invasive fungal infection. **Pediatr. Infect .Dis. J.,** v. 27, p. 1111-1114, 2007.

VRIONI, G.; MATSIOTA-BERNARD, P. Molecular typing of *Candida* isolates from patients hospitalized in na intensive care unit. **J. Infect.**, v. 42, p. 50-56, 2001.

WAGGONER-FOUNTAIN, LA, WALKER, M.W.; HOLLIS, R.J.; PFALLER, M.A.; FERGUSON, J.E.; WENZEL, R.P.; DONOWITZ, L.G. Vertical and horizontal transmission of unique *Candida* species to premature newborns. **Olin.Infect. Dis.**, v. 22, p. 803-808, 1996.

WAGGONER-FOUNTAIN, L.A.; DONOWITZ, L.G. Infection in the newborn. In: Wenzel, R.P. (Ed). **Prevetion and Control of nosocomial infections.** Baltimore: Williams & Wilkins, 1997. p. 1019-1038.

WALSH, T.J.; GROLL, A.; HIEMENZ, J.; FLEMING, R.; ROILIDES, E.; ANAISSIE, E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. **Clin. Microbiol. Infect..**,v. 10, p. 48-66, 2004.

WANG, J.S.; LI, S.Y.; YANG, Y.L.; CHOU, H.H.; LO, H.J. Association between fluconazole susceptibility and genetic relatedness among *Candida tropicalis* isolates in taiwan. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, p. 650-3, 2007.

WESTBROOK, S.D.; KIRKPATRICK, W.R.; FREYTESS, C.O.; TORO, J.J.; BERNARDO, S.; PATTERSON, T.F.; REDDING, S.W.; LEE, S.A. Medical Candida krusei sepsis secondary to oral colonization in ahemopoietic stem cell transplant recipient. **Mycology**, v., 45,p.187-190, 2007.

WINGARD, J. R.; MERZ, W. G.; RINALDI, M.G.; JOHNSON, T.R.; RARP, J. E.; SARAL, R. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treat prophylactic with fluconazole. **N. England. J. Med.**, v. 31, p. 1274-7, 1991.

WINGARD, J.R. Importance of Candida species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, p. 115-125, 1995.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S.M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R.P.; EDMOND, M.B. Nosocomial bloodstream infections in us hospitals: analysis of 24,179 cases from aprospective nationwide surveillance study. **Clin. Infect. Dis.**, v. 39, p. 309-17, 2004.

WONG, A.R.; IBRAHIM, H.; VAN ROSTENBERGHE, H.; ISHAK, Z.; RADZI, M.J. *Hansenula anomala* infection in a neonate. **J. Paediatr. Child. Health.**, v. 36, p. 609–10, 2000.

XAVIER, P.C.; CHANG, M.R.; NUNES, M.O.; PALHARES, D.B.; SILVA, R.A.; BONFIM, G.F.; ALMEIDA, N.F. Neonatal candidemia in a public hospital in Mato Grosso do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.41, p. 459-63, 2008.

ZAAS, A.K.; BOYCE, M.; SCHELL, W.; LODGE, B.A.; MILLER, J.L. Risk of fungemia due to *Rhodotorula* and antifungal susceptibilitytesting of *Rhodotorula* isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 5233- 5, 2003.

ZAOUTIS, T.E.; HEYDON, K.; LOCALIO, R. Outcomes attributable to neonatal candidiasis. **Clin. Infect. Dis.**; v. 44, p. 1187–1193, 2007.