Jesila Pinto Machado Marretto

Caracterização da Candidemia por *Candida parapsilosis* (sensu lato) em recém-nascidos: aspectos epidemiológicos, clínicos, moleculares e susceptibilidade a antifúngicos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Pediatria

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Esther Jurfest
Rivero Ceccon

SÃO PAULO

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Marretto, Jesila Pinto Machado

Carecterização da Candidemia por *Candida parapsilosis* (sensu lato) em recém-nascidos : aspectos epidemiológicos, clínicos, moleculares e susceptibilidade a antifúngicos / Jesila Pinto Machado Marretto. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.

Orientador: Maria Esther Jurfest Rivero Ceccon.

Descritores: 1.Candidemia 2.Candida 3.Recém-nascido 4.Epidemiologia
5.Prevalência 6.Antifúngicos 7.Infecção hospitalar

USP/FM/DBD-231/14

AGRADECIMENTOS

A minha gratidão se estende a todas as pessoas que em maior ou menor grau, direta ou indiretamente, colaboraram para a consolidação deste projeto em uma tese.

À querida Dra. Maria Esther Jurfest Ceccon (Dra. Chichina!) pelo acolhimento, desde o primeiro contato. Sua orientação suave e competente, foram essenciais para a conclusão desta pesquisa.

Às Coordenadoras do doutorado em Pediatria: Professora Cristina Miuk Jacob, Professora Sandra Vieira e Professora Cléa Leone. Com respeito e admiração, agradeço.

Ao Prof. Werther, Coordenador Geral do doutorado em Pediatria da FMUSP, sempre com excelentes sugestões oportunas!

Ao Prof. Paulo Roberto Bezerra de Mello, Coordenador local do Programa de Doutorado em Pediatria e que esteve à frente das negociações

Às professoras Sandra Coenga e Olga Takano, por toda a dedicação ao processo de implantação do doutorado e apoio constante aos alunos.

À professora Rosane Christine Hahn, que gentilmente cedeu as amostras de *C. parapsilosis* e permitiu a realização das provas de susceptibilidade a antifúngicos no laboratório de micologia da FM da UFMT, além das inúmeras sugestões

Prof. Luciano Nakasato por permitir a realização da PCR, no laboratório de biologia molecular da Faculdade de Veterinária.

Prof^a. Valéria Dutra, por gentilmente disponibilizar o laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina Veterinária para dar apoio aos testes moleculares.

Ao Prof^o. Dr. Alexandre Paulo Machado, pelo estímulo e apoio constantes.

À bioquímica Tomoko Tadano pelo isolamento e identificação fenotípica das leveduras utilizadas em nosso trabalho.

A todos os colegas de turma do doutorado, pelas sugestões e convívio agradável

À Secretária da Pós-Graduação Mônica Souza, pela gentileza, presteza e eficiência.

À Bibliotecária Marisa... pelo carinho no atendimento.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: Citações indiretas.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Lista de tabelas

Lista de gráfico

Lista de figura

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Conceitos	3
1.2	Gênero Candida	4
1.3	Candidíase	5
1.4	Candidemia	6
1.5	Diagnóstico de candidemia	9
1.5.1.	Clínico	9
1.5.2.	Laboratorial	9
1.5.3.	Tratamento	11
1.5.4.	Profilaxia.....	12
2	JUSTIFICATIVA	13
3	HIPÓTESE	15
4	OBJETIVOS	17
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
6	CASUÍSTICA.....	21
6.1.	Local de estudo:.....	22
6.2.	Critérios de Inclusão:.....	22
6.3.	Aspectos Éticos.....	22
7	MÉTODOS	70
7.1.	Teste de susceptibilidade in vitro a antifúngicos	25
7.2.	Caracterização Molecular.....	26
7.3.	Obtenção das amostras	26
7.4.	Extração do DNA.....	26
7.5.	Reação da PCR	27
7.6.	Sequenciamento do DNA.....	28
8	RESULTADOS	29

8.1.	Dados Obstétricos e Maternos	32
8.2.	Dados Neonatais	32
8.3.	Dados Clínicos e Laboratoriais.....	35
8.4.	Teste in vitro de susceptibilidade a antifúngicos	38
8.5.	Análise molecular	39
8.5.1.	Método da PCR.....	39
8.5.2.	Sequenciamento dos fragmentos de DNA amplificados pela PCR	39
9	DISCUSSÃO	41
10	CONCLUSÕES	50
11	REFERÊNCIAS.....	52

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Distribuição da indicação de cesárea.....	32
Tabela 2 – Distribuição dos isolados do complexo <i>C. parapsilosis</i> lato sensu, quanto às CIMs de anfotericina B, voriconizol e caspofungina, consideradas através do método do Etest.....	38
Tabela 3 – Identificação de isolados.....	40
Tabela 4 – Números de acesso do GenBank para as sequências de nucleotídeo.....	40

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - distribuição das espécies de <i>Candida</i> observadas nos recém-nascidos que tiveram infecção fúngica comprovada em hemocultura.	30
Gráfico 2 - Distribuição da prevalência de <i>C.parapsilosis</i> de acordo com hospital e ano avaliado.....	31
Gráfico 3 - Distribuição da prevalência de <i>C.parapsilosis</i> entre RNPT e RNT de acordo com ano de avaliação.....	33
Gráfico 4 – Prevalência de <i>C. parapsilosis</i> de acordo com o gênero.....	34
Gráfico 5 – Idade à Internação dos casos diagnosticados com <i>C. parapsilosis</i>	35
Gráfico 6 – Distribuição de Febre entre os casos diagnosticados com <i>C. parapsilosis</i>	35
Gráfico 7 – Distribuição de Hipotermia entre os casos diagnosticados com <i>C. parapsilosis</i>	36
Gráfico 8 – Distribuição de Plaquetopenia entre os casos diagnosticados com <i>C. parapsilosis</i>	37
Gráfico 9 - Evolução dos casos diagnosticados com <i>C. parapsilosis</i>	37

Lista de Figura

Figura 1: Teste de susceptibilidade a antifúngicos, através do Etest.....	39
--	----

RESUMO

Marretto JPM. **Caracterização da Candidemia por *Candida parapsilosis* (sensu lato) em recém-nascidos: aspectos epidemiológicos, clínicos, moleculares e susceptibilidade a antifúngicos** [tese]. São Paulo; Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUÇÃO: Embora *Candida albicans* continue sendo a espécie mais isolada na sepse fúngica do recém-nascido (RN), a recuperação de espécies não-*albicans* vem aumentando significativamente, sobretudo nos últimos anos.

OBJETIVOS: Verificar a prevalência das espécies de *Candida*, principalmente do complexo *C. parapsilosis* em RN infectados por estes agentes, a apresentação clínica, o desfecho (alta ou óbito), o diagnóstico molecular e o perfil de susceptibilidade in vitro à antifúngicos.

CASUISTICA E METODOS: Trata-se de estudo retrospectivo observacional, aprovado pelos Comitês de Pesquisa dos hospitais estudados na cidade de Cuiabá com ciência da CAPpesq do Hospital das clínicas da FMUSP. O período de análise dos dados registrados nos prontuários foi de 2006 a 2012 e foram incluídos 54 RN no estudo. Todos eles tinham hemocultura positiva para fungos e apresentavam sinais clínicos de sepse, segundo critérios de Goldstein et al. (2005) sem melhora com antibioticoterapia. Foram excluídos os RN com hemoculturas positivas para bactérias no mesmo período ou com hemocultura negativa. Para isolamento dos fungos foram utilizados a hemocultura para fungos, e nos casos de *C. parapsilosis* a caracterização molecular dos isolados foi realizada em duplicata, por reação em cadeia da polimerase (PCR) e o teste de susceptibilidade in vitro a antifúngicos foi realizado empregando-se o método do Etest.

RESULTADOS: A prevalência geral foi de 1,66% IC 95% [1,25%; 2,16%] e a de *C. parapsilosis* (lato senso) 0,77% (IC 95% [0,50% ; 1,14%]), superior ao observado na literatura. Do complexo *C. parapsilosis* foi identificada a *C. orthopsilosis*, isolada pela primeira vez na cidade do Cuiába em RN como agente etiológico de infecção. O encontro de *C. orthopsilosis*, em nosso estudo foi de 11,1% valor semelhante ao percentual isolado em outros estudos na América Latina. As manifestações clínicas em ordem de frequência foram

hipertermia, hipotermia e plaquetopenia e nestes pacientes foi estatisticamente significativa o uso de cateter venoso central ($p < 0,001$), nutrição parenteral ($p < 0,001$) e ventilação mecânica ($p < 0,001$). Todos os isolados de *C.parapsilosis* lato sensu apresentaram sensibilidade in vitro aos três antifúngicos testados (anfoterina B, micafungina, voriconazol). A taxa de mortalidade foi de 24%.

CONCLUSÕES: O aumento da infecção fúngica nos RN internados nas Unidades de Cuidados Intensivos Neonatais torna obrigatório este tipo de estudo, pois contribui para conhecer os aspectos epidemiológicos, os desfechos clínicos (alta ou óbito), os fatores associados a este tipo de infecção além da susceptibilidade aos antifúngicos e são de grande importância para auxiliarem nos programas de controle de infecção hospitalar.

DESCRIPTORES: 1.Candidemia 2.Candida 3.Recém-nascido 4.Epidemiologia 5.Prevalência 6.Antifúngicos 7.Infecção hospitalar.

SUMMARY

Marretto JPM. **Characterization of *Candida parapsilosis candidemia* (sensu lato) in neonates: epidemiological, clinical, molecular and susceptibility to antifungal agents** [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

INTRODUCTION: Although *Candida albicans* remains the most frequent species in fungal sepsis of newborn, the recovery of non-*albicans* species has increased significantly, especially in recent years. **OBJECTIVES:** To determine the prevalence of *Candida* species, mainly *C. parapsilosis* Complex in infants infected by these agents, clinical presentation, outcome (discharge or death), molecular diagnosis and susceptibility profile in vitro to antifungal agents. **METHODS:** This is a retrospective observational study approved by the Research Committees of the hospitals studied in the city of Cuiabá with science CAPPesq do Hospital das Clínicas da FMUSP. The period of analysis of data from medical records was 2006-2012 and 54 infants were included in the study. All of them had positive blood cultures for fungi and clinical signs of sepsis, according to criteria of Goldstein et al., (2005) and did not improve with antibiotic therapy. The newborns excluded were than them have blood negatives for bacterial in the same period. For isolation of the fungi blood cultures were used, and in cases of *C. parapsilosis*, were done molecular characterization and were performed in duplicate by polymerase chain reaction (PCR) and susceptibility testing of antifungal in vitro was performed employing the Etest method . **RESULTS :** The overall prevalence was 1.66 % CI 95 % [1.25 % ; 2.16 %] and *C. parapsilosis* (sensu lato) 0.77 % (95% CI [0.50 % , 1.14 %]) , higher than that observed in the literature. In the *parapsilosis* complex was identified *C. orthopsilosis*. This is the first isolated in the Cuiabá city in one newborn as the etiological agent of infection. The finding of *C. orthopsilosis* in our study was 11.1 % the same to the percentage isolated in other studies in Latin America. Clinical manifestations in order of frequency were hyperthermia, hypothermia and thrombocytopenia. The use of of central venous catheter ($p < 0.001$), parenteral nutrition ($p < 0.001$) and mechanical

ventilation (< 0.001) have statistical significance with p value $< 0,01$. All isolates of *C. parapsilosis* sensu lato were susceptible in vitro to three antifungal agents tested (anfoterina B, micafungin, voriconazole) . The mortality rate was 24 %.

CONCLUSIONS: The increase in fungal infection in infants hospitalized in the Neonatal Intensive Care Units mandating this type of study because it helps to know the epidemiological, clinical aspects (discharge or death), factors associate beyond susceptibility to antifungal agents and are of great importance to aid in the hospital infection control programs.

KEYWORDS: 1.Candida 2.Candidemia 3.Newborn 4.Epidemiology
5.Prevalence 6.Fungal 7.Infection Control.

1 INTRODUÇÃO

O reconhecimento inicial de leveduras como agentes de infecção humana é atribuído ao médico grego Hipócrates de Cos (460–370 a.C) que, referindo-se a pacientes debilitados, registrou em seu tratado “*epidemics*”:

“Mas há também outras febres...

Muitos tinham suas bocas afetadas
por ulcerações aftosas”.

Galeno de Pergamo (129-199) também observou lesões semelhantes na boca de crianças. No século I, o romano Aulus Cornelius Celsus destacou em seus escritos, o risco que as úlceras (aftas, na Grécia) representavam para a vida das crianças, dado que essas lesões geralmente se expandiam por toda a boca e alcançavam a garganta, resultando em um quadro clínico de recuperação difícil, especialmente nos lactentes, que ficavam sujeitos à desnutrição, devido à dificuldade de amamentação.

Observações semelhantes foram feitas por Rosen von Rosenstein, em seu livro “*The diseases of children and their remedies*” (primeira publicação em 1764, no idioma sueco), descrevendo ainda as diferenças da patologia, conforme a localização das aftas, ou seja, orofaringe, estômago, intestino e pulmões das crianças (Dunn,1991). Esses achados, dentre outros, são compatíveis com a micose hoje denominada candidíase. Contudo, a estrutura e os aspectos biológicos dos fungos só começaram a serem investigados, com maior critério, após o desenvolvimento do microscópio, no século VII e da implantação de técnicas de cultura pura, no século XIX.

A descoberta do agente causador da candidíase ocorreu em 1839, quando Langenbeck comunicou o encontro de fungos na orofaringe e esôfago, à necrópsia de um homem, vítima de febre tifóide. Sua narrativa corresponde perfeitamente ao quadro de uma grave candidíase orofaringo-esofagiana. Não obstante, equivocou-se ao sugerir uma conexão entre o fungo e a patofisiologia da febre tifóide. Pouco tempo depois, em 1846, Berg elucidou definitivamente o agente etiológico da candidíase, a levedura classificada por Robim como *Oidium albicans*, em 1853. Após receber mais de 100 sinônimos, esse fungo é hoje conhecido como *Candida albicans* (Barnet, 2008; Knoke e Bernhardt, 2006; Calderone, 2002; Pardi e Cardozo, 2002).

Nos anos seguintes, foram identificadas outras leveduras do gênero *Candida*, sobretudo na primeira metade do século XX. Por volta de 1963, eram reconhecidas cerca de cinco espécies do gênero *Candida*, com interesse médico: *C. albicans*, *C. stellatoidea* (atualmente considerada sinonímia de *C. albicans*), *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii* (Hazen, 1995; Pardi e Cardozo, 2002).

1.1 Conceitos

Leveduras são fungos unicelulares, pertencentes aos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*, apresentam morfologia oval, arredondada ou alongada e se reproduzem assexuadamente (estado anamorfo), por brotamento ou fissão de células somáticas. No processo de brotamento, forma-se um blastoconídio (broto ou gema) na superfície da levedura, que se separa, formando uma nova célula ou, em alguns casos, permanece preso à célula mãe, podendo ele mesmo vir a originar outro blastoconídio. Quando a repetição desse evento culmina com a formação de um arranjo em cadeia e as células são separadas entre si por uma constricção no septo, forma-se uma estrutura chamada pseudo-hifa. As hifas verdadeiras não apresentam constricção e sim paredes paralelas em seus septos, separando as células adjacentes. Algumas leveduras também se reproduzem sexuadamente (estado teleomorfo), principalmente as ascosporogêneas (Tortora et al, 2000).

Com ampla distribuição geográfica, as leveduras podem ser encontradas no solo, água, vegetais, animais e em seres humanos, constituindo um grupo heterogêneo de micro-organismos, não relacionados entre si. Alguns fungos exibem duas morfologias. Para os fungos patogênicos, o dimorfismo é dependente da temperatura em que se encontram. Na fase saprofítica, esses fungos crescem em uma faixa de temperatura entre 22°C a 30°C, assumindo a forma filamentosa (multicelular). Nos tecidos ou em cultivos *in vitro* a 37°C, tornam-se leveduriformes (Brandt et al, 2011; Cooper Jr, 2011; Kurtzman et al, 2011; Treagan, 2008; Bowman e Ahearn, 1975).

1.2 Gênero *Candida*

As espécies do gênero *Candida* são ascomicetos, com dimorfismo invertido. Isto é, ao contrário de outros fungos dimórficos, crescem como leveduras na fase saprofítica e filamentam nos tecidos e em cultura à 35o C - 37o C, excluindo *C. glabrata* que é haploide e são encontradas apenas como células individuais (Tortora et al., 2000, Brandt et al., 2011).

As espécies de *Candida* ocupam uma grande variedade de habitats e nichos ecológicos na natureza. A capacidade de crescimento anaeróbico facultativo confere a esses organismos a propriedade de utilizar muitas substâncias orgânicas (Tortora et al., 2000)

Algumas espécies de *Candida* vivem uma relação de comensalismo com animais e humanos, fazendo parte da microbiota residente ou transitória. Cerca de até 80% das pessoas saudáveis carregam uma ou mais *Candida* spp, na superfície do trato gastrointestinal, tecidos mucocutâneos e pele, assintomaticamente (Pfaller 1996, Wingard 1999, Tortora et al., 2000, Murray et al., 2006, Trabulsi e Alterthum, 2008, Cooper, 2011).

Todavia, o desfecho da interação entre *Candida* spp e o hospedeiro depende da virulência e outros fatores do micro-organismo e da susceptibilidade do hospedeiro. Por exemplo, as espécies de *Candida* são comensais dos seres humanos, mas sendo patógenos oportunistas, podem explorar as fragilidades locais ou sistêmicas na resistência do hospedeiro e invadir tecidos normalmente estéreis, danificando tecidos (Wingard 1999, Vazquez e Sobel 2003).

Do mesmo modo, as *Candidas* spp que se encontram no ambiente inanimado também podem causar infecções oportunistas (Vila e Martínez, 2007). Até o presente, já foram descritas aproximadamente duzentas espécies de *Cândida*. No entanto, somente cerca de 10% são consideradas patogênicas para pessoas (Wingard 1999, Vazquez e Sobel 2003), embora, virtualmente, qualquer fungo, capaz de se multiplicar em tecidos humanos, possa causar infecção fatal em indivíduos imunocomprometidos ou naqueles com certas doenças de base crônicas (Pfaller 1996, Vila e Martínez 2007) A doença em si não predispõe às infecções oportunistas e sim as alterações nas defesas do hospedeiro,

provocadas por certos tratamentos. Mucosite e neutropenia são exemplos de efeitos adversos à quimioterapia, que facilitam as infecções (Wingar 1999).

Infecções associadas com *Candida* spp. vêm sendo descritas ao longo dos tempos, principalmente as micoses superficiais. Até o início da década de 1960, candidíases profundas eram acontecimentos raros (Hurley, 1964). A partir de então, *Candida* spp foi se convertendo de patógeno incomum a um dos agentes mais importantes e frequentes de infecção hospitalar (Edwards 1991, Fidel et al., 1999).

A introdução de antibióticos antibacterianos no início da década de 1940 pode ter sido um fato decisivo para o surgimento de novos tipos de infecção fúngica. A eliminação de bactérias da microbiota autóctone, sensíveis aos antibióticos utilizados, facilita a proliferação de *Candida* spp no intestino e esse é o primeiro passo para tais micro-organismos causarem infecção.

O uso de antibióticos com amplo espectro de ação potencializa o risco de infecção fúngica (Wingard 1999). O exame da flora fecal e de mucosas de pacientes tratados com antibacterianos mostrou um aumento expressivo do número de leveduras, relacionado com o decréscimo de bactérias susceptíveis ao antibiótico usado (Seelig, 1966). Outros fatores que levam ao aumento das infecções fúngicas incluem o uso de corticosteroides, imunossupressores, anti-neoplásicos, bloqueadores H2 e procedimentos invasivos.

1.3 Candidíase

Candidíase ou candidose (outrora monilíase) são termos usados para designar as leveduroses produzidas por espécies de *Cândida* (Brandt et al., 2011). O universo da patologia relacionada com essas leveduras é muito amplo, abrangendo infecções superficiais, cutâneo-mucosas ou profundas, de caráter essencialmente oportunista.

As manifestações clínicas da candidíase variam desde quadros esporádicos, crônicos, subagudos e agudos, envolvendo reações localizadas ou sistêmicas, de acordo com o sítio anatômico onde se encontra o parasita. O termo candidíase invasiva refere-se a várias condições, que incluem infecção do sangue, candidíase aguda disseminada, candidíase renal, endoftalmite,

endocardite, meningite, esofagite, estomatite, doença intra-abdominal e candidíase hepatoesplênica crônica, embora praticamente qualquer órgão possa ser envolvido (Spellberg e Edwards, 2002).

Nódulos cutâneos e lesões papulares eritematosas, acompanhados ou não de quadro hemorrágico e trombocitopenia, além de alterações sistêmicas, também são passíveis de ocorrer. (Murray et al., 2006). A candidíase invasiva provoca alta morbidade e mortalidade, gerando um impacto significativo na saúde pública (Trofa et al., 2008).

Há situações em que o envolvimento de *Candida* spp é difícil de ser estabelecido, uma vez que esses micro-organismos podem ser habitantes transitórios de diferentes locais do corpo dos indivíduos, além da possibilidade de atuarem como agentes de infecções secundárias. Desta maneira, espécies de *Candida* podem ser recuperadas do trato urinário, por exemplo, sem estarem relacionados com infecção fúngica e sim com colonização superficial (Lynch 1994, Vazquez 2000).

As lesões orais podem ser o primeiro sinal de muitas doenças sistêmicas. Hipócrates, Galeno e outros já consideravam a língua como um barômetro da saúde, chamando à atenção para a sua importância diagnóstica e prognóstica (Sunil et al., 2013). Neste contexto, a candidíase oral pode ser interpretada como marcador clínico para uma doença de base importante (Ohkawa e Tokunaga, 1992).

1.4 Candidemia

A fungemia causada por leveduras do gênero *Candida* recebe o nome peculiar de candidemia, definida como sendo o isolamento de *Candida* spp em, no mínimo, um exame de hemocultura. (Nieto-Rodriguez et al., 1996). Casos de candidemia têm sido frequentes em pacientes hospitalizados (Pfaller, 1996). Às vezes, a candidemia é referida como “a doença do doente”, por acometer tipicamente pacientes imunocomprometidos ou submetidos a tratamento médico invasivo (Grow 2002), em especial, aqueles internados em Unidades de Terapia Intensiva, os neutropênicos, transplantados e os recém-nascidos (RN) (Baer e Pappas 2009).

A candidemia pode se originar de fontes endógenas, principalmente a partir do trato gastrointestinal colonizado por *Candida* spp. Situações que desequilibram a microbiota ou lesam a mucosa gastrointestinal, possibilitam a translocação de *Candida* spp até os capilares mesentéricos, alcançando assim a corrente sanguínea.

Fatores inerentes ao hospedeiro, os vários esquemas de tratamento, os antibióticos ou outras medidas de cuidados de suporte, empregados na abordagem dos pacientes, influenciam do mesmo modo o aumento da frequência de candidemia (Saiman et al., 2000).

O micro-organismo pode fazer parte da microbiota da pele, ser adquirido por contato direto, (em particular, quando veiculado pelas mãos dos profissionais de saúde), sendo, na maioria das vezes, decorrente de fatores iatrogênicos como utilização de cateteres, implantação de sondas e próteses, administrações parenterais de drogas e de nutrição parenteral prolongada, ventilação mecânica (Pfaller, 1996).

As espécies isoladas com maior frequência das infecções hematogênicas são *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei* (Badenhorst et al., 1991; Banerjee et al., 1991). Nos Estados Unidos, o Centro de Controle de Doenças (CDC) constatou que entre 1980 e 1990, houve um aumento na incidência de candidemia da ordem de 400% nos principais hospitais americanos (Beck-Sagué, 1993).

Na Europa, Voss et al., (1996) relataram que, entre 1987 e 1995, os casos de candidemia, documentados em 5 hospitais da Holanda, aumentaram cerca de 100%, passando de 53 para 95 episódios/ano. No Brasil, Colombo et al., (2003) reuniram dados sobre infecções do sangue em pacientes de quatro hospitais da Cidade de São Paulo e observaram que as *Candidas* spp responderam por 4,3 % das infecções, no período de 2002 a 2003. Nos últimos anos, houve um aumento notável na frequência e na importância das infecções fúngicas oportunistas em hospitais pediátricos (Dornbusch et al., 2009).

Em uma investigação, realizada nos Estados Unidos, envolvendo seis unidades neonatais de regiões diferentes, observou-se candidemia em 1,2% dos RN, sendo 82% deles, de peso inferior a 1500g. ou seja, de muito baixo peso. Saiman et al., em 2000 e Sastre et al., em 2003, avaliaram a epidemiologia da

candidíase na Espanha, durante 18 meses, e encontraram 118 neonatos (0,57%) que tiveram diagnóstico de candidíase sistêmica, também com maior incidência nos RN de MBP (4,8%) em relação àqueles que pesavam acima de 1.500g (0,2%). No período neonatal, a candidemia está relacionada com elevadas taxas de morbimortalidade.

A invasão da corrente sanguínea por espécies de *Candida* pode comprometer órgãos vitais e causar sequelas graves, como complicações neurológicas decorrentes de meningite fúngica, endocardite e falência renal.

Em relação à prevalência das diferentes espécies do gênero *Candida*, a *C. parapsilosis* vem despontando como um agente de infecção oportunística importante. Esta *Candida* é um comensal das superfícies mucosas, pele e unha de humanos e animais. No entanto, ao contrário de *C. albicans* e *C. tropicalis* não é um patógeno humano obrigatório e pode ser isolada de fontes variadas como solo, insetos, água do mar, e plantas (Weems 1992). No estágio saprofítico, esta *Candida* produz células leveduriformes ovais, redondas ou cilíndricas. Na fase parasitária podem ser encontradas em forma de leveduras ou de pseudo-hifas.

O primeiro isolamento de *C. parapsilosis* foi realizado por Ashford, em 1928, a partir de fezes diarreicas de um paciente, procedente de Porto Rico (Ashford, 1928).

Inicialmente denominada *Monilia parapsilosis*, a levedura foi considerada como um comensal da microbiota intestinal, até ser reconhecida em 1940, como o agente etiológico, de um caso fatal de endocardite, em um paciente usuário de droga injetável (Joachim e Polayes 1940). Esse caso levou os estudiosos da época a aventarem uma correlação entre a introdução exógena da levedura por via endovenosa com infecção invasiva.

Investigações posteriores estabeleceram a ligação de *C. parapsilosis* com procedimentos médicos invasivos e soluções parenterais (Weems, 1992). Desde o reconhecimento de sua patogenicidade, a *C. parapsilosis* vem sendo responsabilizada por diversas patologias, como: endoftalmite, infecções da pele, onicomicose, peritonite, artrite, candidemia e endocardite (Weems, 1992). No Brasil, infecções por *C. parapsilosis* foram descritas tanto em RN de muito baixo peso ao nascer como em adultos.

1.5 Diagnóstico de candidemia

1.5.1. Clínico

O diagnóstico da candidemia é baseado nos achados clínicos combinados com os exames de laboratório. No entanto, o diagnóstico clínico das fungemias é complicado, em parte, devido à sintomatologia inespecífica que pode ser comum a outros tipos de infecção, doença de base e complicações do tratamento, representando assim, um desafio aos profissionais de saúde (Banerjee et al., 1991; Brandt et al., 2011). No entanto é possível observar os sinais da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) os quais associados a um processo infeccioso denomina-se de sepse clínica. (Bone, 1991). Estes sinais são febre ou hipotermia, taquipneia, taquicardia e alterações da contagem de leucócitos no hemograma. Sendo obrigatórios nesta definição a presença de febre e a alteração do hemograma.

Ainda podem-se observar outros sinais e sintomas de infecção como icterícia, a custos de bilirrubina direta, diminuição da contagem de plaquetas (plaquetopenia), sendo este último às vezes o prenúncio de uma infecção fúngica. Anemia e aumento de fígado e baço costumam estar presentes.

Devido à infecção fúngica no paciente com pouca imunidade ou no caso desta ser imatura não ser infrequente, como no paciente RN, é realizada além dos exames específicos, exames gerais para verificar a invasão dos órgãos por este micro-organismo, como fundo de olho, ecocardiograma, ultrassonografia crânio e de abdome para verificar além de fígado e baço, também o trato urinário e exame do líquido cefalorraquidiano desde que o número de plaquetas esteja normal ou pelo menos superior a 100.000 mm³.

1.5.2. Laboratorial

A presença de *Candida* spp na corrente sanguínea pode ser comprovada através do isolamento de leveduras em cultura de sangue, seguido de identificação da espécie. Na rotina hospitalar, os fungos são geralmente identificados por métodos fenotípicos tradicionais, baseados nas características

fisiológicas, como morfologia e temperatura de crescimento e em propriedades bioquímicas, que incluem a prova de assimilação de carboidratos e de compostos nitrogenados (auxanograma) e o teste de fermentação de carboidratos (zimograma).

O exame direto da amostra clínica possibilita a observação de blastoconídios, pseudo-hifas e hifas verdadeiras. Por meio da técnica de microcultivo em ágar-fubá-Tween-80, verifica-se a micromorfologia, filamentação e presença de clamidósporo. Afora *C. glabrata*, todas as demais espécies produzem pseudo-hifas e algumas (*C. albicans*, *C. dubliniensis*) produzem também hifas verdadeiras.

As espécies de *Candida* podem ser isoladas na maioria dos meios de cultivo de uso corriqueiro. Um dos mais utilizados é o ágar Sabouraud dextrose, que permite a visualização de colônias de leveduras, de consistência cremosa e coloração branca a creme. O teste da produção do tubo germinativo em condições e meios especiais contendo soro ou albumina possibilita a identificação presuntiva rápida de *C. albicans*, auxiliando na diferenciação de outras espécies do mesmo gênero. *C. dubliniensis* também é positiva à prova do desenvolvimento do tubo germinativo e pode ser diferenciada de *C. albicans*, através de prova específica. Existem métodos para a identificação de leveduras, que otimizam a caracterização dos isolados, como os meios cromogênicos CHROMagar *Candida*, *Cândida* ID agar e *Cândida* chromogenic agar, usados para o isolamento primário e identificação presuntiva rápida de espécies de *Candida*, facilitando também o reconhecimento de culturas mistas. Tais meios possuem vários corantes químicos, que são captados pelas *Candidas* spp, resultando na produção de colônias coloridas. Por exemplo, em CHROMagar *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* formam colônias verdes, azuis e rosa escuro a púrpura, respectivamente. As demais espécies formam colônias brancas a róseas.

Estão disponíveis no mercado, sistemas comerciais para identificação fenotípica de leveduras, como os kits API 20C e API 32C. Esses sistemas consistem de galerias plásticas, contendo poços com vários compostos de carbono, onde a suspensão da levedura é inoculada para testar a capacidade de assimilação do micro-organismo. Os resultados geram um perfil numérico que é interpretado com o auxílio de um programa de computador, ligado a uma base de

dados. O diagnóstico microbiológico da candidemia pode também ser realizado através de sistemas automatizados, como o Bactec e BacT/ALERT 3D que realizam hemocultura de forma totalmente automatizada, tendo como base a detecção por fluorescência ou colorimetria.

Após o isolamento do fungo, sistemas de automação, computadorizados, como o VITEK 2, fazem a identificação da levedura, através da realização e interpretação de várias provas bioquímicas. (Koneman et al., 2001; Araújo, 2012).

A tipagem de micro-organismos isolados de casos de infecção hospitalar por métodos moleculares tem contribuído enormemente para a compreensão da epidemiologia da candidemia. A tipagem molecular também possibilita a comparação da identidade entre a cepa da levedura isolada em hemocultura e a cepa colonizadora. Esses métodos são muito úteis para entender os mecanismos de transmissão cruzada de *Candida* spp entre os pacientes, entre profissionais de saúde e paciente e tem sido empregado para identificar a fonte disseminadora do micro-organismo em caso de surtos de candidíase invasiva, assim como para detectar reservatórios do fungo em materiais inanimados, (Cantón et al., 2001)

O teste da reação da polimerase em cadeia (PCR) é uma técnica com alta sensibilidade e especificidade e tem sido empregada com sucesso na identificação de leveduras do gênero *Candida*.

1.5.3. Tratamento

O tratamento das infecções fúngicas pode ser muito difícil. Por serem eucariontes, os fungos compartilham várias vias do metabolismo celular básico com os seres humanos. Este fato contribui de maneira bastante significativa para limitar a disponibilidade de drogas antifúngicas que apresentem toxicidade seletiva. Em consequência, muitas vezes o tratamento com antifúngicos não tem sucesso, podendo a taxa de mortalidade alcançar 30-50% (Gow, 2002).

Atualmente estão disponíveis quatro grupos de antifúngicos para tratamento de candidíase disseminada em UTIN: 1-polienos (ex. anfotericina B ou fungizon). Atuam na membrana citoplasmática, ligando-se ao ergosterol fúngico e criando poros na membrana celular; 2- triazóis (ex. fluconazol, voriconazol). Agem por inibição da enzima demetilase, participante da síntese do ergosterol; 3-

análogos de nucleosídeos: flucitosina (5FC). A flucitosina também conhecida como 5-FC, é um análogo fluorado da citosina que se converte em fluorouracil no organismo. O fluorouracil inibe a timidilato sintetase, alterando a síntese de DNA e a síntese protéica do fungo; 4- Equinocandinas (ex. caspofungina, micafungina) – atuam por inibição da síntese de 1,3-beta-glucano, o que bloqueia a biossíntese da parede celular (Murray et al, 2000, Moreira, 2005 Kaufman, 2010).

1.5.4. Profilaxia

O uso profilático de fluconazol para prevenir a colonização fúngica de RN com peso inferior a 1500g. tem sido considerado eficaz. No entanto, existe a possibilidade de seleção de *Candida* spp com resistência primária a fluconazol, assim como o desenvolvimento de resistência a azóis.

2 JUSTIFICATIVA

Na região Centro Oeste do Brasil, na cidade de Cuiabá, há poucos dados sobre a epidemiologia da candidemia em UTIN. Por esta razão, nos propusemos a investigar a distribuição das espécies causadoras, a apresentação clínica, a evolução dos pacientes infectados com *Candida parapsilosis* (sensu lato), e o perfil de susceptibilidade in vitro a antifúngicos.

3 HIPÓTESE

A nossa hipótese é que além da parte clínica, com a utilização das novas técnicas de identificação, conseguiremos compreender melhor a epidemiologia destes agentes infecciosos.

4 OBJETIVOS

Verificar a prevalência das espécies de *Candida*, principalmente do complexo *C. parapsilosis* em RN infectados por estes agentes, a apresentação clínica, o desfecho (alta ou óbito), o diagnóstico molecular e o perfil de susceptibilidade *in vitro* à antifúngicos.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi estimada a prevalência de *C. parapsilosis* e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%).

Para descrever os dados quantitativos utilizou-se a mediana e valores de mínimo e máximo, enquanto que os dados qualitativos foram descritos através do número e porcentagem.

Foi utilizado o teste de Qui-Quadrado para uma amostra, onde foi testada a hipótese de que a distribuição de *C. parapsilosis* diferia em termos de suas frequências para cada um dos fatores de risco avaliados – prematuridade, gênero do recém-nascido, peso ao nascer, idade à internação, idade materna, tipo de parto, presença de febre, hipotermia, distensão abdominal, plaquetopenia, CVC, nutrição parenteral e evolução do recém-nascido. Ou seja, o teste aplicado (teste Qui-Quadrado) é chamado em estatística de teste de aderência, onde se testa se há diferença significativa entre o número observado de recém-nascidos em determinada categoria, e o respectivo número esperado (Siegel 1981)

Toda análise estatística foi realizada no software SPSS 16.0 for Windows. Adotou-se um nível de significância de 5%, ou seja, foram considerados como estatisticamente significantes os resultados que apresentaram p-valor menor do que 5% ($p < 0,05$).

6 CASUÍSTICA

6.1. Local de estudo:

Estes pacientes foram internados nas UTIN de dois hospitais de ensino, de nível terciário da cidade de Cuiabá, sendo um deles o Hospital Júlio Müller (HUJM) da Universidade Federal de Mato Grosso, conveniado com o Sistema Único de Saúde de Cuiabá e o outro o Hospital Geral Universitário (HGU), administrado pela Universidade de Cuiabá e também conveniado com o Sistema Único de Saúde.

6.2. Critérios de Inclusão:

Foram excluídos os RN com hemoculturas positivas para bactérias no mesmo período, ou com hemocultura negativa para fungos.

6.3. Aspectos Éticos

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUJM, sob nº 952/CEP-HUJM/2010, com anuência do HGU e Ciência do Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP.

Os prontuários dos RN foram buscados nos arquivos do Laboratório de Microbiologia e da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do HUJM e HGU, por meio do registro dos RN internados na UTIN, que tiveram hemocultura positiva para *Candida* spp, no período de estudo e foram encontrados 54 RN. Do formulário constavam os seguintes itens: dados pré-natais, data de nascimento, idade gestacional ao nascimento, idade à internação, gênero, peso de nascimento, Boletim de Apgar (1953) evolução (alta ou óbito), diagnóstico à internação, doença de base, dias de internação quando da suspeita diagnóstica, data da internação, sinais e sintomas de fungemia, fatores de risco (prematuridade, baixo peso ao nascer, neutropenia, cirurgia prévia, uso de cateter venoso central, nutrição parenteral, ventilação mecânica, alterações hematológicas (leucocitose, leucopenia e plaquetopenia), nº de trocas de

antibiótico, uso de aminofilina, bloqueadores H2 e corticosteroide, dia da positividade da hemocultura a partir do dia da suspeita diagnóstica e número de dias para negativar a hemocultura).

7 MÉTODOS

Trata-se de estudo retrospectivo observacional onde foram analisados os dados registrados nos prontuários de 54 pacientes que apresentavam infecção por fungos. As leveduras foram isoladas e identificadas no laboratório de microbiologia do HUJM e do HGU. O isolamento dos organismos foi realizado por hemocultura, através do sistema automatizado BacT/ALERT 3D (BioMérieux), utilizando-se 1 mL de sangue periférico dos RN, por indicação do médico assistente, como parte da pesquisa para infecção.

As espécies foram identificadas por métodos fenotípicos tradicionais (exame direto, inoculação em CHROMagar Candida, prova do tubo germinativo, microcultivo em lâmina, auxanograma e zimograma) ou através do sistema automatizado VITEK 2 Compact (BioMérieux). Os testes de susceptibilidade in vitro a antifúngicos e a caracterização molecular foram realizados apenas para o complexo *C. parapsilosis*.

7.1. Teste de susceptibilidade in vitro a antifúngicos

O teste de susceptibilidade in vitro a antifúngicos foi realizado, empregando-se o método do Etest (AB bioMérieux, Solna, Sweden), que consiste de um gradiente estável contendo 15 concentrações do antifúngico em uma fita plástica e é usado para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de agentes antifúngicos.

As amostras de *C. parapsilosis* se encontravam estocadas à -200C no Laboratório de Micologia do HUJM e no Laboratório de Micologia da Faculdade de Medicina da UFMT, foram descongeladas à temperatura ambiente, semeadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Difco, USA) e incubadas à 37oC/24h. Logo após, as amostras foram semeadas em placas de Petri com agar Sabouraud dextrose (Difco, USA) e deixadas a 35oC por 24h. A seguir, as amostras foram novamente repicadas para tubos com ágar Sabouraud dextrose (Difco, USA) inclinado e incubadas a 37oC por 24h. A partir desses tubos, foi retirada uma pequena alíquota da amostra e diluída em solução salina estéril (0,85%) de modo a atingir,

por comparação visual, uma turvação equivalente ao nível 0,5 da escala de Mac Farland (Probac do Brasil). Em seguida, a solução de leveduras foi semeada em placas de Petri com ágar Sabouraud dextrose (Difco), com o auxílio de um swab estéril e 30 minutos depois, as fitas de Etest (bioMérieux) contendo os antifúngicos anfotericina B, voriconazol e caspofungina foram distribuídas de forma equidistante sobre a superfície das placas inoculadas. Após 24h de incubação a 35°C, procedeu-se à leitura e interpretação dos resultados. A CIM dos antifúngicos corresponde ao ponto de intersecção entre a fita e a elipse de inibição do crescimento do micro-organismo.

7.2. Caracterização Molecular

A caracterização molecular dos isolados de *C.parapsilosis* foi realizada em duplicata, através da técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR), seguida do sequenciamento dos produtos gerados na PCR.

7.3. Obtenção das amostras

Verificou-se a pureza de um cultivo de 48 h a 35° C, através da coloração de Gram e a seguir, repicou-se uma alçada da levedura para caldo BHI (Merck, USA). Após crescimento a 35° C por 24 h, transferiu-se 1,5 mL dessa cultura para um tubo de Eppendorf que a seguir foi centrifugado por 5 minutos a 5000 rpm . O sobrenadante foi descartado e o 1,5 mL restante acrescentado ao tubo, sendo recentrifugado por 5 minutos a 5.000 rpm. Em seguida desprezou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de água estéril, homogeneizado em vórtex, centrifugado por 5 minutos a 500 rpm. Na sequência, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* deixado à temperatura ambiente até secar completamente.

7.4. Extração do DNA

Em um tubo de Eppendorf contendo o pellet obtido no passo anterior, adicionou-se 500 µL de tampão de lise (Tris 50 mM, NaCl 250 mM, EDTA 50 mM,

SDS 0,3% (p/v, pH 8) e uma pequena quantidade de pérolas de vidro (~ 0,5g, Sigma Aldrich). Na sequência, o Eppendorf foi tampado, vortexado por 5 minutos e deixado a 100o C em termo shaker (Bionet) durante 5 minutos. Após esfriar a temperatura ambiente, o tubo foi centrifugado a 12000 rpm, por 5 minutos. A seguir, 400 µL do sobrenadante foram transferidos para um tubo de Eppendorf novo, contendo 200 µL de fenol e 200 µL clorofórmio e centrifugado a 12000 rpm, por 5 minutos. Em seguida, coletou-se o sobrenadante em um Eppendorf de 1,5 mL e adicionou-se 35 µL de acetato de sódio (Sigma Aldrich) e 400µL de isopropanol (Merck) gelado. Esse tubo foi deixado no freezer (- 20 o C) por 2 horas e em seguida, centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos. O pellet foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol (Merck) a 70%, gelado e o sobrenadante desprezado. O tubo foi deixado na estufa para a secagem do DNA. Depois de totalmente seco, o DNA foi ressuspendido em 50 µL de água de Milli-Q e armazenado no freezer (- 20 o C) até o momento de usar.

7.5. Reação da PCR

A PCR foi realizada de acordo com o protocolo de Lau et al (2007), doi:10.1128/JCM.01862-06. A reação de amplificação da região ITS do DNA ribossomal foi feita em termociclador Proflex, Life Technologies, em um volume final de 25 µL contendo: 2,5 µL de tampão de PCR 10X (Tris-HCl (10 mM) [pH 8,3], 1,5 µL de MgCl (50mM) (Difco) 5 µL de DNTP (1mM) (Roche Diagnostics), 0,25 µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) (Promega), 10 µL de DNA e água qsp. 1µM de cada primer ITS1 (20 µM) (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) e ITS2 (20 µM) (5'- GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC) (White et al, 1990) (Invitrogen) e água de Milli-Q, qsp

Os fragmentos amplificados pela PCR foram submetidos à corrida eletroforética (aparelho da Life Technologies) em gel de agarose (Sigma-Aldrich) a 1,5%.

7.6. Sequenciamento do DNA

Os produtos gerados na PCR foram purificados pelo Illustra GFX Kit (GE Healthcare) e submetidas ao sequenciamento, utilizando-se os primers ITS1 e ITS2, no sequenciador ABI 3500 (Applied Biosystem). As sequências de nucleotídeos obtidas foram analisadas através do software Blastn (www.ncbi.nlm.nih.gov).

8 RESULTADOS

No período de 2006 a 2012, foram internados 3247 recém-nascidos nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital Universitário Júlio Muller (n=888 recém-nascidos) e Hospital Geral Universitário (n=2359 recém-nascidos).

No total pode-se observar 54 casos de candidemia, com uma prevalência geral de 1,66% IC 95% [1,25% ; 2,16%]. O Gráfico 1 apresenta a distribuição das espécies de *Candida* observadas nos recém-nascidos que tiveram infecção fúngica comprovada em hemocultura.

As espécies causadoras e o número total de casos de candidemia foram: *C. parapsilosis* lato sensu (25), *C. albicans* (16), *C. tropicalis* (7), *C. glabrata* (4) e *C. guilliermondii* (2).

Gráfico 1 - distribuição das espécies de *Candida* observadas nos recém-nascidos que tiveram infecção fúngica comprovada em hemocultura.

A partir deste momento abordaremos apenas o complexo *C. parapsilosis* que é o objetivo deste estudo.

Gráfico 2 - Distribuição da prevalência de C.parapsilosis de acordo com hospital e ano avaliado.

Apesar da variação observada nos valores de prevalência de C. parapsilosis ao longo dos anos, no HUJM não foi observada diferença estatisticamente significativa dessa variação ($p=0,802$), ao passo que no HGU essa variação da prevalência de C. parapsilosis ao longo dos anos foi significativa ($p=0,043$): os anos 2009 e 2010 foram anos com maior prevalência de C. parapsilosis neste hospital.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa na prevalência de C. parapsilosis entre os dois hospitais, em cada um dos anos, uma vez que os valores dos níveis descritivos observados para essas comparações variou de $p=0,070$ a $p>0,999$. Dessa forma, o total observado de Candida parapsilosis foi igual a 25 entre 3247 recém-nascidos atendidos no período de 2006 a 2012; ou seja, a prevalência de C. parapsilosis no período avaliado pode ser estimada em 0,77% (IC 95% [0,50% ; 1,14%]).

8.1. Dados Obstétricos e Maternos

A idade materna dos casos diagnosticados como C. parapsilosis variou de 13 a 37 anos, apresentando mediana igual a 23,5 anos; ou seja, 50% das mães apresentavam idade de 13 a 23,5 anos (ou 50% das mães apresentavam idade de 23,5 anos a 37 anos). Classificando-se como “adolescente” mães com idade menor ou igual a 19 anos, verificou-se que entre estes casos a prevalência de C. parapsilosis foi de 35% ($p=0,180$).

Tabela 1 – Distribuição da indicação de cesárea.

Hospital	ID	Indicação cesárea
HGU	002	sem informação
HGU	005	sem informação
HGU	006	sem informação
HGU	007	sem informação
HGU	008	DPP
HGU	019	sem informação
HGU	024	sem informação
HGU	027	sem informação
HUJM	005	DM tipo I
HUJM	006	DHEG, síndrome HELLP
HUJM	010	prematuridade, e amniorrexia prematura
HUJM	011	urgência, menor em convulsão
HUJM	014	amniorrexia prematura
HUJM	016	DM, deslocamento prematuro de placenta
HUJM	019	ruptura prematura de membranas
HUJM	022	sofrimento fetal, DHEG grave, DM

8.2. Dados Neonatais

Em relação à distribuição da prevalência de C. parapsilosis entre recém-nascidos pré-termo (RNPT) e recém-nascidos de termo (RNT) em cada um dos anos avaliados, foi observado que, nos anos de 2006 e 2007 não houve nenhum

caso de *C. parapsilosis* entre RNT. No decorrer dos outros anos observa-se que há uma porcentagem maior de RNPT quando comparado aos RNT, entretanto sem significância estatística ($p=0,726$ a $p=0,894$), como pode ser observado no Gráfico 3.

Gráfico 3 - Distribuição da prevalência de *C. parapsilosis* entre RNPT e RNT de acordo com ano de avaliação

Com relação ao gênero, observou-se uma maior predominância do sexo masculino (52%), Gráfico 4, entretanto mais uma vez verificou-se que a *C. parapsilosis* ocorreu na mesma proporção entre os dois gêneros ($p=0,841$).

Gráfico 4 – Prevalência de *C. parapsilosis* de acordo com o gênero.

Já a idade gestacional desses recém-nascidos variou de 23 semanas e 3 dias a 40 semanas com uma mediana de 32 semanas e 4 dias.

O peso ao nascer variou de 635g a 4095g com mediana igual a 1500g; ao classificar o peso em baixo peso (RNBP) aqueles que, ao nascimento, apresentaram peso menor do que 2500g observa-se que, aproximadamente 76% dos casos avaliados pertenciam ao grupo RNBP; ou seja, houve uma maior porcentagem de *C. parapsilosis* em RNBP ($p=0,009$).

Com relação à idade à internação observou-se que o mais frequente entre os casos de *C. parapsilosis* foi a idade de zero dias, cerca de 84% dos casos avaliados ($p<0,001$ – Gráfico 5). A idade de zero dias foi considerada como o dia do nascimento do RN. Já o tempo de internação variou de 11 a 256 dias apresentando uma mediana de 51 dias.

Gráfico 5 – Idade à Internação dos casos diagnosticados com *C. parapsilosis*

8.3. Dados Clínicos e Laboratoriais

Foi observada presença de Febre, isto é, temperatura maior ou igual a 38°C, em aproximadamente 71% das crianças diagnosticadas com *C. parapsilosis* (Gráfico 6). Houve uma maior porcentagem de febre maior ou igual a 38°C entre crianças diagnosticadas com *C. parapsilosis* ($p=0,041$).

Gráfico 6 – Distribuição de Febre entre os casos diagnosticados com *C. parapsilosis*

Hipotermia foi observada em 22 crianças diagnosticadas com *C. parapsilosis*, ou seja, aproximadamente 92% dos casos apresentou hipotermia, sendo este resultado estatisticamente significativo ($p < 0,001$ – Gráfico 7).

Distensão abdominal foi diagnosticada em 16 de 24 casos, ou seja, 66,7% das crianças diagnosticadas com *C. parapsilosis*. Distensão abdominal não foi estatisticamente significativa entre crianças diagnosticadas com *C. parapsilosis* ($p = 0,102$).

Gráfico 7 – Distribuição de Hipotermia entre os casos diagnosticados com *C. parapsilosis*

Plaquetopenia foi diagnosticada em 21 das 22 crianças avaliadas, ou seja, 95,5% dos casos de *C. parapsilosis* apresentaram plaquetopenia. A distribuição de plaquetopenia foi estatisticamente significativa entre as crianças diagnosticadas com *C. parapsilosis* ($p < 0,001$).

Gráfico 8 – Distribuição de Plaquetopenia entre os casos diagnosticados com *C. parapsilosis*

Gráfico 9 - Evolução dos casos diagnosticados com *C. parapsilosis*

8.4. Teste *in vitro* de susceptibilidade a antifúngicos

Todos os isolados do complexo *C. parapsilosis* apresentaram susceptibilidade aos antifúngicos anfotericina B, voriconazol e caspofungina, frente ao método do Etest.

Tabela 2 – Distribuição dos isolados do complexo *C. parapsilosis* lato sensu, quanto às CIMs de anfotericina B, voriconazol e caspofungina, consideradas através do método do Etest.

Antifúngicos/CIMs em µg/mL

Isolado	Anfotericina B	Caspofungina	Voriconazol
1	0,19	1,0	0,19
2	0,75	1,0	0,047
3	0,19	1,0	0,125
4	0,50	1,0	0,19
5	0,75	0,75	0,064
6	0,50	1,0	0,125
7	0,19	0,50	0,19
8	0,50	0,75	0,094
9	0,25	1,5	0,50

Pontos de corte de acordo com o CLSI:

Anfotericina B	CIM ≤ 1 sensível
Caspofungina	CIM ≤ 2 sensível
Voriconazol	CIM ≤ 1 sensível; CIM = 2 SDD; CIM ≥ 4 resistente SDD = susceptibilidade dose dependente

Nota: ainda não foi estabelecido um ponto de corte para anfotericina B, porém, conforme texto no CLSI M27-A3, isolado de *Candida* com CIM ≤ 1 µg/mL pode ser considerado como susceptível.

Figura 1: Teste de susceptibilidade a antifúngicos, através do Etest

8.5. Análise molecular

8.5.1. Método da PCR

A análise genotípica através da técnica da PCR confirmou a identificação fenotípica prévia das nove amostras de leveduras como *C. parapsilosis* sensu lato. No entanto, esse método foi incapaz de discriminar as espécies do complexo *C. parapsilosis* entre as amostras analisadas. Todos os fragmentos gerados pela PCR formaram bandas idênticas no gel de agarose, contendo aproximadamente 450 pares de base, cada não permitindo, portanto, a identificação genotípica das amostras, ao nível de espécie.

8.5.2. Sequenciamento dos fragmentos de DNA amplificados pela PCR

O sequenciamento dos fragmentos de DNA gerados pela PCR possibilitou a identificação de sete amostras de *C. parapsilosis* (sensu stricto) e uma amostra

Resultados

de *C. orthopsilosis*. O sequenciamento de uma das amostras não deu certo e, por este motivo, essa amostra foi considerada como *C. parapsilosis* (sensu lato). A identificação de isolados é mostrada a seguir:

Tabela 3 – Identificação de isolados

Isolado	Blast	BP	Idend(%)
2	KC462059.1 <i>Candida parapsilosis</i> strain BKR1	192	100
5637	KC462059.1 <i>Candida parapsilosis</i> strain BKR1	191	99
50	KC462059.1 <i>Candida parapsilosis</i> strain BKR1	192	100
159 /659	KC422431.1 <i>Candida parapsilosis</i> strain Hb44	189	99
7413	KC462059.1 <i>Candida parapsilosis</i> strain BKR1	192	100
7440	KC462059.1 <i>Candida parapsilosis</i> strain BKR1	192	100
7580	FJ809941.1 <i>Candida parapsilosis</i> strain EN22	195	99
9325	KF385994.1 <i>Candida orthopsilosis</i> isolate 19	136	100

As sequências obtidas foram submetidas para depósito no Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Os números de acesso do GenBank para as sequências de nucleotídeo são mostrados a seguir:

Tabela 4 – Números de acesso do GenBank para as sequências de nucleotídeo

BankIt1729359	Seq1	KJ880923
BankIt1729359	Seq2	KJ880924
BankIt1729359	Seq3	KJ880925
BankIt1729359	Seq4	KJ880926
BankIt1729359	Seq5	KJ880927
BankIt1729359	Seq6	KJ880928
BankIt1729359	Seq7	KJ880929
BankIt1729359	Seq8	KJ880930

9 *DISCUSSÃO*

A distribuição das espécies de *Candida* é muito heterogênea nas UTIN de diferentes regiões geográficas. Embora *Candida albicans* continue sendo a espécie mais isolada das candidíases invasivas em recém-nascido (RN), a recuperação de espécies não-*albicans* em hemocultivo vem aumentando significativamente nas UTIN, sobretudo nos últimos trinta anos, ocasionando mudanças importantes no panorama epidemiológico da candidemia (Fidel, 1999). Na América do Norte e Europa, *C. glabrata* tem sido o segundo agente mais isolado em hemocultura, enquanto a recuperação de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* são mais frequentes na América Latina e Ásia e *C. krusei* é mais comum na Europa (Pfaller et al., 2011). Entre as espécies consideradas emergentes, *C. parapsilosis* tem se sobressaído como um patógeno importante nas infecções relacionadas com cuidados de saúde, particularmente em UTIN. Weems (1992) analisou 11 estudos diferentes, publicados entre 1962 e 1986 e encontrou uma variação de 3% e 27% na prevalência de *C. parapsilosis* em episódios de candidemia. A partir dos anos 1990, *C. parapsilosis* cresceu exponencialmente e, na atualidade, várias publicações descrevem *C. parapsilosis* como o segundo ou terceiro agente de candidemia mais prevalente em UTIN (Makhoul et al., 2001, Sastre et al., 2003, Pedroso et al., 2008, Andrews et al., 2013). Um estudo norte-americano, que incluiu 128 UTIN, registrou 130.523 internações e 1.997 casos de candidemia, no período de 1995 a 2004, sendo 73,7% dos casos em RN com muitíssimo baixo peso ao nascer (< 1.000g). *C. albicans* foi a espécie mais isolada (57,9%) e *C. parapsilosis* (33,7%) foi a segunda (Fridkin et al., 2006). Por outro lado, *C. parapsilosis* tem sido o agente mais isolado em algumas UTIN. Kossof et al., em 1998, encontraram 60% de *C. parapsilosis* entre 1991 a 1995, em uma UTIN dos EUA. Na Índia, a *C. parapsilosis* infectou 25% dos 132 RN, em uma UTIN, em 2012 (Juyal et al., 2013). Na Turquia a frequência do organismo foi de 57,1% entre 2000 e 2007 (Celebi et al., 2012). Na Espanha, Rodriguez et al., em 2006 relataram o encontro de 67% (n=24) de RN infectados com *C. parapsilosis* entre 2002 e 2003. No presente estudo, 54 RN tiveram candidemia, no período de 2006 e 2012. *C. parapsilosis* foi a espécie mais prevalente (46,3%), seguido por

C. albicans (29,6%), *C. tropicalis* (13,0%), *C. glabrata* (7,4%) e *C. guilliermondii* (3,7%). A prevalência geral foi de 1,66% IC 95% [1,25% ; 2,16%] e a de *C. parapsilosis* (lato senso) 0,77% (IC 95% [0,50% ; 1,14%]). Nós identificamos *C. orthopsilosis* causando infecção em RN pela primeira na cidade de Cuiabá. A frequência de *C. orthopsilosis*, em nosso estudo foi de 11,1% do total de isolados do complexo *C. parapsilosis*. Esse valor é semelhante ao percentual de 10,9% dos isolados de *C. orthopsilosis* na América Latina (Luckhart et al, 2008). Há poucos dados na literatura sobre a epidemiologia de *C. orthopsilosis*. Em nossa casuística não foi identificada amostra de *C. metapsilosis*. Estudos de prevalência mostraram que a prevalência de *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* varia conforme o país de 2,3% a 9% e de 0,9% a 6,9%, respectivamente (Garcia-Effron et al 2012). Apesar de não termos identificado *C. metapsilosis*, não podemos excluir a possibilidade de sua ocorrência nas UTIN estudadas, uma vez que o número de amostras analisadas foi muito pequeno. O encontro de *C. parapsilosis* em nossa casuística foi bem superior ao citado no trabalho de Weens (1992) (46,3 vs 3 a 27%, respectivamente) e bem inferior ao registrado por Levy (46,3% vs 68%, respectivamente). Essas discrepâncias entre os valores de prevalência aparecem porque a epidemiologia tem limitações. A grande diversidade de procedimentos e de vigilância dificulta a comparação entre os diferentes estudos (Toubas, 2013). Na América Latina, são encontrados muito poucos estudos sobre candidemia voltados somente para RN. No Brasil, a maioria dos dados disponíveis para a faixa etária neonatal foram realizados em São Paulo. Miranda et al (2013) identificaram um surto de candidemia por *C. parapsilosis* na UTIN do Hospital da Clínicas de SP, ocorrido entre 2002 a 2004. Nesse mesmo estudo, os autores identificaram 36 isolados de *C. parapsilosis*, no período de 2002 a 2008.

A espécie *C. orthopsilosis* foi identificada, pela primeira na cidade de Cuiabá, como agente de candidemia em UTIN, com uma frequência de 11,1% do total de isolados do complexo *C. parapsilosis*.

A incidência de infecções hospitalares varia de acordo com as características de cada Unidade, e nas Unidades Neonatais, estas infecções dependem muito além do próprio RN, da infraestrutura e dos recursos humanos que na maioria dos hospitais conveniados com o Sistema Único de Saúde não são adequados. (Adams-Chapman e Stoll, 2002). Apesar de o HGU apresentar

52% do total de casos de *Candida parapsilosis* avaliados não foi observada diferença significativa na distribuição de casos entre HGU e HUJM ($p=0,841$).

De acordo com a Figura 2 pode-se observar que no HUJM parecia estar ocorrendo um decréscimo na porcentagem de casos, porém em 2009 ocorreu um acréscimo na porcentagem de casos e, a partir de 2010, nesse hospital, elas voltaram a diminuir no decorrer dos anos. Não foi observada diferença significativa na distribuição de casos de *Candida parapsilosis* avaliados ao longo dos anos entre os dois hospitais (Generalização do Teste Exato de Fisher – $p = 0,681$).

Em relação aos dados maternos a idade materna é considerada inversamente proporcional ao nascimento de bebês prematuros. Em nosso estudo, a idade materna variou de 13 a 37 anos, com mediana de 23,5 anos. Classificando-se como “adolescente” as mães com idade menor ou igual à 19 anos, verificou-se que entre estes casos a prevalência de *C. parapsilosis* foi de 35% ($p=0,180$). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a gravidez na adolescência é considerada de alto risco para a saúde da mãe e do RN, incluindo a prematuridade e baixo peso. No entanto, em nosso estudo esse resultado não foi significativo. Quanto ao acompanhamento pré-natal, das 25 mães de RN infectados com *C. parapsilosis*, obteve-se informação de 20 delas. Desse total, 17 (85%) realizaram acompanhamento médico pré-natal, sendo que 11 delas compareceram a seis ou mais consultas, o que vai ao encontro da recomendação da OMS. Ou seja, em cerca de 64,7% dos casos pode-se dizer que o pré-natal foi adequado. Não houve uma maior porcentagem de pré-natal adequado quando comparado à porcentagem de pré-natal não adequado ($p=0,225$). O tipo de parto, entre eles a cesárea também é relacionada com predisposição a infecções fúngica. No presente estudo, 67% dos casos diagnosticados como *C. parapsilosis* nasceram através de parto cesárea (Quadro 2). Entretanto, não se pode afirmar que houve uma maior porcentagem de cesáreas entre esses casos quando comparado à porcentagem de partos normais ($p=0,102$). O escore de Apgar é um teste proposto para ser feito no primeiro e quinto (às vezes também no décimo) minutos, a fim de avaliar as condições de nascimento da criança. O escore de Apgar é inversamente proporcional à susceptibilidade à infecção fúngica em alguns estudos. Em nosso estudo, todos

os RN pontuaram de 7 a 10 no 5º minuto, no escore de Apgar. Portanto, essa medida não influenciou a ocorrência de candidemia em nossa casuística e em várias outras, uma vez que se esta infecção foi adquirida mais tardiamente entre a segunda e terceira semana de vida, os RN costumam nascer bem, ou seja, com Boletim de Apgar normal. A não ser que esta candidemia seja de aquisição vertical.

A candidemia nos hospitais e principalmente nas UTI neonatais é muito preocupante, devido à alta probabilidade de evolução para sepse fúngica tardia, aumentando o risco de mortalidade e comprometimento do desenvolvimento neurológico dos que sobrevivem (Benjamin et al, 2006). O sistema imune imaturo dos RN e os cuidados agressivos necessários facilitam tal transição (Benjamin et al, 2010; Huang et al, 2004; Juyal 2013, Ceccon. Smith et al, 2005). A apresentação clínica da candidemia é semelhante à síndrome da sepse, sendo difícil estabelecer um diagnóstico diferencial entre as duas patologias (Juyal et al, 2013). Os mais vulneráveis à sepse são os RN prematuros e os de muito baixo peso ao nascer, que ficam em alto risco de adquirir infecções fúngicas, mormente nas primeiras semanas de vida, quando costuma ser realizada a maioria das terapias invasivas (Kaufman, 2010, Smith et al, 2005b). Em nossa casuística, 76% dos RN eram prematuros. Esses percentuais concordam com a maioria dos estudos que mostram altos percentuais de RN prematuros são os mais afetados. Quanto ao peso de nascimento, a infecção sanguínea por *C. parapsilosis* é mais frequente entre os RN com muito baixo peso (< 1.500g) e os de muitíssimo baixo peso (< 1.000g) ao nascer. Em nosso estudo, infecção sanguínea com *C. parapsilosis* (lato senso) predominou entre os RN com peso de nascimento menor que 2.500g (76,0%), com a mediana do peso de nascimento igual a 1.500g, limite mínimo da faixa de baixo peso. No entanto, acreditamos que, se o tamanho da amostra fosse maior, provavelmente a infecção seria mais frequente entre os RN com muito baixo peso. O baixo peso ao nascer e o muito baixo peso podem estar relacionados com a prematuridade ou com o crescimento intrauterino restrito e são condições que predispõem os recém-nascidos (RN) a infecções perinatais e neonatais (Almirante et al, 2006). A idade gestacional é mais estreitamente relacionada com a infecção do que o peso de nascimento. (Manzoni et al, 2012; Benjamin et al, 2003; Kaufman e Fairchild, 2004, Mussi-Pinhata e Rego, 2005).

No presente estudo, a mediana da idade gestacional foi de 32 semanas e 4 dias. Ao contrário da maioria dos achados, que referem uma frequência maior de candidemia entre os RN com idade gestacional < 32 semanas (Saiman et al, 2000). *C. parapsilosis* representa um complexo de três grupos geneticamente distintos (grupo I, II e III). Em 2005, Tavanti et al propuseram uma nova classificação, com base em estudos genéticos mais aprofundados, que justificava a sua reclassificação em 3 espécies diferentes.

C. parapsilosis (sensu stricto), *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*. Pouco se conhece acerca dessas espécies em relação ao recém-nascido, uma vez que a identificação fenotípica não discrimina as três espécies. No entanto, na prática clínica, observa-se que os RN, que se infectam com esta espécie de *Candida* apresenta evolução mais complicada, principalmente em relação à sensibilidade aos antifúngicos (Sixiang, et al, 2011). Embora *C. parapsilosis* seja reconhecida como susceptível a antifúngicos de uso clínico, tem sido identificadas cepas resistentes a essas drogas, especialmente aos azólicos.

Presume-se que algumas das características biológicas apresentadas por *C. parapsilosis* estejam relacionados com sua virulência. Esse organismo é capaz de formar biofilme em dispositivos médicos implantados, produzir *slime*, aderir a dispositivos intravasculares, crescer em soluções com altas concentrações de glicose e lipídeos, produzir enzimas extracelulares e a expressar o fenótipo *switching*. Tais atributos são considerados fatores de risco, que podem ter colaborado para o aumento da frequência de infecções provocadas por esse micro-organismo (Trofa, 2008). Ao contrário de *C. albicans* e *C. tropicalis* para as quais a doença invasiva é geralmente precedida por colonização e tem transmissão vertical, *C. parapsilosis* prescinde de colonização prévia para causar doença invasiva e a sua transmissão geralmente é horizontal, através de fontes externas contaminadas, como fluidos ou dispositivos médicos, dispositivo prostético, catéteres e mãos de trabalhadores da saúde (Trofa, 2008).

No presente trabalho, os achados clínicos foram semelhantes aos relatados na sepse fúngica na literatura e os principais foram febre, hipotermia e plaquetopenia que estiveram presentes em mais de 90% dos pacientes. Os aspectos clínicos, laboratoriais e demográficos do RN infectado com *C. orthopsilosis* foram indistinguíveis daqueles encontrados nos RN infectados com

C. parapsilosis (*senso stricto*). O progresso tecnológico alcançado pela medicina, marcadamente nas duas últimas décadas do século XX, tem aumentado a qualidade de vida e a longevidade de RN com prematuridade. Todavia, os cuidados intensivos padrões da atualidade, envolvem procedimentos invasivos que elevam os riscos de infecções neonatais. Em nosso estudo, os fatores de risco mais frequentes foram o uso prévio de antibióticos (100%), uso de CVC foi observado em 23 das 24 crianças avaliadas, ou seja, 95,8% dos casos de *C. parapsilosis* utilizavam cateter venoso central (CVC), ou seja, houve uma maior porcentagem de casos de *C. parapsilosis* que utilizavam CVC quando comparado com a distribuição de casos de *C. parapsilosis* que não utilizavam CVC ($p < 0,001$). O crescimento desta *Candida* nos cateteres deve estar relacionado com a produção de slime como citado acima. Outros fatores não menos importantes e cuja presença foi superior a 70% foram a presença de prematuridade em 74,8%, e uso de bloqueadores H2 em 78,9%.

Nutrição parenteral foi observada em 22 das 23 crianças avaliadas, ou seja, 95,7% dos casos de *C. parapsilosis* utilizavam nutrição parenteral, ou seja, houve uma maior porcentagem de casos de *C. parapsilosis* naqueles pacientes que utilizavam nutrição parenteral quando comparado com a distribuição de casos de *C. parapsilosis* e que não utilizava este tipo de nutrição ($p < 0,001$).

Ventilação mecânica foi observada em 20 das 21 crianças avaliadas, ou seja, 95,2% dos casos de *C. parapsilosis* utilizavam ventilação mecânica, ou seja, houve uma maior porcentagem de casos de *C. parapsilosis* que utilizavam ventilação mecânica quando comparado com a distribuição de casos de *C. parapsilosis* que não utilizavam ($p < 0,001$).

A *C. parapsilosis* é considerada relativamente menos virulenta que *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (Weems, 1992), embora, sob certas condições (como uso de cateter, altas concentrações de glicose) a virulência de *C. parapsilosis* possa aumentar muito, dificultando a sua erradicação. A taxa de mortalidade relacionada com candidemia neonatal por *C. parapsilosis* é considerada baixa, em comparação com *C. albicans* (Horn, 1992). Entre os RN prematuros, a mortalidade pode chegar a 30% (Benjamin et al, 2006). Outros autores relatam taxas de mortalidade variadas entre si, podendo ser baixas, como 10 % (Fridkin et al, 2006). Miranda et al (2012) relataram 45% de mortalidade

entre os RN com candidemia por *C.parapsilosis* entre 2002 a 2008, em uma UTIN de São Paulo.

Em nosso estudo, a taxa de mortalidade relacionada com *C. parapsilosis* foi de 24%, entre os 25 RN. Embora não faça parte dos objetivos do presente estudo, pudemos observar que, entre os RN infectados com *C. albicans*, a taxa de mortalidade ultrapassou de 40%. Entre os RN pré-termos, a taxa de mortalidade é inversamente proporcional ao peso de nascimento.

Os RN que evoluíram para óbito na nossa pesquisa, apresentavam condições de base desfavoráveis. Quatro RN eram prematuros, com muitíssimo baixo peso (635g a 960g), um RN de muito baixo peso (1.260g), com malformação fetal, rim multicístico e cardiopatia. O único RN de termo, nascido com 3.010g de peso, era portador de malformação genética do aparelho digestivo e fusão dos arcos costais. Em tais condições, é difícil distinguir entre a mortalidade atribuída e mortalidade associada com candidemia neonatal, uma vez que essas crianças frequentemente apresentam outras patologias sobrepostas, como doença respiratória, intracraniana, gastrointestinal, e infecciosas, todas altamente associadas com mortalidade (Fridkin et al, 2006).

Susceptibilidade a antifúngicos

O *Etest* é um método para avaliar a susceptibilidade *in vitro* a antifúngicos, com eficácia comparável ao M27-A do NCCLS (Pfaller, 2010). Todos os isolados de *C.parapsilosis* lato sensu apresentaram sensibilidade *in vitro* aos três antifúngicos testados, em concordância com A CIM variou de 0,19 - 0,75 µg/mL para anfotericina B; 0,50 – 1 µg/mL para caspofungina e 0,064 – 0,30 µg/mL para voriconazol.

Esses resultados estão de acordo com os achados de Moris et al (2012) que mostram o predomínio de isolados de *C. parapsilosis* susceptíveis à maioria dos antifúngicos de uso clínico.

Apesar do pequeno número de isolados testados, esse achado poderá contribuir na escolha do tratamento empírico ou da candidemia neonatal.

Análise molecular

O sequenciamento de fragmentos de r-DNA gerados pela PCR é uma ferramenta que vem sendo utilizado com sucesso para a identificação de espécies de *Candida*.

Em nosso trabalho, o sequenciamento da região ITS1, possibilitou a primeira identificação de *C. orthopsilosis* em UTIN de Cuiabá e, provavelmente, do Estado de Mato Grosso.

10 CONCLUSÕES

Os estudos em relação às infecções fúngicas nas Unidades Intensivas Neonatais são de grande importância pois mostram:

A) Prevalência (a prevalência geral de infecção por fungo nesta casuística foi de 1,66% IC 95% [1,25% ; 2,16%] e a de *C. parapsilosis* (lato sensu) 0,77% (IC 95% [0,50% ; 1,14%]), superiores aos descritos na literatura;

B) Do complexo *C. parapsilosis* foi identificada a *C. orthopsilosis*, isolada pela primeira vez na cidade do Cuiabá em um RN como agente etiológico de infecção, utilizando a técnica de reação da polimerase em cadeia. (PCR);

C) As manifestações clínicas presentes nos RN com *C. parapsilosis* em mais de 95% em ordem de frequência foram hipertermia, hipotermia e plaquetopenia, semelhante às da infecção por *C. albicans*; Nos pacientes com *C. parapsilosis* foi estatisticamente significante o uso de cateter venoso central ($p < 0,001$), nutrição parenteral ($p < 0,001$) e ventilação mecânica ($p < 0,001$);

D) O desfecho dos pacientes para alta ou óbito foi: alta 86% e óbito 24%.

E) Todos os isolados de *C. parapsilosis sensu lato* apresentaram sensibilidade in vitro aos três antifúngicos testados (anfotericina B, micafungina, voriconazol).

Limitação do estudo:

A maior limitação para a execução desse estudo foi o pequeno número de amostras de *Candida* viáveis recuperadas das micotecas, seguida pela falta de registro de alguns dados nos prontuários, principalmente dos pacientes que foram transferidos de outras instituições de saúde para um dos dois hospitais incluídos no estudo.

11 REFERÊNCIAS

Almirante BR, Rodriguez D, Cuenca-Estrella M, Sanchez F, Ayats J, Alonso-Torres C, Tudella JR, Pahissa A. Epidemiology, Risk Factors, and Prognosis of *Candida parapsilosis* Bloodstream Infections: Case-Control Population-Based Surveillance Study of Patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J. CLIN. MICROBIOL.* 2006; 44:1681–1685

Andrews MG, Patel R, Miller J. Treatment of Invasive Candida Infections in the Neonatal Intensive Care Unit. *Curr Fungal Infect Rep.* 2013;7:96-109.

Apgar V. A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. *Curr Res Anesth Analg* 1953;32:260–7.

Araújo de MRE. Hemocultura: recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados. *J Infect Control.* 2012;1:08-19

Ascher SB, Smith PB, Watt K, Benjamin DK, Cohen-Wolkowicz M, Clark RH, Benjamin DK Jr, Moran C. Antifungal therapy and outcomes in infants with invasive Candida infections. *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31:439-43.

Ashford B. Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. *Am J Trop Med Hyg.* 1928;8:507-38.

Banderhorts, L., P. L. Botha, and M. N. Janse Van Rensburg. 1991. The incidence of hospital fungal infections - yeast fungemia. *S Afr Med J* 79: 302-3.

Baer LS, Pappas PG. Hematogenously disseminated fungal infections in Anaissie EJ, Mc Ginnes MR, Pfaller MA. *Clinical Mycology.* 2009. Cap. 29 p.609

Banerjee SH, Emori TG, Culver DH, Gaynes RP, Jarvis WR, Horan T, Edwards JR, Tolson J, Henderson T, Maston WJ, National Nosocomial Infections

Surveillance System. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. *Am. J. Med.* 1991; 91 (Suppl. 3B): 86S-89S.

Barnett JA. A history of research on yeasts 12: medical yeasts part 1, *Candida albicans*. *Yeast* 2008; 25: 385–417.

Beck-Sagué C, Jarvis WR and National Nosocomial Infections Surveillance System. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. *J Infect Dis.* 1993; 167: 1247-1251.

Benjamin DK Clinical Jr, Stoll BJ, Gantz MG, Walsh MC, Sánchez PJ, Das A, Shankaran S, Higgins RD, Auten KJ, Miller NA, Walsh TJ, Laptook AR, Carlo WA, Kennedy KA, Finer NN, Duara S, Schibler K, Chapman RL, Van Meurs KP, Frantz ID 3rd, Phelps DL, Poindexter BB, Bell EF, O'Shea TM, Watterberg KL, Goldberg RN; Eunice KennedyShriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Neonatal candidiasis: epidemiology, risk factors, and clinical judgment. *Pediatrics.* 2010;126:e865-73.

Benjamin DK Jr, Stoll BJ, Fanaroff AA, McDonald SA, Oh W, Higgins RD, 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.* 2006;117:84-92.

Bone RC. Let's agree on terminology: Definitions of sepsis. *Crit Care Med.* 1991;19:973-977.

Bowman PI, Ahearn DG. Evaluation of the Uni-Yeast-Tek kit for the identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol.* 1975;2:354-8.

- Brandt ME, Lockhart SR, Warnock DW. Laboratory Aspects of Medical Mycology. In: Kauffman, CA, Pappas PG, Sobel JD; Dismukes WE. *Essentials of clinical mycology*. 2nd ed. New York: Springer; 2011. p.3-27.
- Calderone RA. *Candida and Candidiasis*. ASM Press. 2002;1-5
- Cantón E, Viudes A, Pemán J. Infección sistémica nosocomial por levaduras. *Rev Iberoam Micol*. 2001;18:51-5.
- Celebi S, Hacimustafaoglu M, Koksall N, Ozkan H, Cetinkaya M, Ener B. Neonatal candidiasis: results of an 8 year study. *Pediatr Int*. 2012;54:341-9.
- Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36:599-607.
- Cooper CRJr. Yeasts Pathogenic Study. *The Yeast a Taxonomic Study*. 5a ed. San Diego: Elsevier; 2011. P.9-20. Yeast Pathogenic to Humans
- Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb SA, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R; Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including the Pediatric Subgroup. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med* 2013;41::580-637
- Dornbusch H J, Manzoni P, Roilides E, Walsh TJ, Groll A H. Invasive Fungal Infections in Children. *Pediatr Infect Dis J*. 2009; 28(8):734-737.
- Dunn PM. Dr Nils Rosen (1706-1773): the father of paediatrics in Sweden. *Arch Dis Child*. 1991;66:1171-2.

Edwards JE Jr. Invasive candida infections-evolution of a fungal pathogen. *N Engl J Med*. 1991;324:1060-2

Feja KN, Wu F, Roberts K, Loughrey M, Nesin M, Larson E, Della-Latta P, Haas J, Cimiotti J, Saiman L. Risk factors for candidemia in critically ill infants: a matched case-control study. *J Pediatr*. 2005;147:156-61.

Fidel PL Jr, Vazquez JA; Sobel, JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C albicans*. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12, 80–96.

Forrest GN, Weekes E, Johnson JK. Increasing incidence of *Candida parapsilosis* candidemia with caspofungin usage. *J Infect*. 2008;56:126-9.

Fraser VJ, Jones M, Dunkel J, Storfer S, Medoff G, Dunagan WC. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. *Clin Infect Dis*. 1992;15:414-21.

Fridkin SK, Kaufman D, Edwards JR, Shetty S, Horan T. Changing incidence of *Candida* bloodstream infections among NICU patients in United States: 1995 – 2004. *Pediatrics*. 2006;117:1680-7.

Girmenia CP, Martino F, De Bernadis G, Gentile M, Boccanera M, Monaco G, Antonucci, Cassone A, Rising incidence of *Candida parapsilosis* fungemia in patients with haematologic malignancies: clinical aspects, predisposing factors and differential pathogenicity of the causative strains. *Clin. Infect. Dis*. 1996; **23**:506–514

Godoy P, Tiraboschi IN, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, de Almeida LP, da Matta DA, Colombo AL. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. Bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98:401-5.

Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics International Consensus Conference on Pediatric Sepsis. Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 2005;6 (1): 2-8.

Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8:462-78.

Hippocrates. Of The Epidemics by Hippocrates. Translated by Francis Adams. This web edition published by eBooks@Adelaide.

Huang YC, Li CC, LIN TY, Lien RI, Chou YH, Wu JL, Hsueh C. Association of fungal colonization and invasive disease in very low birth weight infants. *Pediatr Infect Dis J.* 1998;17:819-22.1

Hurley R. Acute Disseminated (Septicaemic). Moniliasis in Adults and Children. *Postgrad. Med. J.* 1964; 40: 644

Horn R, Wong B, Kiehn TE, Asmstrong D. Fungemia in a cancer hospital: changing frequency, earlier onset, and results of therapy. *Rev Infect Dis* 1985; 7:646-55.

Joachim H, Polayes SH. Subacute endocarditis and systemic mycosis (monilia). *JAMA.* 1940;115:205-8.

Juyal D, Sharma M, Pal S, Rathaur VK, Sharma N. Emergence of non-albicans *Candida* species in neonatal candidemia. *N Am J Med Sci.* 2013;5:541-5.

Kaufman, DA. Fungal Infections in Preterm Infants. 2010 <http://emedicine.medscape.com/article/980487-overview#showall> (acesso 23 set 2011).

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico Microbiológico -Texto e Atlas Colorido. 5ª ed. Rio de Janeiro. 2001. Cap 19, p. 998-1077

Kossoff EH, Buescher ES, Karlowicz MG. Candidemia in a neonatal intensive care unit: trends during fifteen years and clinical features of 111 cases. *Pediatr Infect Dis J.* 1998;17:504-8.

Knoke M, Bernhardt H. The first description of an oesophageal candidosis by Bernhard von Langenbeck in 1839. *Mycoses.* 2006;49:283-7.

Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. *The Yeast a Taxonomic Study.* 5a ed. San Diego: Elsevier; 2011. p.3: Definition, Classification and Nomenclature of The Yeast.

Lau A, Chen S, Sorrell T, Carter D, Malik R, Martin P, Halliday C. Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens. *J Clin Microbiol.* 2007;45:380-5.

Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2659-64.

Loureiro STA. *Caracterização de leveduras isoladas das praias de Casa Caiada e Bairro Novo, Olinda - Pernambuco quanto a fatores de patogenicidade.* [Dissertação]. Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco; 2002.

Lynch DP. Oral candidiasis History, classification¹, and clinical presentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994;78:189-93.

Makhoul IR, Kassis I, Smolkin T, Tamir A, Sujov P. Review of 49 Neonates With Acquired Fungal Sepsis: Further Characterization. *Pediatrics.* 2001;107:61-6.

Manzoni P, Stronati M, Jacqz-Aigrain E, Maragliano R, Ruffinazzi G, Rizzollo S, Castagnola E, Farina D. Correct choices for correct treatments: key issues in the management of *Candida* infections in preterm neonates. *Early Human Development*. 2012; 88S2 S98–S100

Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith LP, Ngo-Thi NA, van Vreeswijk T, Stämmeler M, Endtz HP, Bruining HA, Naumann D, Puppels GJ. Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2003;41:324-9.

Miranda Ld, Rodrigues EC, Costa SF, van der Heijden IM, Dantas KC, Lobo RD, Basso M, Varkulja GF, Krebs VL, Gibelli MA, Criado PR, Levin AS. *Candida* parapsilosis candidaemia in a neonatal unit over 7 years: a case series study. *BMJ Open*. 2012;0:e000992.

Moreira MEL. Controvérsias a respeito da sepse fúngica no pré-termo extremo: profilaxia e esquemas terapêuticos. *Jornal de Pediatria*. 2005; 81, Nº1(Supl),

Moris DV, Melhem MSC, Martins MA, Souza LR, Kacew S, Szeszs MW, Carvalho LR, . Carvalho, Pimenta-Rodrigues MV, Berghs HAM, Mendes RP. Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida* parapsilosis complex isolates collected from oral cavities of HIV-infected individuals. *Journal of Medical Microbiology*. 2012; 61:1758–1765

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiologia médica*. 5a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006. p.759-66.

Nieto-Rodriguez JA, Kusne S, Mañez R, Irish W, Linden P, Magnone M, Wing EJ, Fung JJ, Starzl TE. Factors associated with the development of candidemia and candidemia-related death among liver transplant recipients. *Ann Surg*. 1996;223:70-6.

Odds FC. Pathogenesis of Candida infections. *J Am Acad Dermatol.* 1994;31(3Pt 2):S2-5.

Ohkawa M, Tokunaga S. Clinical significance of candiduria: An Update. *Int Urogynecol J.* 1992;3: 238-44.

Organización Mundial de La Salud - Necesidades de salud de los adolescentes. Informe de um Comitê de Expertos de la OMS. Ginebra, OMS: 1977, 55 páginas. Série de Informes Técnicos, 609

Pappas PG. Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North Am.* 2006;20:485-506

Pardi G; Cardozo EI. Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. *Acta Odontol.* 2002 venez. .40:1) Caracas ene

Pedroso CPA, Krebs VLJ. Complications of systemic candidiasis in NICU. *Rev Ciênc Méd Biol.* 2008;7:280-7.

Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Etest Methods with the CLSI Broth Microdilution Method for Echinocandin Susceptibility Testing of *Candida* Species. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 592–1599

Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). *J Clin Microbiol.* 2011;49:396-9.

Pfaller MA. Nosocomial candidiasis emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin Infect Dis.* 1996;22(Suppl 2):89-94.

Rabalais GP, Samiec TD, Bryant KK, Lewis JJ. Invasive candidiasis in infants weighing more than 2500 grams at birth admitted to a neonatal intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J*. 1996;15:348-52.

Rodriguez D, Almirante B, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Sanchez F, Gene A, Xercavins M, Fontanals D, Rodriguez-Tudela JL, Warnock DW, Pahissa A; Barcelona Candidemia Project Study Group. Candidemia in neonatal intensive care units: Barcelona, Spain. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25:224-9.

Sai S, Holland LM, McGee CF, Lynch DB, Butler G. Evolution of mating within the *Candida parapsilosis* species group. *Eukaryot Cell*. 2011;10:578-87

Saiman L; Ludington E; Pfaller M; Rangel-Frausto S; Wiblin T; Dawson J; Blumberg HM; Pttearson JE; Rinaldi M; . Edwards J; Wenzel RP; Jarvis W. Risk factors for candidemia in Neonatal Intensive Care Unit patients. *Pediatr Infect Dis J*. 2000;19:319–24

Sastre JBL, Cotallo GDC, Colomer BF. Neonatal invasive candidiasis: a prospective multicenter study of 118 cases. *Am J Perinatol*. 2003;20:153-63.

Seelig MS. The Role of Antibiotics in the *Pathogenesis of Candida Infections*. *Am J Med*. 1966;40:887-917.

Segal E. General biological characteristics of candida. In: Segal E, Baum GL. *Pathogenic yeasts and yeast infections*. Boca Raton: CRC Press; 1994. p.256.

Siegel S, *Estatística não paramétrica* (para as ciências do comportamento). McGraw-Hill do Brasil Ltda. 1981. P.350

Smith PB, Steinbach WJ, Benjamin DK Jr. Neonatal candidiasis. *Infect Dis Clin North Am*. 2005a;19 603-15.

Smith PB, Steinbach WJ, Benjamin DK Jr. Invasive Candida infections in the neonate. *Drug Resist Updat*. 2005b;8:147-62.

Spellberg, B, and Edwards, J E. The pathophysiology and treatment of *Candida* sepsis. *Curr Infect Dis Rep*. 2002; 4:387–99.

Sunil A, Kurien J, Mukunda A, Basheer AB. Common Superficial Tongue Lesions. *Indian Journal of Clinical Practice*. 2013;23:534-42.

Tavanti A, Davidson AD, Grow NAR, Maiden MCJ, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida methapsilosis* spp. nov. To Replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. *J Clin Microbiol*. 2005; 43:284-292.

Treagan L. *Candida and its role in opportunistic mycosis*. California: California Association for Medical Laboratory Tecnology; 2011. 19p.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia*. 5a ed. Porto Alegre: Artmed; 2000

Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O, Biraghi E, Canton E, Zimmermann K, Seaton S, Grillot R; ECMM Working Group on Candidaemia. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23:317-22.

Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia*. 5a ed. São Paulo: Atheneu; 2008. p.479-98.

Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21:606-25.

Traoré O, Springthorpe VS, Sattar SA. A quantitative study of the survival of two species of *Candida* on porous and non-porous environmental surfaces and hands. *J Appl Microbiol*. 2002;92:549-55.

Toubas D. Epidémiologie des candidoses invasives. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2013;450:27-32.

Vazquez JA, Sobel JD. Mycoses caused by yeasts. In: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. *Clinical mycology*. New York : Churchill Livingstone, 2003.

Vila J, Martínez JA. Opportunistic Infections in the Intensive Care Unit: A Microbiologic Overview. In: Rello J, Kollef M, Díaz E, Rodríguez A. *Infectious diseases in critical care*. 2nd ed. Berlin: Springer; 2007. Cap.4;p.29.

Voss A, Kluytmans JA, Koeleman JG, Spanjaard L, et al. Occurrence of yeast bloodstream infections between 1987 and 1995 in five Dutch university hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1996; 15: 909-912

Weems JJ Jr. Candida parapsilosis: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis*. 1992;14:756-66.

Wingard JR, Merz WG, Saral R. Candida tropicalis: a major pathogen in: immunocompromised patients. *Ann Intern Med*. 1979; 91:539-43.

Wingard JR. Fungal infections after bone marrow transplant. *Biol Blood Marrow Transplant*. 1999;5:55-68.

Zancopé-Oliveira RM, James MJ, Derossi AP, Sampaio JL, Muniz MM, Li RK, Nascimento AS, Peralta JM, Reiss E. Strain characterization of Candida parapsilosis fungemia by molecular typing methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000;19:514-20.