

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**RALCIANE DE PAULA MENEZES**

**Candidíase invasiva em neonatos críticos: etiologia, patogenia e perfil molecular**

**Uberlândia**

**2018**

**RALCIANE DE PAULA MENEZES**

**Candidíase invasiva em neonatos críticos: etiologia, patogenia e perfil molecular**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia.

**Orientador:**

**Prof. Dra. Denise von Dollinger de Brito Röder**

**Co-orientador:**

**Prof. Dra. Vânia Olivetti Steffen Abdallah**

**Uberlândia**

**2018**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

M543c  
2018 Menezes, Ralciane de Paula, 1990  
Candidíase invasiva em neonatos críticos: etiologia, patogenia e perfil molecular / Ralciane de Paula Menezes. - 2018.  
137 f. : il.

Orientadora: Denise von Dollinger de Brito Röder.  
Coorientadora: Vânia Olivetti Steffen Abdallah.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.36>  
Inclui bibliografia.

1. Ciências Médicas - Teses. 2. Candidíase - Teses. 3. Vigilância epidemiológica - Teses. 4. Infecção hospitalar - Teses. I. Röder, Denise von Dollinger de Brito. II. Abdallah, Vânia Olivetti Steffen. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

---

CDU: 61

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

## FICHA DE APROVAÇÃO



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de Tese de Doutorado Nº 001/PPCSA

Área de concentração: Ciências da Saúde

Linha de Pesquisa 1: Epidemiologia da ocorrência de doenças e agravos à saúde.

Projeto de Pesquisa de vinculação: Epidemiologia das infecções hospitalares.

Discente: **Ralciane de Paula Menezes** – Matrícula nº **11513CSD019**.

Título do Trabalho: "**Candidíase invasiva em neonatos críticos: etiologia, patogenia e perfil molecular.**" Às 09:00 horas do dia 02 de fevereiro do ano de 2018, no anfiteatro do Bloco 2H – Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Professores Doutores: Poliana de Castro Melo (UESC), Profa. Dra. Érika Nascimento (FMRP-USP) via skype, Daniela Marques de Lima Mota Ferreira (UFU), Mário Paulo A. Penatti (UFU)– Denise Von Dolinger de Brito Röder (UFU) orientadora da discente. Iniciando os trabalhos, a presidente da mesa Profa. Dra. Denise Von Dolinger de Brito Röder apresentou a Comissão Examinadora e a discente; agradeceu a presença do público e concedeu a discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A seguir a senhora presidente concedeu a palavra aos examinadores que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, em sessão secreta, em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata ☒ aprovada/ ( ) reprovada. Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor(a). O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 13:00 horas. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Profa. Dra. Denise Von Dolinger de Brito Röder

Profa. Dra. Érika Nascimento (Partipou via Skype)

Profa. Dra. Daniela Marques de Lima Mota Ferreira

Prof. Dr. Mário Paulo A. Penatti

Profa. Dra. Poliana de Castro Melo

Dedico este trabalho a todos os neonatos que passaram pela UTIN do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia durante os anos de desenvolvimento da pesquisa, seres tão frágeis, inocentes, que mal vieram ao mundo e já lutam pela vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre iluminar meus caminhos, por permitir realizar mais este sonho e me mostrar que Ele sempre estava olhando por mim quando as situações mais complicadas e difíceis eram resolvidas, fazendo-me entender que *todas as coisas cooperam para o bem daqueles que O amam (Romanos 8:28)*;

Aos meus pais, Julio e Sandra, meus maiores incentivadores, pelo amor, carinho, paciência, dedicação, por sempre estarem prontos a me ajudar e acreditarem incondicionalmente no meu sucesso;

À minha irmã, Tawane, por estar presente na minha vida e sempre disponível a me ajudar;

Ao meu noivo Rodrigo, um dos meus maiores apoiadores, pelo incentivo constante, por acreditar que eu era capaz de realizar um trabalho tão nobre quanto este, por sempre está disponível a me ajudar e ouvir, pela ajuda na tabulação dos dados e na tradução dos artigos, por me acompanhar no laboratório aos finais de semana, feriados para preparo ou leitura de algum experimento sem nunca ter reclamado, por compreender minha ausência nos momentos de sobrecarga de experimentos e na fase de escrita da tese;

À minha orientadora, professora Dra. Denise von Dolinger de Brito Röder, por sempre ser atenciosa e gentil, pela paciência, por sempre estar disposta a reunir, discutir resultados e sanar minhas dúvidas, pela contribuição para meu crescimento científico e intelectual e por me permitir trabalhar em uma Unidade tão fantástica como a UTIN do HC-UFU;

À minha co-orientadora, professora Dra. Vânia Olivetti Steffen Abdallah, pela confiança conferida a mim e por abrir as portas da UTIN-UFU para realização deste trabalho;

Ao meu amigo e também colega de trabalho, professor Dr. Mário Paulo Amante Penatti, pelo profissionalismo exemplar, pelos conselhos dados, por sempre estar disposto a ensinar e me ajudar na realização de todo o trabalho, pelos conselhos, amizade, pelos risos arrancados nos momentos mais estressantes;

Ao professor Dr. Reginaldo dos Santos Pedroso, que na época da graduação me deu a oportunidade de conhecer e trabalhar com uma área tão apaixonante da Microbiologia que é a Micologia, pela colaboração em todos os experimentos realizados, apoio, paciência, dedicação, coragem, incentivo, amizade e por sempre confiar na minha capacidade durante os anos em que trabalhamos juntos;

Aos professores e técnicos do Curso Técnico de Análises Clínicas da Escola Técnica de Saúde, por sempre torcerem por mim e por sempre acreditarem na minha capacidade;

Aos alunos do grupo de pesquisa, em especial Felipe Flávio Silva, Sávila de Oliveira Melo, Murilo de Oliveira Brito, Priscila Guerino Alves Vilela, Meliza Arantes de Souza Bessa, pela enorme ajuda na realização de todas as etapas deste trabalho, sem vocês eu não teria conseguido terminar tudo em tempo hábil, pela amizade, companheirismo e por tornarem essa árdua caminhada mais suave;

Aos estagiários do Laboratório do Curso Técnico em Análises Clínicas da ESTES-UFU, Maria Cecília Schitine, Lia Cristina Ribeiro e Thaís Ortelan Garcia, pela paciência, confiança demonstrada e por sempre estarem disponíveis a ajudarem no processo de compra de reagentes, preparo de material para experimento e pelo interesse em aprender mais sobre a pesquisa;

A Dra. Maria Inez Ferreira, neonatologista da UTIN do HC-UFU, por sempre ser solícita, disposta a me ajudar nas coletas, no contato com os pais dos neonatos e por sanar todas as dúvidas referentes à clínica de cada paciente;

À Dra. Daniela Marques de Lima Mota Ferreira, atual responsável pela UTIN do HC-UFU, pela confiança demonstrada ao permitir a continuação da realização deste trabalho na Unidade;

As enfermeiras e técnicas de enfermagem da UTIN do HC-UFU, por muitas vezes pararem seus afazeres para me auxiliarem nas coletas de amostras e por aceitarem participar deste trabalho;

Ao professor Dr. Lúcio Borges de Araújo, da Faculdade de Matemática – UFU, pela enorme ajuda na análise estatística de todos os dados;

Aos técnicos de laboratório do setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU, em especial, Tomaz de Aquino e Lucivânia Malvino, por guardarem todas as amostras provenientes da UTIN;

Aos pais dos neonatos internados da UTIN do HC-UFU, por concordarem prontamente em participar do projeto de pesquisa, me recebendo sempre com educação e mostrarem-se dispostos a ajudarem. Sem a participação de vocês este trabalho não teria sido feito e nem faria sentido;

À FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro;

A todas as pessoas que de alguma forma estiveram presentes durante essa caminhada e que de alguma forma contribuíram para a concretização desse sonho, o meu muito obrigado.

*Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram,  
nem jamais penetrou em coração humano  
o que Deus tem preparado para  
aqueles que O amam." 1 Coríntios 2:9*



**“Necessitamos sempre ambicionar  
alguma coisa que, quando alcançada, não nos  
torne sem ambição!”**

***Carlos Drummond de Andrade***

## RESUMO

O aumento da sobrevivência de neonatos prematuros admitidos em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) está associado à elevação da ocorrência de infecções invasivas. A colonização das mãos de profissionais de saúde por micro-organismos patogênicos, capazes de expressar fatores de virulência, como *Candida* spp., é preocupante devido ao máximo contato entre pacientes e profissionais em UTIN. Os objetivos deste estudo foram: verificar a taxa de infecções bacterianas e fúngicas da UTIN do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, bem caracterizar fenotipicamente isolados de *Candida* spp. provenientes das mãos dos profissionais de saúde dessa unidade. Os neonatos incluídos no estudo foram acompanhados diariamente através do sistema NHSN, sendo coletadas informações como idade gestacional (IG), peso ao nascer, uso de dispositivos invasivos e de antimicrobianos, ocorrência de infecções e tempo de internação. Os isolados provenientes das mãos dos profissionais de saúde foram avaliados quanto a produção de fatores de virulência e susceptibilidade aos antifúngicos. A pesquisa de atividade hemolítica e de DNase foi feita utilizando ágar sangue e DNase, respectivamente. A produção de biofilme foi avaliada através da capacidade de redução do sal de sódio XTT e a avaliação da susceptibilidade dos isolados aos antifúngicos foi feita através da metodologia de microdiluição em caldo. Os resultados deste estudo foram: a taxa de infecção hospitalar igual a 12/1000 pacientes-dia. IG, peso, SNAPPE>24 e uso de dispositivos como cateteres, ventilação mecânica e nutrição parenteral foram estatisticamente significativos para ocorrência de infecções bacterianas e fúngicas. O óbito foi 2,6 vezes maior naqueles neonatos com infecção fúngica, em relação aqueles com infecção bacteriana. Foram estudados 50 isolados de *Candida* spp. dos quais 19 foram *C. parapsilosis stricto sensu*, três *C. metapsilosis*, um *C. orthopsilosis*, sete *C. albicans*, seis *C. famata*, cinco *C. lusitaniae*, três *C. krusei*, dois *C. kefyr*, dois *C. tropicalis*, um *C. glabrata* e um *C. guilliermondii*. 49 isolados foram capazes de expressar pelo menos um dos três fatores de virulência pesquisados, sendo que 17 expressaram simultaneamente todos os 3 fatores. Setenta e oito por cento dos isolados foram sensíveis aos três antifúngicos. Esses resultados ressaltam a importância da vigilância epidemiológica constante e de medidas de controle efetivo de infecções na unidade e que isolados de *Candida* provenientes de colonização das mãos de profissionais de saúde são capazes de expressar importantes fatores de virulência.

**Palavras-chaves:** antifúngicos, biofilme, *Candida* spp., recém-nascido, vigilância epidemiológica, virulência.

## ABSTRACT

The increase in survival of preterm infants admitted to Neonatal Intensive Care Units (NICUs) is associated with an increase in the occurrence of invasive infections. The colonization of the hands of health professionals by pathogenic microorganisms capable of expressing virulence factors, such as *Candida* spp., is worrisome due to the constant contact between patients and professionals in NICU. The objectives of this study were: to verify the rate of bacterial and fungal infections in a NICU of the Clinical Hospital of Federal University of Uberlândia, to characterize phenotypically isolated *Candida* spp. from the hands of health professionals in the neonatology department. The newborns included in the study were monitored daily through the NHSN system, with information such as: gestational age (GI), birth weight, use of invasive and antimicrobial devices, infections and length of hospital stay. Isolates from the hands of health professionals were evaluated for the production of virulence factors and antifungal susceptibility. The hemolytic activity and DNase were investigated using blood agar and DNase, respectively. Biofilm production was evaluated through the XTT sodium salt reduction ability and the evaluation of the susceptibility of the isolates to the antifungals was done through the broth microdilution methodology. The results of this study were: the hospital infection rate equals 12/1000 patient-days. GI, weight, SNAPPE > 24 and use of devices such as catheters, mechanical ventilation and parenteral nutrition were statistically significant for bacterial and fungal infections. Death was 2.6 times higher in those with fungal infection compared to those with bacterial infection. Fifty isolates of *Candida* spp. of which 19 were *C. parapsilosis* *stricto sensu*, three *C. metapsilosis*, one *C. orthopsilosis*, seven *C. albicans*, six *C. famata*, five *C. lusitaniae*, three *C. krusei*, two *C. kefyr*, two *C. tropicalis*, a *C. glabrata* and a *C. guilliermondii*. 49 isolates were able to express at least one of the three virulence factors studied, and 17 simultaneously expressed all 3 factors. Seventy-eight percent of the isolates were sensitive to the three antifungals. These results demonstrated the importance of constant epidemiological surveillance and measures of effective control of infections in the neonatology sector and that isolates of *Candida* from colonization of the hands of health professionals are able to express important factors of virulence.

**Key words:** antifungals, biofilm, *Candida* spp., epidemiological surveillance, newborns, virulence.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ASD – Agar Sabouraud Dextrose

CCIH - Comissões de Controle de Infecção Hospitalar

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute

CUV – Cateter Umbilical Venoso

CVC – Cateter Venoso Central

DC - Diâmetro da Colônia

DCP - Diâmetro da Colônia + Zona de Hemólise

DO – Densidade Ótica

DP – Desvio Padrão

DU – Densidade de utilização

HC-UFU – Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

I - Intermediário

IG – Idade Gestacional

IN – Infecção Nosocomial

IRAS – Infecção Relacionada à Assitência

NHSN - National Healthcare Safety Network

NNIS - National Nosocomial Infections Surveillance

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

OR – Odds Ratio

PBS - Tampão Salina Fosfato

PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase

PICC – Cateter de Inserção Periférica

R - Resistente

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

RN – Recém Nascido

RNPT – Recém- Nascido Pré-Termo de Extremo Baixo Peso

RNPT EBP - Recém- Nascido Pré-Termo de Extremo Baixo Peso

RNPT MBP - Recém- Nascido Pré-Termo de Muito Baixo Peso

S - Sensível

SCON - *Staphylococcus* coagulase negativa

SDD – Sensibilidade Dose Dependente

SNAP II - Score for Neonatal Acute Physiology version II

SNAPPE II - Score for Neonatal Acute Physiology, Perinatal Extension, version II

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UTIN – Unidade de Terapia Intensiva Neonatal

XTT - (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2*H*-Tetrazolium-5Carboxanilide)

YPD - Yeast, Peptona e Dextrose

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Comparação do número de micro-organismos e acumulado de leveduras isolados de infecção nos RN internados na UTIN do HC-UFU entre os quatro anos de vigilância.....	53
<b>Figura 2</b> – Distribuição dos micro-organismos isolados dos RN internados na UTIN do HC-UFU em cada ano de vigilância.....	54
<b>Figura 1</b> –Expressão de fatores de virulência em isolados de <i>Candida</i> spp. provenientes das mãos de profissionais de saúde de uma UTIN.....	67

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Fatores de risco para aquisição de infecção bacteriana e evolução dos neonatos internados entre 2013-2016.....	49
<b>Tabela 2</b> – Fatores de risco para aquisição de infecção fúngica e evolução dos neonatos internados entre 2013-2016.....	51
<b>Tabela 3</b> – Micro-organismos causadores de infecções invasivas em neonatos internados na UTIN do HC-UFU nos anos de 2013 a 2016.....	52
<b>Tabela 1</b> – Pontos de corte padronizados para interpretação dos valores de MIC para espécies de <i>Candida</i> segundo CLSI.....	66
<b>Tabela 2</b> - Atividade hemolítica, DNase e produção de biofilme dos isolados de <i>Candida</i> spp. provenientes das mãos de profissionais de saúde da UTIN do HC-UFU.....	69
<b>Tabela 3</b> - Valores de MIC apresentados pelas espécies de <i>Candida</i> provenientes das mãos de profissionais de saúde da UTIN do HC-UFU.....	71
<b>Tabela 4</b> - Comparação da produção de enzimas, biofilme e susceptibilidade aos antifúngicos entre as espécies isoladas das mãos de profissionais de saúde da UTIN do HC-UFU.....	73

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1	Neonatos.....	18
2.2	Fatores de risco para infecções invasivas em neonatos.....	19
2.3	Vigilância epidemiológica.....	22
2.4	Micro-organismos mais frequentes.....	24
2.5	Candidíases invasivas.....	25
2.6	Diagnóstico de candidíase invasiva e identificação das espécies.....	30
2.7	Fatores de virulência.....	32
2.7.1	<i>Produção de exoenzimas</i> .....	32
2.7.2	<i>Formação de biofilme</i> .....	34
2.8	Susceptibilidade aos antifúngicos.....	36
3	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	40
3.1	Objetivo geral.....	40
3.2	Objetivos específicos.....	40
4	RESULTADOS.....	42
4.1	Artigo 1.....	43
4.2	Artigo 2.....	60
	REFERÊNCIAS.....	81
	ANEXO A – PARECER COMITÊ DE ÉTICA COM PESQUISA EM SERES HUMANOS – UFU.....	93
	ANEXO B – FICHA EPIDEMIOLÓGICA.....	99
	ANEXO C – ARTIGO 1 – VERSÃO EM INGLÊS.....	101
	ANEXO D – ARTIGO 2 – VERSÃO EM INGLÊS.....	118



## 1 INTRODUÇÃO

As espécies de *Candida* podem ser encontradas nos animais, água, compondo a microbiota dos seres humanos e até mesmo no ambiente, incluindo o hospitalar. Entretanto, em alguns casos, *Candida* spp. pode ser patogênica e desencadear desde micoses superficiais (quando acometem pele e unhas) até infecções invasivas, podendo causar sequelas ou até mesmo levar o indivíduo ao óbito (LACAZ et al., 2002).

A candidíase pode ser cutânea, mucocutânea, vulvovaginal e do trato urinário, podendo ocorrer em eventos primários, como nas cirurgias, ou como um processo secundário, no caso da candidemia. A maioria das infecções desencadeadas por *Candida* spp. envolvem a formação de biofilmes, uma comunidade microbiana, composta por uma matriz extracelular de polímeros e células aderidas a um substrato, interface ou umas as outras de modo irreversível. As células que compõe o biofilme apresentam transcrição genética e crescimento alterados quando comparados com as células (KAUFMAN et al., 2014; SANTANA et al., 2013).

Nas últimas décadas, a ocorrência de candidíases invasivas teve um aumento significativo e já é um problema de saúde pública mundial devido a sua gravidade, letalidade e por elevar o tempo e custos hospitalares com o paciente (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN), *Candida* spp. acomete principalmente neonatos extremamente prematuros e com peso inferior a 1000g. As taxas de morbimortalidade são elevadas, com comprometimento neural em até 60% dos neonatos acometidos e mortalidade variando de 15 a 59% (GONDIM et al., 2009; IZQUIERDO; SANTOLAYA, 2014; RODRIGUEZ et al., 2006; TAIRA et al., 2014). As espécies isoladas variam entre as diferentes regiões do planeta, entretanto, na maioria dos casos, *C. albicans* ainda é a mais frequente, seguida muitas vezes de *C. parapsilosis*.

A incidência de candidíase invasiva em neonatos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, principalmente em virtude do aumento da sobrevivência dos recém-nascidos prematuros e com muito baixo peso (<1500g) ou gravemente doentes, associado com a presença de alguns fatores considerados de risco: colonização fúngica ao nascimento ou sua aquisição através do uso de antimicrobianos de amplo espectro que agem de forma seletiva sobre as bactérias que compõe a microbiota, período de internação prolongado, realização de procedimentos invasivos como uso de cateter vascular central, ventilação mecânica, sonda

para nutrição parenteral e, eventualmente, realização de procedimentos cirúrgicos (GONDIM et al., 2009; MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014).

Tanto a escolha de uma terapia antifúngica apropriada quanto à seleção da droga, leva em consideração critérios como o estado imunológico do hospedeiro, o sítio da infecção, a espécie fúngica envolvida e a sensibilidade às diferentes drogas. Em virtude do aumento significativo do uso dos azólicos, como o fluconazol, tem se observado o aparecimento de cepas resistentes. Além disso, o aumento do número de infecções causadas por espécies diferentes de *C. albicans*, que apresentam sensibilidade variável aos antifúngicos, como é o caso de *C. krusei* que é intrinsecamente resistente ao fluconazol, tem contribuído para a maior atenção que tem sido dada ao assunto (MOTTA et al., 2010).

As consequências de um processo infeccioso por *Candida* spp., especialmente em neonatos, podem ser fatais. Desse modo, a realização de uma vigilância epidemiológica contínua dos pacientes (permitindo conhecer o perfil dos pacientes e de micro-organismos prevalentes da unidade) aliada à manipulação adequada dos dispositivos invasivos, a execução correta de técnicas de higienização de mãos e objetos e ao uso racional de antimicrobianos, são fundamentais para minimizar ou até mesmo evitar os riscos de desenvolvimento de candidíases invasivas, reduzindo assim as taxas de mortalidade e de neonatos com sequelas que podem comprometer seu desenvolvimento psíquico-social.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Neonatos

A partir da década de 1960 passou-se a investir mais em pesquisas relacionadas a neonatos prematuros, o que proporcionou um avanço na neonatologia e resultou, inicialmente, na criação de uma unidade específica para atender recém-nascidos (RN) prematuros e em estado grave, mais tarde chamada de Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN). Em virtude disso, recém-nascidos pré-termos (RNPT) passaram a ter maiores possibilidades de sobreviverem após um parto precoce. Posteriormente, com o estabelecimento da ventilação mecânica, o surgimento do surfactante exógeno, a evolução no prognóstico da retinopatia da prematuridade e outras complicações, desenvolvimento de cateteres especiais, introdução da nutrição parenteral e progressos na genética, houve uma melhora na sobrevida do RN. A prematuridade passou a ser a principal causa de internação. Os anos 2000 foram marcados pela utilização de tecnologia nas UTIN, modificando o prognóstico e sobrevida de neonatos graves (SOUZA, 2011).

O neonato pode nascer prematuro em consequência do trabalho de parto espontâneo propriamente dito ou da ruptura precoce das membranas, sendo, portanto, natural, ou pode ocorrer por indicação médica devido a complicações maternas e/ou fetais (DIAS, 2013).

Período perinatal compreende a 22ª semana de gestação completa até o sétimo dia de vida do RN. Em relação à época do nascimento, um neonato é dito como à termo quando ele nasce entre a 37ª e a 41ª semana e seis dias de gestação, pré-termo quando o parto ocorre com idade gestacional (IG) inferior a 37 semanas e pós termo quando o RN nasce com 42 semanas ou mais de gestação, não levando em consideração o peso apresentado ao nascer (DIAS, 2013; SCHAEFER, 2014).

Além disso, os RNPT podem ser classificados como prematuros limítrofes, moderadamente e extremamente prematuros ainda em relação à IG, sendo os limítrofes os RN com IG entre 36 e 37 semanas, moderados quando o parto ocorre entre a 31ª e 36ª semana e os extremos aqueles que nascem entre a 24ª e 30ª semana de gravidez (SCHAEFER, 2014).

Os neonatos também podem ser classificados em três categorias de acordo com o peso apresentado ao nascer: baixo peso, ou seja, RN com peso inferior a 2500g (até 2499g, inclusive), muito baixo peso (RNPT MBP), ou seja, RN que nasce com peso menor do que 1500g e extremo baixo peso (RNPT EBP) ao nascer, quando o neonato está abaixo de 1000g

ao nascer (até 999g, inclusive) (KOPELMAN et al., 2004). A categoria de neonatos mais suscetíveis a infecções invasivas e demais comorbidades, bem como maiores taxas de mortalidade são aqueles com peso inferior a 1500g (TSAI et al., 2014).

Os avanços na medicina ocorridos nas últimas décadas permitiram uma sobrevida maior de RNPT e com alguma comorbidade grave. Porém, com a permanência prolongada destes pacientes em ambiente hospitalar, houve um aumento no risco de desenvolvimento de infecções invasivas e, evitar a ocorrência dessas passou a ser uma das prioridades dos profissionais das UTIN, devido à gravidade e aos custos elevados no tratamento dessas patologias (HORNICK et al., 2012). Na América do Norte, a duração de cada episódio de sepse eleva em até duas semanas o tempo de internação do paciente, resultando em 25000 dólares a mais nos custos do tratamento. Além disso, acomete mais de um milhão de RN todos os anos, sendo responsável por 40% de todas as mortes de neonatos (MARCHANT et al., 2013; TZIALLA et al., 2015).

A sepse em RN pode ser precoce ou tardia. A sepse precoce ocorre nas primeiras 72 horas após o parto com alterações clínicas e laboratoriais, sendo que essas infecções são adquiridas no período intraparto, com provável origem materna, principalmente das infecções não tratadas nas mães durante a gestação (SHANE; STOLL, 2014).

Já a sepse tardia é aquela que o RN apresenta sinais clínicos e laboratoriais de infecção após 72 horas de vida (BENTLIN et al., 2015; SHANE; STOLL, 2014). Esse tipo de infecção possui relação direta com os micro-organismos presentes no ambiente da UTIN, bem como com os procedimentos técnicos realizados nos neonatos, dentre eles: cateterismo arterial e venoso, nutrição parenteral, intubação traqueal, sondagem gástrica ou gastroduodenal, derivações ventrículo-peritoneais, drenagem torácica e ventilação mecânica (TOMAZ et al., 2011).

## **2.2 Fatores de risco para infecções invasivas em neonatos**

Algumas condições consideradas de risco para o desenvolvimento de infecções invasivas já são bem conhecidas. As principais estão listadas a seguir.

A pouca idade gestacional (< 28 semanas) e o baixo peso ao nascer (< 1500g) são condições predominantes para infecções invasivas, em especial àquelas desencadeadas por espécies de *Candida*, denominadas candidíases invasivas. Isso, porque o RN prematuro além de ter um sistema imune imaturo, as mucosas e pele, que são considerados barreiras contra invasão de micro-organismos patogênicos, ainda não estão totalmente íntegras

(ARSENAULT, BLISS, 2015; BOO; CHEAH, 2016; CALLEY; WARRIS, 2017; CANTEY; MILSTONE, 2015). Os RN extremamente prematuros frequentemente apresentam complicações em decorrência da sua condição, tais como displasia broncopulmonar e enterocolite necrotizante, e que estão diretamente relacionadas à ocorrência de sepse. Alguns autores mostraram que a taxa de sepse tardia em neonatos que nasceram com menos de 25 semanas de gestação foi de 46%, em RN com IG entre 25 e 28 semanas é de 28% e de aproximadamente 10% em RN nascidos com 29 a 32 semanas (CANTEY; MILSTONE, 2015).

A colonização do trato gastrointestinal também é um importante fator de risco para desenvolvimento de candidíase invasiva (ARSENAULT, BLISS, 2015; CALLEY; WARRIS, 2017). Pesquisas mostram que cerca de 5% dos RN já entram na UTIN com o trato gastrointestinal colonizado por *Candida* spp., chegando a 50% na primeira semana e até 75% ao completar um mês de vida (IZQUIERDO; SANTOLAYA, 2014). Para alguns autores, os RN podem adquirir *C. albicans* principalmente, no momento do parto, em virtude do contato com o canal vaginal, ao passo que a colonização por *C. parapsilosis* ocorre de forma horizontal, ou seja, através do contato dos profissionais de saúde que tem essa levedura como parte da microbiota da sua pele (IZQUIERDO; SANTOLAYA, 2014; MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014). Essa colonização, associada ao longo tempo de internação do neonato, muitas vezes culmina no desenvolvimento de candidíase invasiva cuja origem foi exógena (MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014). Desse modo, estudos que busquem a identificação rápida e precisa da fonte de infecção e das vias de transmissão são de extrema importância para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle desse tipo de infecção (MUSKETT et al., 2011; MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014). Saiman e colaboradores (2001) em um estudo realizado com seis UTIN encontraram uma taxa de colonização dos RN de até 26%, sendo *C. albicans* a espécie mais prevalente, seguida de *C. parapsilosis*. Já outro estudo deste mesmo grupo de pesquisa constatou que 40% dos isolados de candidíase invasiva em neonatos críticos eram geneticamente iguais aos isolados do trato gastrointestinal dos mesmos RN (SAIMAN et al., 2000).

Leveduras do gênero *Candida* podem translocar do trato gastrointestinal para corrente sanguínea e desencadear um processo infeccioso grave, principalmente em pacientes transplantados ou que realizaram cirurgia abdominal (MUSKETT et al., 2011; MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014). Além disso, patologias do trato gastrointestinal, como enterocolite necrotizante ou outro distúrbio intestinal congênito conferem um risco adicional para a

ocorrência de candidíase invasiva, principalmente naqueles neonatos já colonizados por alguma espécie de *Candida* (FEJA et al., 2005; LEE et al., 2013).

Associado as condições inerentes do RN, o uso de dispositivos invasivos, que permitem muitas vezes a manutenção da vida do neonato fora do útero materno, pode contribuir para o desenvolvimento de candidíases invasivas, quando não higienizados e manipulados corretamente. Exemplos destes dispositivos são: cateter venoso central (CVC), nas suas diversas variações, nutrição parenteral, ventilação mecânica, drenos e sondas (FEJA et al., 2005).

O uso de cateteres facilita o acesso à corrente sanguínea, sendo de grande utilidade clínica. Por isso, são utilizados para administração de fluidos endovenosos, medicamentos, nutrição parenteral total e realização de hemodiálises. No entanto, estes dispositivos não estão isentos de riscos de complicações mecânicas e infecciosas. São vários os cateteres centrais disponíveis, sendo os mais frequentes em UTIN o cateter venoso umbilical (CVU), utilizado nos primeiros dias de vida do RN e o cateter de inserção periférica de longa permanência (PICC). Pode ser utilizado também, mas em menor frequência, o cateter intracath venoso central, o qual é mais longo que os listados anteriormente e a flebotomia, uma incisão praticada em uma veia periférica para inserção de um cateter (PERLMAN et al., 2007).

O uso de antimicrobianos é frequente em RN em virtude dos riscos e letalidade de infecções bacterianas nos mesmos. Entretanto, não está comprovado que o uso profilático de antimicrobianos previne a ocorrência de infecções invasivas (TZIALLA et al., 2015). Neonatos cuja microbiota ainda não está totalmente estabelecida, quando tratados com antimicrobianos de amplo espectro, em especial cefalosporinas de terceira geração, podem ter o microbioma intestinal alterado, com a diminuição das bactérias comensais e consequente aumento de leveduras do gênero *Candida* que, em condições favoráveis podem passar de comensais para patogênicas, iniciando um quadro infeccioso (ARSENAULT, BLISS, 2015). Prova deste aumento é um estudo multicêntrico realizado com mais de três mil neonatos de extremo baixo peso ao nascer que encontrou uma associação significativa entre o uso de cefalosporinas ou carbapenêmicos e o aumento nos casos de candidíases invasivas, com incidência variando de 2,4% a 20,3% (COTTON et al., 2006; TZIALLA et al., 2015).

Fatores de risco adicionais incluem o uso de bloqueadores de receptores de H2, que alteram o pH gástrico, alterando o meio microbiano e permitindo o aumento da sobrevivência e reprodução de *Candida* spp. O uso de nutrição parenteral, em especial de infusões lipídicas,

propicia um ambiente lipofílico, ideal para a proliferação de espécies de *Candida*. Todos estes fatores citados anteriormente, excetuando aqueles relacionados à prematuridade, podem ser modificados, com utilização consciente e limitada com intuito de reduzir a ocorrência de candidíases invasivas (ARSENAULT; BLISS, 2015). Por fim, o tempo de internação prolongado, associado ao uso dos dispositivos citados acima e antimicrobianoterapia de amplo espectro, condições muitas vezes necessárias para manutenção da vida de neonatos extremos, aumenta de forma considerável o risco do desenvolvimento de infecções invasivas (FEJA et al., 2005; SAIMAN et al., 2000; STEINBACH et al., 2012).

São poucos os estudos que avaliam a importância do ambiente na instalação do processo infeccioso. Porém, há relatos de que salas apropriadas para o isolamento de pacientes com infecções por micro-organismos de fácil transmissão e o acesso facilitado às instalações de higienização das mãos podem contribuir para a redução de infecções relacionadas à assistência em saúde. Em hospitais onde as UTIN foram implantadas em locais provisórios observou-se um aumento significativo na ocorrência de infecções invasivas, variando de 12,8 a 18,6%. Segundo os autores, esta elevação no número de infecções pode ter ocorrido em consequência do aumento de admissões, resultando na superlotação do local, aliado à improvisação do mesmo, com instalações insuficientes para a higienização das mãos, pouco espaço para distribuição de equipamentos e leitos, contribuindo para a contaminação do ambiente por agentes patogênicos (VON DOLINGER DE BRITO et al., 2007).

### **2.3 Vigilância epidemiológica**

Sistemas de vigilância que permitem o acompanhamento contínuo e diário de pacientes de UTIN são extremamente importantes, pois permitem conhecer o perfil dos pacientes admitidos na unidade, os sítios orgânicos mais acometidos por micro-organismos e as espécies isoladas com maior frequência de infecções invasivas, além de avaliar quais dispositivos estão associados à ocorrência de infecções ao longo dos anos e detectar intercorrências que possam comprometer o bom funcionamento da unidade, aumentar a ocorrência de infecções e até a taxa de óbito (TEKIN et al., 2013).

A organização da vigilância epidemiológica teve início nos Estados Unidos no ano de 1986 por intermédio do Centers for Disease Control and Prevention (CDC) através da implantação do Sistema National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS). Esse sistema

foi ampliado e revisado no ano de 2005 e recebeu então, a denominação de National Healthcare Safety Network (NHSN) (FERREIRA et al, 2014).

NHSN é o sistema de rastreamento de infecções associado aos cuidados de saúde mais comumente utilizado no país. Ele oferece comodidade aos estados, regiões e à nação, visto que possui dados necessários para identificar áreas problemáticas e oferece ainda, suporte para medir a progressão dos esforços de prevenção (CENTERS FOR DIASE CONTROL AND PREVENTION, 2016).

A ficha de vigilância epidemiológica proposta pelo NHSN, além de permitir a coleta de informações como: tipo e dias de utilização de dispositivos invasivos, IG, peso ao nascer ocorrência de infecções, micro-organismos isolados e perfil de resistência dos mesmos, também permite o acesso aos valores do Boletim Apgar e do Índice de gravidade. O Boletim de Apgar é um índice descreve as condições do RN no momento de avaliação. O escore geralmente é obtido no primeiro e quinto minuto de vida. Sua pontuação varia de zero a dez (APGAR, 1953). Já o Índice de gravidade, também chamado de Score for Neonatal Acute Physiology, Perinatal Extension, version II (SNAPPE II) é uma medida que investiga a gravidade das doenças em UTIN. O SNAP II é considerado medida de gravidade da doença, ao passo que o SNAPPE II é uma medida de risco de mortalidade. Os dois índices são simples, rápidos e acurados. A simplificação do método permitiu que esse índice fosse utilizado na rotina da UTIN. Os valores variam de 0 a 175, sendo que quanto maior o valor, maior é a gravidade do estado de saúde do RN e mais altas são as chances do neonato evoluir para o óbito (KOPELMAN et al., 2004).

O Ministério da Saúde do Brasil, em 1994, adotou o método proposto pelo NNIS como padrão para vigilância epidemiológica de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) no Brasil. Assim, a vigilância epidemiológica e notificação das IRAS nos hospitais brasileiros têm como referência os protocolos do NHSN.

O controle de infecções é um desafio para a maioria das equipes de saúde e, portanto, as Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) devem implantar um sistema de vigilância epidemiológica de IRAS em setores críticos, como as UTIN (FERREIRA et al, 2014). Os resultados obtidos com a vigilância contínua permitem estabelecer medidas de prevenção destas infecções objetivando a redução das mesmas em longo prazo (CRIVARO et al., 2015).



Apesar da importância já relatada da vigilância diária poucos países realizam esse acompanhamento de forma efetiva em UTIN, sendo mais comum em países desenvolvidos (CRIVARO et al., 2015).

## 2.4 Micro-organismos mais frequentes

As infecções invasivas por bactérias Gram positiva são as mais frequentes em UTIN de hospitais de países desenvolvidos, e muitos trabalhos relatam *Staphylococcus* coagulase negativa (SCON) como principal responsável por esse tipo de infecção (HAMMOUD et al., 2017). Neste grupo destaca-se o *S. epidermidis*, prevalente na microbiota da pele, podendo colonizar mucosas intestinais, das narinas e garganta, e muitas vezes, devido a maior permeabilidade intestinal dos RN, em associação com a ausência de microbiota, SCON pode translocar do lúmen intestinal para corrente sanguínea e desencadear um processo infeccioso. Isso, porque, a pele do RN é mais fina e não é totalmente queratinizada, o que permite o SCON penetrar mais facilmente do que nos demais pacientes (HAMMOUD et al., 2017; RESENDE et al., 2015).

Porém, a ocorrência de infecções invasivas por Gram negativos e fungos tem aumentando consideravelmente, tendo sido relatados surtos por *Enterobacteriaceae* em UTIN de diversos hospitais ao redor do planeta (NAMBIAR; SINGH, 2002). A porcentagem de bactérias Gram negativa isoladas de sepse tardia em países como o Reino Unido pode chegar a 40%, mas ainda tem os Gram positivos como principais agentes causadores de sepse (ANTHONY et al., 2013). Em países em desenvolvimento bacteremias por Gram negativos são mais comuns, sendo responsáveis por até 78% dos casos (KAYANGE et al., 2010; MACHARASHVILI et al., 2009).

Infecções por Gram negativos e agentes fúngicos são notoriamente mais graves, elevam os custos de hospitalização e estão relacionadas a altas taxas de mortalidade, podendo chegar a 50% quando ocasionadas por Gram negativos e 34% quando desencadeadas por fungos (FU et al., 2017; URZÚA et al., 2017), e podem contribuir com o maior número de neonatos que ficam com sequelas neurodegenerativas (NOUR et al., 2017; IZQUIERDO; SANTOLAYA, 2014).

Grande parte das bactérias Gram negativas podem ser encontradas no ambiente hospitalar ou colonizando mãos de profissionais de saúde. Desse modo, uma higienização incorreta das mãos e de equipamentos de uso comum antes e após a manipulação do paciente,

superlotação da unidade, com pouco espaço entre os leitos, bem como a administração prolongada de antimicrobianos de amplo espectro podem contribuir para a colonização e posterior infecção dos RN por essa classe bacteriana (ANTHONY et al., 2013).

*Klebsiella* sp. é responsável pela maioria dos surtos em UTIN, seguida de *Serratia marcescens*, *Enterobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Acinetobacter* sp. Estes surtos impedem o funcionamento efetivo das unidades neonatais por provocar o fechamento de até 12% destas unidades anualmente para controle e combate as mesmas (ANTHONY et al., 2013).

## 2.5 Candidíases invasivas

Leveduras do gênero *Candida* são as principais responsáveis pelas infecções fúngicas hospitalares. O sítio de infecção com maior número de isolamento é o sangue, sendo a infecção denominada de candidemia. Entretanto, *Candida* spp. podem ser isoladas de outros sítios anatômicos, como meninges, abscessos esplênicos ou renais, líquidos pleural e ascítico, sendo denominada de candidíase invasiva (CANTEY; MILSTONE, 2015; TZIALLA et al., 2015). Em algumas UTIN já existem protocolos para profilaxia antifúngica, com duração aproximada de seis semanas. Essa conduta é indicada para RNPT com peso ao nascer inferior a 1500g, objetivando reduzir os riscos de desenvolvimento de candidíase invasiva, devido ao elevado risco de morte ou sequelas permanentes neste grupo especificado (SHANE, STOLL, 2014).

As candidíases invasivas geralmente têm origem endógena, pois podem resultar da proliferação ou alteração da microbiota humana, determinada por fatores de risco citados anteriormente (KOJIC; DAROUICHE, 2004). Entretanto, sabe-se que algumas infecções por *Candida* spp. tem origem exógena, já que as leveduras podem estar presentes desde o chão do hospital até no leito do paciente, nos dispositivos médicos, nas soluções para nutrição parenteral e até mesmo na superfície dos dispositivos intravasculares. Dessa forma, a presença unânime desse micro-organismo no ambiente hospitalar propicia inicialmente a colonização dos pacientes e, em muitos casos, o desenvolvimento da infecção naqueles indivíduos que apresentem alguma lesão na pele ou estejam em uso de cateter (PFALLER; DIEKEMA, 2007; MUSKETT et al., 2011). Vários estudos demonstraram que a higienização incorreta das mãos dos profissionais da saúde, que muitas vezes estão colonizadas por *Candida* spp., podem

contribuir não só com a colonização, como também com a disseminação da infecção (VAN ASBECK et al., 2007; HERNÁNDEZ-CASTRO et al., 2010).

Esse tipo de infecção é considerado um problema de saúde pública mundial de grande relevância em virtude da sua gravidade, por acarretar aumento do tempo de internação hospitalar e, conseqüentemente, elevar os custos de hospitalização, além de contribuir para a elevação das taxas de morbimortalidade dos pacientes acometidos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; SELLAMI et al., 2011).

O aumento na sobrevida de neonatos prematuros, em especial daqueles com peso inferior a 1500 gramas, culminou na elevação de infecções fúngicas invasivas (BENJAMIN et al., 2016). *Candida* spp. já é o terceiro micro-organismo mais isolado de infecções invasivas em RN e o quarto patógeno mais comum em UTI Pediátrica (IZQUIERDO; SANTOLAYA, 2014; TAIRA et al., 2014). De acordo com alguns estudos, leveduras do gênero *Candida* são responsáveis por 9 a 13% das infecções de corrente sanguínea nos pacientes com pouca idade (BENJAMIN et al., 2006; JUYAL et al., 2013). A ocorrência de candidemia no período neonatal está diretamente relacionada com as altas taxas de morbimortalidade, principalmente em RN com extremo baixo peso (< 1000g), sendo que até 60% desses que desenvolveram esse tipo de infecção ficam com alguma sequela neurodegenerativa (IZQUIERDO; SANTOLAYA, 2014). A taxa de mortalidade varia entre 15 e 59% (CHEN et al., 2016; RODRIGUEZ et al., 2006; GONDIM et al., 2009).

A incidência de candidíase invasiva em RN tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, já que as UTIN são consideradas áreas de risco altíssimo para a ocorrência de surtos de candidemia, causadas principalmente por *C. albicans* e *C.parapsilosis* (MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014).

A epidemiologia das candidíases invasivas em UTIN varia de acordo com a região geográfica. Em um estudo realizado nos Estados Unidos, que avaliou a ocorrência de infecções fúngicas invasivas em UTIN entre 2000 e 2011, foi encontrada uma incidência de 9,8/1000 pacientes admitidos por ano na unidade, sendo que *Candida* spp. foi o fungo responsável por 95,2% das infecções (AGARWAL et al., 2017). Em contrapartida, em um estudo semelhante no Reino Unido a taxa de infecção fúngica foi de 20/1000 (CLERIHEW et al., 2006). Já Izquierdo e Santolaya (2014), em outro estudo desenvolvido em um hospital

chileno, encontraram uma taxa de incidência de candidemia em RN igual a 0,81/1000 altas hospitalares.

Na China, em uma pesquisa feita em dois hospitais infantis entre 2012 e 2015, a incidência de candidemia nos neonatos admitidos foi de 1,4%. Neste estudo, *C. albicans* correspondeu a 43,5% do total de isolados, ao passo que espécies não-*albicans* foram responsáveis por 56,5% das infecções, assim distribuídas: *C. glabrata* (33,3%), *C. tropicalis* (20,3%), *C. parapsilosis* (1,4%) e *C. kefyr* (1,4%) (FU et al., 2017).

Um estudo retrospectivo realizado em um hospital do sudeste da Itália, entre 2000 e 2014, encontrou 57 casos de candidemia confirmada em neonatos, sendo que 47% dos acometidos tinham peso inferior a 1000g. A espécie mais frequente foi *C. albicans* (47%) seguida do complexo *C. parapsilosis* (44%), *C. guilliermondii* (5%) e *C. glabrata* (4%) (LOVERO et al., 2016).

Já em Portugal, um estudo multicêntrico de vigilância no período de seis anos (2005-2010) encontrou uma taxa de incidência de 0,42 casos por 1000 admissões, a idade gestacional média dos RN com candidíase invasiva foi de 26 semanas e 65,6% eram de extremo baixo peso. Candidíase disseminada foi observada em 20,45% dos RN, sendo *C. albicans* e *C. parapsilosis* as espécies encontradas. Candidemia foi a infecção mais frequente, tendo sido isolada 18 amostras de *C. albicans*, 11 *C. parapsilosis* e 1 *C. glabrata* (BATISTA et al., 2016).

Um estudo realizado na UTIN de um hospital universitário da região norte do Brasil entre 2008 e 2010, encontrou 36 casos de candidemia, sendo a taxa de incidência de 15,1% para cada 1000 admissões (SOARES; OLIVEIRA; CARNEIRO, 2013). Já no estado do Mato Grosso a incidência foi de 5/1000 admissões sendo que a maioria dos pacientes acometidos por candidíase invasiva foram RN prematuros e de extremo baixo peso (23%) (AKEME YAMAMOTO et al., 2012). No sul do Brasil, em um estudo de quatro anos, 108 pacientes apresentaram candidemia, dos quais 22,7% eram RN (DA COSTA et al., 2014). Em Mato Grosso, a espécie mais frequente foi *C. albicans* ao passo que no estado do Paraná *C. tropicalis* foi o micro-organismo mais isolado.

São conhecidas mais de 150 espécies de *Candida*, das quais pouco mais de 20 podem desencadear infecções no homem (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; KURTZMAN; FELL, 1998). Apenas as leveduras capazes de crescer à temperatura de 37°C são potencialmente

patogênicas, tornando-se importante pela alta frequência com que colonizam e infectam o homem (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; MATTHEW et al., 2010).

Até fim do século XX a principal espécie isolada de candidíases era *C. albicans*, entretanto houve um aumento significativo de infecções por espécies não-*albicans* e hoje são importantes patógenos as espécies: *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*. Além de espécies emergentes como *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. rugosa* e *C. famata* (LOPEZ et al., 2005). O aumento de infecções fúngicas por *Candida* não-*albicans* está relacionado tanto com a evolução dos métodos de identificação dos isolados, que permitiram a detecção e diferenciação de um maior número de espécies, quanto com o aumento da sobrevivência de indivíduos debilitados, como neonatos prematuros, que contribuíram para o aparecimento de uma gama de patógenos oportunistas, dentre eles inúmeras espécies de *Candida* (PFALLER, DIEKEMA, 2007).

*C. albicans* é comensal da vagina, trato gastrointestinal e mucosa oral da maioria dos seres humanos. Expressa fatores de virulência como capacidade de adesão, termotolerância e produção de exoenzimas, podendo ser mais patogênica do que algumas espécies não-*albicans*, *C. parapsilosis*, por exemplo (NGUYEN et al., 2012). Esta espécie ainda é a principal responsável por micoses superficiais e invasivas em neonatos e outros tipos de pacientes em diversas regiões do mundo e, por isso, tem uma grande importância médica e econômica por estar associada ao aumento das taxas de morbimortalidade e, consequentemente, dos custos hospitalares (LAI et al., 2012; SILVA, 2015).

*C. parapsilosis* é encontrada predominantemente na microbiota da pele, estando relacionada, muitas vezes, à infecções de origem exógena, sendo condições de risco para desenvolvimento de infecção por ela uso de nutrição parenteral e cateter venoso central (MENEZES, 2014). *C. parapsilosis* já é a espécie não-*albicans* mais frequente em infecções fúngicas invasivas em neonatos (IZQUIERDO; SANTOLAYA, 2014). Apesar de pesquisas laboratoriais demonstrarem uma virulência inferior àquela observada em isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis* é capaz de aderir fortemente a dispositivos invasivos em virtude da produção de biofilme, e proliferar rapidamente em meios com grande disponibilidade de glicose, sendo um micro-organismo que coloniza e desenvolve o processo infeccioso de forma rápida (PFALLER et al., 2008; SILVA, 2015). Para alguns autores, a tendência de infecções invasivas por *C. parapsilosis* é aumentar, já que essa está presente na microbiota das mãos de profissionais de saúde e possui afinidade pela nutrição parenteral. Desse modo, é

indispensável a higienização adequada das mãos e dos dispositivos invasivos antes e após a manipulação dos pacientes para minimizar a ocorrência de infecções por esta espécie (SOARES et al., 2013). Os isolados identificados fenotipicamente como *C. parapsilosis* podem ser diferenciados através de métodos moleculares em *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. methapsilosis* (TAVANTI et al., 2005).

*C. tropicalis* pode ser encontrada tanto no ambiente quanto na microbiota de seres humanos, entretanto seu mecanismo de transmissão é essencialmente endógeno e cerca de 50% dos pacientes colonizados desenvolvem infecções sistêmicas por *C. tropicalis*. Esta espécie está relacionada aos casos de candidíase invasiva em pacientes neutropênicos, neoplásicos e transplantados, sendo raros os relatos de infecções em neonatos (COLOMBO; GUIMARÃES 2003; ROILIDES, 2011).

*C. glabrata* é um importante patógeno em ambiente hospitalar por ser a terceira espécie de *Candida* mais isolada de candidemia e por apresentar altas taxas de mortalidade em virtude da dificuldade em tratar infecções desencadeadas por essa espécie, já que isolados de *C. glabrata* apresentam susceptibilidade reduzida ao fluconazol e anfotericina B e uma porcentagem importante é resistente ao itraconazol (PFALLER; DIEKEMA, 2007). Casos de infecções por *C. glabrata* em neonatos ainda são raros, sendo mais comum seu isolamento em adultos em uso prolongado de antimicrobianos e ventilação mecânica. A porcentagem de isolamento desta espécie varia de acordo com a região geográfica, e para alguns autores, o aumento de infecções por *C. glabrata* pode estar relacionado com o uso profilático do fluconazol em pacientes transplantados e com patologias hematológicas (MALANI et al., 2010).

*C. krusei* é responsável por até 3% dos casos de candidíases invasivas, acometendo principalmente pacientes idosos, indivíduos transplantados de medula óssea ou portadores de neoplasias malignas, sendo rara a ocorrência de sepse por esta espécie em RN (BONATTI et al., 2009). Entretanto, em um hospital terciário no Brasil foi relatado três casos de candidemia por *C. krusei* em uma UTIN (AMARAL-LOPES; MOURA, 2012). Infecções por *C. krusei* são preocupantes devido a resistência intrínseca dessa ao fluconazol (PORTE et al., 2012; SILVA, 2015).

*C. famata* é uma levedura que foi isolada de diversas fontes como: pombos, tetas de vaca, sendo encontrada com maior frequência em alimentos como queijos (SANCHEZ BETANCOURT et al., 2016). São raros os relatos de infecções desencadeadas por essa, mas a

literatura mostra que são acometidos com maior frequência pacientes renais crônicos e crianças com neoplasias, com raro isolamento em infecções invasivas bem como da microbiota de indivíduos saudáveis (BEYDA et al., 2013). Entretanto, já houve relatos de isolamento em infecções de RNPT MBP em UTIN (RATURI et al., 2015).

*C. guilliermondii* pode fazer parte da microbiota da pele e de mucosas de indivíduos saudáveis, sendo raramente relacionada a casos de candidíase invasiva e, por isso, pouco se sabe sobre sua patogenia. Entretanto, estudos têm relatado que os grupos de pacientes mais acometidos por esta espécie são os imunodeprimidos e pacientes pediátricos (TSENG et al., 2017).

*C. lusitaniae* é considerado um patógeno oportunista emergente, responsável por 1 a 2% dos casos de candidemia (SANCHIS et al., 2016). Alguns estudos relatam que, *in vitro*, *C. lusitaniae* mostrou-se susceptível as principais classes de antifúngicos (LOCKHART et al., 2012; SANCHIS et al., 2016). Entretanto, apesar de ser um patógeno relativamente novo, há relatos de isolados resistentes ao fluconazol bem como isolados clínicos mostraram-se capazes de desenvolver resistência a anfotericina B e caspofungina durante o processo terapêutico (LOCKHART et al., 2012; SANCHIS et al., 2016).

## **2.6 Diagnóstico de candidíase invasiva e identificação das espécies**

O diagnóstico de sepse em RN críticos, incluindo candidemia, é complexo, uma vez que os sinais clínicos são mínimos e inespecíficos, podendo ser confundidos com outras patologias, como por exemplo: hipoglicemia, hipotermia, dificuldade respiratória e doenças cardíacas. Além disso, os marcadores laboratoriais atuais de sepse não são específicos. Assim, para um diagnóstico rápido e mais preciso, o neonatologista precisa de uma combinação de variáveis clínicas, laboratoriais e particularidades do RN (BENTLIN et al., 2014).

Para que um RN seja diagnosticado clinicamente com sepse é preciso à identificação de pelo menos um dos sinais e sintomas apresentados a seguir sem causa reconhecida: instabilidade térmica, apnéia, bradicardia, intolerância alimentar, piora do desconforto respiratório, intolerância à glicose, instabilidade hemodinâmica e hipoatividade/letargia, associado aos critérios laboratoriais: hemograma apresentando mais de três parâmetros alterados (critérios de Rodwell) e/ou Proteína C Reativa quantitativa alterada, hemocultura não realizada ou negativa, ausência de evidência de infecção em outro sítio e terapia

antimicrobiana instituída e mantida pelo médico assistente (ANVISA, 2013; TSAI et al., 2016).

A hemocultura é o padrão ouro no diagnóstico de sepse e, graças a evolução da medicina laboratorial, já é possível ter um indício do micro-organismo responsável pelo processo infeccioso poucas horas após a coleta do material. Porém, o resultado final do exame ainda leva um tempo maior para ser liberado, e essa condição atrelada a complexidade e gravidade do RN, na maioria dos casos, faz com que o neonatologista inicie o tratamento do RN antes mesmo do resultado da hemocultura, optando, na sua grande maioria, por antimicrobianos de amplo espectro, os quais geralmente apresentam maiores riscos de toxicidade, (CARVALHO, 2012).

O resultado da hemocultura, o médico neonatologista necessita saber qual a espécie responsável pela infecção para a escolha da terapia mais adequada. A identificação de espécies fúngicas, em especial de *Candida*, baseia-se em testes fenotípicos, podendo também ser utilizados testes genotípicos para diferenciação de espécies fenotipicamente iguais e para rastreio da origem do foco infeccioso e detecção de infecção cruzada (CANDIDO; AZEVEDO; KOMEZU, 2000).

Os métodos fenotípicos de tipagem de leveduras têm como base principal a análise do perfil morfológico e bioquímico desses micro-organismos (CANDIDO; AZEVEDO; KOMEZU, 2000). Dentre estes estão a pesquisa da atividade das exoenzimas aspartilproteinase e fosfolipases, e recentemente de hemolisina e DNase, a morfotipagem e a antifungotipagem (COSTA et al., 2009). Entretanto, as técnicas bioquímicas não são suficientes para avaliar de forma consistente a relação entre isolados de mesma espécie (MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014). Os métodos moleculares geralmente são mais sensíveis, e muitas vezes mais rápidos, apesar de exigirem equipamentos e suportes mais sofisticados do laboratório (SOLL, 2000).

Já os testes genotípicos são indicados em estudos de ocorrências de surtos de infecções por um determinado micro-organismo, nos quais é indicada a análise tanto do agente infeccioso quanto de isolados do ambiente em que ocorreu o surto e das mãos dos profissionais que tiveram contato com os pacientes. O objetivo deste teste é verificar se os isolados de locais diferentes podem ser considerados os mesmos e de esclarecer o que deu origem ao surto para que sejam tomadas medidas de eliminação e impedir a propagação do micro-organismo infeccioso (MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014). Dentre os métodos de



tipagem molecular que tem sido utilizados, destacam-se os que avaliam DNA *fingerprinting*, a eletroforese de enzima multilocus (MLEE), cariotipagem eletroforética (EK), DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD), polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) com e sem hibridação, a análise com enzima de restrição (REA) e microsatélite ou sequência simples repetida (SSR) (BACELO et al., 2010).

## **2.7 Fatores de virulência**

Geralmente, para a instalação do micro-organismo e do processo infeccioso é necessário que haja um desequilíbrio na relação parasito-hospedeiro. Alguns mecanismos que conferem ‘vantagens’ para os micro-organismos nesta relação são conhecidos como fatores de virulência. Estes fatores permitem não só a manutenção do processo de colonização como também a instalação da infecção, ao promoverem o escape dos micro-organismos da ação dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Dentre os fatores de virulência expressos por leveduras do gênero *Candida* estão: capacidade de adesão, polimorfismo, produção de exoenzimas e formação de biofilme (SENEVIRATNE et al., 2016).

A expressão e intensidade destes fatores variam conforme a espécie, o sítio de localização no hospedeiro (mucosas, pele), tipo e gravidade do processo infeccioso bem como com o estado imunológico do hospedeiro (LAHKAR et al., 2017).

### **2.7.1 Produção de exoenzimas**

A expressão de exoenzimas por leveduras do gênero *Candida* tem sido alvo de diversas pesquisas com intuito de compreender o papel dessas enzimas como um fator de virulência, como e em quais condições elas são produzidas e como elas podem influenciar no processo de instalação e manutenção do processo infeccioso.

A produção de proteinases e fosfolipases correspondem à maioria das pesquisas. Entretanto, tem-se observado um interesse também no estudo de hemolisinas e, mais recentemente DNase (desoxirribonuclease) (MENEZES, 2014).

A enzima proteinase atua na instalação e sobrevivência da levedura, ao promover a quebra de proteínas como imunoglobulinas e citosinas e capacidade de adesão e destruição

das células do hospedeiro (LAHKAR et al., 2017; PORTELA et al., 2017). Os genes relacionados com a produção e expressão desta enzima pertencem a família SAP1 a SAP10, os quais são expressos de forma e intensidade diferentes de acordo com o sítio da infecção e com o estágio da mesma. Sabe-se que todas as espécies de *Candida* são capazes de expressar proteinase, mas *C. albicans* parecem secretá-las de forma mais acentuada (BASSYOUNI et al., 2015; LAHKAR et al., 2017).

As fosfolipases atuam no processo de hidrólise dos fosfolipídios, principal componente da membrana celular de mamíferos, além de poderem desencadear processo inflamatório mediado pelo ácido araquidônico (BASSYOUNI et al., 2015; LAHKAR et al., 2017; PORTELA et al., 2017). São conhecidos quatro tipos de fosfolipases, denominadas A, B, C, D, que diferem entre si quanto ao tipo da ligação éster que hidrolisam na molécula de fosfolipídio. Essas enzimas causam danos nas células do hospedeiro que resultam na liberação de lipídeos e substâncias importantes para seu desenvolvimento (BASSYOUNI et al., 2015).

A secreção de hemolisinas permite à levedura obter o ferro através da destruição das hemácias do hospedeiro facilitando a invasão das hifas e consequente manutenção e disseminação do processo infeccioso (FRANÇA; FURLANETO-MAIA; FURLANETO, 2017). A hemoglobina é importante para o processo de diferenciação da levedura, especialmente em isolados de *C. albicans* (FAVERO et al., 2013; FRANÇA; FURLANETO-MAIA; FURLANETO, 2017). A levedura produz hemolisinas, que compreendem dois tipos de hemólise: hemólise incompleta ou parcial e hemólise completa ou total (FAVERO et al., 2013; GIOLO e SVIDZINSKI, 2010).

A produção de DNase é descrita para alguns gêneros de bactérias como *Staphylococcus* spp., porém poucos estudos têm demonstrado a expressão desta enzima entre fungos, inclusive para espécies de *Candida*, sendo raros os relatos na literatura que tratam deste assunto (RICETO et al., 2015). A atividade extracelular de DNase por fungos, já foi descrita para isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, e discute-se o real envolvimento desta enzima na virulência (SÁNCHEZ; COLOM, 2010). Apesar de não saber ao certo como a DNase contribui no processo de instalação e/ou manutenção do micro-organismo no hospedeiro, acredita-se que ela dribla a ação dos neutrófilos ao promover a degradação do DNA (RICETO et al., 2015; ZHANG et al., 2017).

### 2.7.2 Formação de biofilme

Biofilme é definido como sendo uma comunidade microbiana, composta por uma matriz extracelular de polímeros e células aderidas a um substrato, interface ou umas as outras de modo irreversível. As células que compõe o biofilme apresentam transcrição genética e crescimento alterados quando comparados com as células (SANTANA et al., 2013).

A formação do biofilme pode ser observada tanto por espécies bacterianas quanto por espécies fúngicas, em especial leveduras, sendo comum a sua detecção na natureza (KUHN et al., 2002). Para a formação desta estrutura há, inicialmente, uma fixação das células microbianas nas superfícies (inanimadas ou não) seguida da divisão e proliferação celular e posterior formação da matriz extracelular (SILVA et al., 2010).

A capacidade de formar biofilme é considerada um importante fator de virulência, pois além de permitir a manutenção do processo infeccioso através da adesão às superfícies de dispositivos invasivos e/ou no hospedeiro, o biofilme também pode conferir uma redução na susceptibilidade ou mesmo resistência aos agentes antimicrobianos em virtude da matriz extracelular que dificulta a penetração destes no biofilme e impede os mesmos de atuarem nas células bacterianas e/ou fúngicas, além de impedir a ação dos mecanismos de defesa sobre os micro-organismos ali presentes (SANTANA et al., 2013). A resistência aos antimicrobianos, conferida pelo biofilme, é decorrente do *quorum sensing*, que promove contato célula-célula, permitindo a expressão de diversos fatores de virulência, imunomodulação pela comunidade microbiana, que resultam na neutralização da ação dos antimicrobianos (LI; TIAN, 2012).

A formação de biofilme já foi observada em diversas leveduras do gênero *Candida*, em especial *C. albicans* e *C. parapsilosis*, sendo que há variações na composição, formato e intensidade de expressão deste de acordo com a espécie e isso pode influenciar no grau de virulência da levedura. Além disso, infecções desencadeadas por isolados capazes de formarem essa estrutura são mais letais do que aquelas ocasionadas por leveduras não formadoras de biofilme, representando, portanto, um problema nosocomial importante (DOLAN et al., 2002; KOJIC; DAROUICHE, 2004).

O processo de síntese, bem como a composição do biofilme por espécies de *Candida* está relacionado à capacidade de morfogênese apresentada por cada espécie. Inicialmente, para adesão das leveduras ao substrato, seja de dispositivos ou do hospedeiro, é necessário que haja interações hidrofóbicas e eletrostáticas bem como a expressão de adesinas (SARDI et

al., 2013). Após esse processo, as leveduras começam o processo de maturação, marcado pela formação de hifas. O biofilme maduro tem como principal característica a presença da matriz extracelular (composta de carboidratos, proteínas, hexoaminas) de grande quantidade de hifas e poucas células leveduriformes. Passado a maturação, inicia-se a fase dispersão, marcada pela formação de células sésseis (SILVA et al., 2011).

*C. albicans* é a espécie que mais se sabe sobre a estrutura e composição do biofilme, o qual é caracterizado pela presença de uma fina camada de leveduras e uma camada mais grossa formada por hifas (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Já o biofilme formado por leveduras do complexo *C. parapsilosis* é grande parte composto por blastoconídeos, é mais fino e menor do que o de *C. albicans* (LATTIF et al., 2010). Além disso, em sua maioria, é expresso por leveduras que crescem em meios com altas concentrações de glicose e lipídios, e aderidas a dispositivos médicos compostos de plástico, justificando sua associação com infecções relacionadas ao uso de nutrição parenteral e dispositivos como CVC por um período prolongado (TROFA; GÁCSE; NOSANCHINK, 2008).

*C. tropicalis* é uma espécie capaz de formar biofilmes fortes, os quais são compostos por filamentos evidentes e por uma densa rede de leveduras. Sua matriz extracelular é em sua maioria composta por hexosamina, podendo ser destruída por lipases tipo IV, conforme Al-Fattani et al. (2006).

Apesar da presença da matriz extracelular na estrutura do biofilme, estudos *in vitro* revelaram que seu papel no processo de resistência aos antifúngicos é ilusório, pois a penetração no biofilme através dessa acontece livremente. Além disso, tanto estudos realizados sob agitação, no qual há intensa formação de matriz extracelular, quanto naqueles feitos de forma estática, com mínima formação de matriz, foi observada resistência semelhante (MUKHERJEE; CHANDRA, 2004). Assim, acredita-se que a resistência aos antifúngicos conferida pelo biofilme esteja relacionada à biomassa e não seja permanente (KUMAMOTO, 2002). Isso, porque como a comunidade microbiana da qual é composta o biofilme possui alterações na expressão de certos genes que podem refletir no fenótipo como, por exemplo, aumentando a quantidade de bombas de efluxo presentes na membrana plasmática, que promovem o bombeamento dos antifúngicos de dentro para fora da célula (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006). Outra condição que influencia diretamente na resistência aos antifúngicos é a composição da membrana plasmática das leveduras durante o

desenvolvimento e na fase madura do biofilme, a qual chega a ter até 50% a menos de ergosterol, que é o principal alvo dos azóis e poliênicos (MUKHERJEE; CHANDRA, 2004).

Devido à importância deste fator de virulência na instalação e desenvolvimento de candidíase invasiva, entender o funcionamento do mesmo e como ele impede a ação dos antifúngicos é fundamental. Desse modo, foram desenvolvidos vários métodos que permitem o estudo *in vitro* do biofilme, com a avaliação do crescimento, análise quantitativa e de ultra-estrutura do biofilme (SILVA, 2015).

Para a avaliação da formação do biofilme é possível utilizar placas de cultivo celular com 96 poços, nos quais há o estímulo para formação do mesmo, que permitem o processamento de um grande número de amostras simultaneamente. A análise quantitativa do crescimento pode ser feita utilizando métodos colorimétricos onde há a redução de sais de tetrazolium ou mediante incorporação de isótopos de leucina (HAWSER; DOUGLAS, 2003). Outra forma de realizar esta avaliação quantitativa é determinando a atividade respiratória do biofilme ou pela quantidade de ATP liberada após a ruptura celular (NIKAWA, 2003). Por fim, a quantidade de biofilme formada também pode ser obtida utilizando um leitor de microplacas que fornece a leitura da densidade óptica do biofilme (CARDOSO, 2004).

Com relação à análise da ultra-estrutura do biofilme, é possível utilizar a microscopia eletrônica de varredura (MEV) ou microscopia confocal laser de varredura (MCLV) para avaliação da sua morfologia (HAWSER; DOUGLAS, 2003).

## **2.8 Susceptibilidade aos antifúngicos**

Em consequência do aumento de casos de candidíases invasivas nos últimos anos, o uso de antifúngicos seja profilático ou no tratamento dessas infecções também aumentou de forma expressiva e, conseqüentemente, iniciou-se os relatos de pacientes que não respondiam à terapêutica utilizada, e posterior detecção de isolados resistentes (MOTTA et al., 2010). Assim, a realização de testes rápidos e eficazes, que avaliam a sensibilidade dos isolados fúngicos às principais drogas passou a ser crucial para a escolha e sucesso da terapia antifúngica.

As primeiras substâncias com ação antifúngica que começaram a ser utilizadas no início do século XX foram os metais pesados, sendo o Iodeto de Potássio o mais comum. Em

1950 os antifúngicos começaram a ser sintetizados em laboratório e os polienos foram a primeira classe desenvolvida. Atualmente há disponível para o tratamento de infecções fúngicas quatro classes de antifúngicos: azóis, polienos, equinocandinas, e análogos de nucleosídeos, número esse muito aquém quando comparado com a quantidade de agentes antibacterianos existentes. Polienos, azóis e equinocandinas são as classes mais utilizadas em UTIN (BENNETT et al., 2007).

Os compostos poliênicos foram isolados pela primeira vez em 1960 a partir do *Streptomyces nodosus* (GHANNOUM; RICE, 1999). Seu principal representante é a anfotericina B (desoxicolato e formas lipídicas) e geralmente é a escolha terapêutica na maioria dos casos de infecções fúngicas sistêmicas graves. Os polienos são considerados fungicidas, ou seja, promovem a morte celular, por causar a formação de poros na membrana plasmática da célula fúngica e, consequente extravasamento de íons sódio e potássio e outras moléculas necessárias para a manutenção da estabilidade da membrana, resultado da desorganização da estrutura da mesma provocada pela ligação específica entre a molécula do fármaco e o ergosterol da membrana. Apesar de ser um fármaco em uso há muitos anos, ainda são raros os relatos de isolados resistentes à anfotericina B. Entretanto, apesar de eficiente, sua administração deve ser cautelosa por ser nefrotóxico e devido às reações adversas relacionadas à sua infusão, como hipopotassemia, necrose hepática e supressão da medula óssea (SILVA, 2015).

A prescrição de anfotericina B para tratamento de micoses sistêmicas em neonatos tem aumentado nos últimos anos, apesar dos seus efeitos colaterais, como alternativa aos azóis (no caso de isolados resistentes) por ter uma meia vida de aproximadamente 15 horas e por apresentar uma ampla distribuição corporal (TESTONI, SMITH, BENJAMIN, 2012; SILVA, 2015). A dose recomendada em RN é de 0,5 a 1 mg / kg / dia e sua administração deve ser via endovenosa e ser mantida até a dosagem total ser atingida (SILVA, 2015).

São poucos os relatos de isolados resistentes à anfotericina B, sendo observado com maior frequência por isolados de *C. lusitanae* e *C. parapsilosis* (LOCKHART et al., 2012; SANCHIS et al., 2016). Estudos tem revelado *C. albicans* como a espécie mais susceptível à ação deste fármaco (SILVA, 2015). Uma pesquisa que avaliou 712 isolados de *Candida*, em 11 hospitais terciários no Brasil, não encontrou nenhum com resistência a este antifúngico (COLOMBO et al., 2006).

Já em relação aos azóis, o primeiro representante da classe, cetoconazol, foi desenvolvido na década de 1970, e hoje o azol mais prescrito no tratamento de candidíases invasivas é o fluconazol (MAERTENS, 2004). Os azóis são considerados fungistáticos, ou seja, atuam de forma a inibir o crescimento e, conseqüentemente, o processo de multiplicação dos fungos. Seu mecanismo de ação é baseado na inibição do processo de síntese do ergosterol, componente da membrana plasmática da célula fúngica, promovendo uma desestruturação e conseqüente inatividade desta membrana, resultando no impedimento do desenvolvimento celular (SILVA, 2015). Por atuar em uma via exclusiva das células fúngicas, são poucos os efeitos colaterais relacionados ao uso dos azóis, e por este motivo, geralmente é a primeira escolha no tratamento de candidíase orofaríngea e sistêmica, por exemplo, excetuando os casos quando essas são desencadeadas por micro-organismos que apresentam resistência intrínseca a essa classe, como é o caso de *C. krusei*. Além disso, o fluconazol tem sido administrado de modo profilático em neonatos graves de várias UTIN de forma eficaz, porém há considerações de que esta profilaxia possa colaborar para o surgimento de isolados resistentes, ou com susceptibilidade reduzida, em especial espécies de *Candida* não-*albicans* (MARRETO, 2014). Além disso, não se sabe ao certo as conseqüências desse uso no desenvolvimento neural e nas taxas de mortalidade em UTIN (SILVA, 2015).

O uso do fluconazol no tratamento de micoses sistêmicas em neonatos é seguro. Entretanto, alguns estudos realizados com *Candida* spp. isoladas de corrente sanguínea mostraram taxas de resistência ao fluconazol variando de 25,3% a 35% (BALLOT et al., 2013).

As equinocandinas correspondem a classe de antifúngicos mais recente disponível para o tratamento de infecções sistêmicas. Sua comercialização no Brasil iniciou na década de 2000 e tem como representantes, caspofungina, anidulafungina e micafungina, sendo esta última a recomendada para neonatos (PACETTI; GELONE, 2003). São considerados fungicidas e atuam inibindo a síntese de componentes da parede celular do fungo e no processo de crescimento celular, que reflete no desequilíbrio osmótico e seletividade da parede celular, resultando na lise e conseqüente morte da célula fúngica (ROCHA; SIDRIM, 2004). Por ter ação em uma estrutura específica da célula fúngica, os efeitos adversos relacionados ao uso das equinocandinas são mínimos (SILVA, 2015). É eficaz no tratamento de candidíases invasivas (incluindo isolados resistentes aos azóis) aspergilose e criptococose, sendo sua prescrição recomendada nos casos de falhas ou intolerância relacionadas ao uso de azóis ou anfotericina B. Por ser um antifúngico relativamente novo, os relatos de resistência

ainda são raríssimos, porém alguns estudos já demonstraram susceptibilidade reduzida por *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* (SILVA, 2015).

Por apresentar uma terapêutica eficaz, de fácil administração intravenosa (uma vez ao dia) e poucos efeitos colaterais, o uso das equinocandinas tem sido cada vez mais frequente no tratamento de micoses sistêmicas em pacientes críticos, apresentando até mesmo indicações para serem primeira escolha no tratamento dessas infecções, o que levanta o temor de surgimento de isolados resistentes. Apesar da sua eficácia, antifúngicos pertencentes a esta classe ainda apresentam um custo elevado, podendo chegar a 2.500 reais, condição essa que ainda freia o uso mais rotineiro dos mesmos (SILVA, 2015).

Com a disponibilidade de mais drogas antifúngicas, bem como com o aparecimento de isolados resistentes houve a necessidade do desenvolvimento de métodos que permitem avaliar, *in vitro*, a susceptibilidade dos isolados de infecção aos antifúngicos (ARIKAN, 2007). Entretanto, os critérios de interpretação dos resultados e os pontos de cortes para cada antifúngico ainda não estão totalmente padronizados. A primeira padronização do antifungigrama foi proposta em 1992 pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). O documento M27-S4, publicado em 2012, contem as alterações mais recentes na metodologia bem como na interpretação de resultados para alguns antifúngicos de acordo com as principais espécies de *Candida*. Atualmente, existem pontos de corte padronizados para azóis como fluconazol e voriconazol, equinocandinas como micafungina e caspofungina. No entanto, para a anfotericina B ainda não há uma definição com relação a isso para cada espécie (CLSI, 2012).

Os métodos de referência mais atuais propostos pelo CLSI são microdiluição e difusão do disco (CLSI, 2012). O método de microdiluição, que utiliza microplacas, permite a avaliação da susceptibilidade a diferentes concentrações dos antifúngicos, e por isso é considerado mais vantajoso. Já o método de disco difusão apresenta como principal vantagem a fácil execução da metodologia e a similaridade com o antibiograma realizado para as bactérias, inclusive utilizando o mesmo meio de cultura, Mueller-Hinton.



### 3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Como a assistência materno-infantil no Brasil é usualmente precária, e as maternidades de hospitais públicos estão com uma demanda acima de suas capacidades, a situação da população de neonatos hospitalizados em UTIN é extremamente grave. Além disso, como os profissionais de saúde trabalham em condições muitas vezes inadequadas, o risco de infecções hospitalares com taxas significativas de morbimortalidade é elevado. Infecções nosocomiais desencadeadas por leveduras do gênero *Candida* estão se tornando cada vez mais frequentes, colocando em risco a saúde e desenvolvimento de neonatos críticos em função de sua maior suscetibilidade resultantes da imaturidade imunológica e por requererem cateteres vasculares para administração de alimento e medicamentos. É importante lembrar que a pele do neonato é mais permeável aos micro-organismos sendo uma verdadeira “porta de entrada” para os patógenos hospitalares.

Apesar da grande importância, há ainda poucos relatos na literatura a respeito da epidemiologia de infecções relacionadas e associadas a diferentes tipos de acessos centrais em neonatos críticos.

#### 3.1 Objetivo geral

Verificar a taxa de infecções bacterianas e fúngicas na UTIN do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, bem como caracterizar fenotipicamente isolados de *Candida* spp. provenientes das mãos dos profissionais de saúde dessa unidade.

#### 3.2 Objetivos específicos

- 1) Fazer a Vigilância Epidemiológica da UTIN, pelo sistema NHSN, nos anos de 2015 e 2016, analisar e comparar os resultados obtidos com os dados da vigilância realizada nos anos de 2013 e 2014;
- 2) Descrever a tendência temporal, os fatores de risco e desfecho de infecções invasivas na UTIN do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, enfatizando as diferenças entre infecções bacterianas e fúngicas;
- 3) Verificar as espécies de *Candida* responsáveis pelos casos de candidíase invasiva e candidemia dos neonatos internados na UTIN durante o período do estudo;

- 4) Investigar a presença da *Candida* spp. nas mãos dos profissionais de saúde em contato direto com o neonato;
- 5) Caracterizar fenotipicamente os isolados de *Candida* spp. provenientes das mãos dos profissionais de saúde da UTIN através da pesquisa da produção das exoenzimas hemolisina e DNase e da capacidade de produção de biofilme;
- 6) Determinar a sensibilidade dos isolados de *Candida* spp. obtidos das amostras das mãos dos profissionais da unidade aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e micafungina pela metodologia de microdiluição em caldo;
- 7) Diferenciar os isolados identificados através dos testes fenotípicos como *C. albicans* em *C. albicans* e *C. dubliniensis*, assim como aqueles isolados identificados como *C. parapsilosis* em *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, utilizando testes moleculares.

#### 4 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados na forma de dois artigos, cujos títulos e revistas às quais foram submetidos estão listados a seguir:

**1º Tendências temporais, fatores de risco e desfechos de infecções nosocomiais: estudo epidemiológico em unidade de terapia intensiva neonatal.**

Submetido à Revista The Journal of Infection – Qualis A2.

**2º Presença de *Candida* spp. nas mãos de profissionais de saúde: virulência e resistência antifúngica.**

Submetido à Revista Medical Mycology – Qualis B1.

## 4.1 Artigo 1

### **Tendências temporais, fatores de risco e desfechos de infecções nosocomiais: estudo epidemiológico em unidade de terapia intensiva neonatal**

RALCIANE DE PAULA MENEZES<sup>1,2</sup>, FELIPE FLÁVIO SILVA<sup>3</sup>, SÁVIA GONÇALVES OLIVEIRA MELO<sup>3</sup>, MURILO BRITO DE OLIVEIRA<sup>4</sup>, MELIZA ARANTES BESSA<sup>5</sup> LÚCIO BORGES ARAÚJO<sup>6</sup>, MARIO PAULO AMANTE PENATTI<sup>1</sup>, REGINALDO DOS SANTOS PEDROSO<sup>1,2</sup>, VÂNIA OLIVETTI STEFFEN ABDALLAH<sup>2</sup>, DENISE VON DOLINGER DE BRITO RÖDER<sup>2,7</sup>

<sup>1</sup>Escola Técnica de Saúde - ESTES, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brasil

<sup>2</sup>Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina – FAMED, UFU, Uberlândia, MG, Brasil

<sup>3</sup>Graduação em Enfermagem, FAMED, UFU, Uberlândia, MG

<sup>4</sup>Graduação em Gestão em Saúde Ambiental – Instituto de Geografia (IG), UFU, Uberlândia, MG, Brasil

<sup>5</sup>Graduação em Biologia – Instituto de Biologia (INBIO), UFU, Uberlândia, MG, Brasil

<sup>6</sup>Faculdade de Matemática – FAMAT, UFU, Uberlândia, MG, Brasil

<sup>7</sup>Instituto de Ciências Biomédicas – ICBIM, UFU, Uberlândia, MG, Brasil

## **Resumo**

Associado ao aumento da sobrevivência de neonatos prematuros admitidos em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) está o aumento de infecções invasivas que podem culminar no óbito. O objetivo deste estudo foi descrever a tendência temporal, os fatores de risco e desfecho de infecções invasivas em uma UTIN de um hospital de alta complexidade, enfatizando as diferenças entre infecções bacterianas e fúngicas. O estudo foi realizado entre janeiro de 2013 e dezembro de 2016, com acompanhamento diário dos neonatos pelo sistema NHSN, sendo coletadas informações como idade gestacional (IG), peso ao nascer, uso de dispositivos invasivos e de antimicrobianos, ocorrência de infecções e tempo de internação. Dos 881 neonatos, em 214 (24,2%) foi constatado infecção por bactérias, 19 (2,1%) por

fungos e em 12 (1,4%) neonatos foi confirmada infecção bacteriana e fúngica associadas, resultando em uma taxa de infecção hospitalar igual a 12/1000 pacientes-dia. IG, peso, SNAPE>24 e uso de dispositivos como cateteres, ventilação mecânica e nutrição parenteral foram estatisticamente significativos para ocorrência de infecções bacterianas e fúngicas. O óbito foi 2.6 vezes maior naqueles neonatos com infecção fúngica, em relação aqueles com infecção bacteriana. Ocorrência de infecções invasivas foi mais acentuada em 2015 e 2016, período no qual bactérias Gram negativas e leveduras foram mais frequentes, impactando na morbimortalidade. Esses resultados ressaltam a importância da vigilância epidemiológica constante e de medidas de controle efetivo de infecções na unidade.

**Palavras-chave:** UTIN, neonatos, vigilância epidemiológica, infecções bacterianas, infecções fúngicas

## Introdução

A sobrevivência de recém-nascidos (RN) prematuros nos últimos anos teve um aumento considerável em virtude dos avanços e emprego da tecnologia na medicina, que permitiram a manutenção do RN em ambiente hospitalar até que o mesmo complete o seu desenvolvimento e maturação de órgãos e sistemas<sup>1</sup>. No entanto, neonatos nestas condições geralmente apresentam estado de saúde grave e, por isso, ficam semanas e até mesmo meses em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) até estarem aptos para receberem alta hospitalar. Durante este período, fazem uso de vários dispositivos invasivos que auxiliam na manutenção das funções vitais e permitem a administração de nutrição e medicamentos. A permanência prolongada dos mesmos em ambiente hospitalar, aliado aos diversos procedimentos invasivos aos quais são submetidos, e ao sistema imune imaturo, podem propiciar a instalação e desenvolvimento de infecções nosocomiais (IN) por bactérias e fungos, que podem ser graves e levar o paciente ao óbito<sup>2-6</sup>.

Bactérias Gram positivas são as principais responsáveis pela ocorrência de sepse em países desenvolvidos, com destaque para *Staphylococcus* coagulase negativa (SCON), sendo *S. epidermidis* o mais frequente<sup>7</sup>. Porém, a ocorrência de infecções invasivas em RN por bactérias Gram negativas e fungos, em especial *Candida* spp., teve um aumento considerável nas últimas décadas<sup>6,8,9</sup>. Infecções por esses agentes elevam os custos de hospitalização dos pacientes, além de estarem relacionadas com maiores taxas de mortalidade, podendo chegar a 50% quando ocasionadas por Gram negativos e 34% quando desencadeadas por fungos<sup>10,11</sup>, e

podem contribuir com o maior número de neonatos que ficam com sequelas neurodegenerativas<sup>9,12</sup>.

Sistemas de vigilância, a exemplo do *National Healthcare Safety Network* (NHSN) que permite o acompanhamento contínuo e diário de pacientes de UTIN são de grande relevância, pois permitem conhecer o perfil dos pacientes admitidos na unidade, as síndromes infecciosas, os agentes etiológicos de maior ocorrência, além de avaliar quais dispositivos estão associados à ocorrência de infecções ao longo dos anos e detectar intercorrências que possam comprometer o bom funcionamento da unidade<sup>13</sup>. Entretanto, apesar da importância dessa vigilância diária, poucos países realizam esse acompanhamento de forma efetiva em UTIN, sendo mais comum em países desenvolvidos<sup>5</sup>. O objetivo deste estudo foi descrever a tendência temporal, os fatores de risco e desfecho de infecções em uma UTIN de um hospital de alta complexidade, enfatizando as diferenças entre infecções bacterianas e fúngicas.

## **Material e Métodos**

O estudo foi realizado na UTIN de um hospital público, de atendimento terciário, referência na região, que possui 520 leitos, dos quais 15 pertencem a UTIN.

Foram incluídos no estudo todos os neonatos admitidos na unidade por mais de 24 horas entre janeiro de 2013 e dezembro de 2016, com participação confidencial. Todos RN presentes na UTIN foram acompanhados diariamente, desde a admissão até a alta ou óbito, seguindo o sistema NHSN para coleta de dados epidemiológicos<sup>14</sup>. Foram coletados dados como idade gestacional, peso ao nascer, Apgar 5', SNAPPE II, uso de dispositivos invasivos como: tipos de cateter venoso central (cateter central de inserção periférica - PICC, cateter venoso umbilical - CUV, dissecação venosa - flebotomia, intracath) nutrição parenteral, ventilação mecânica, dentre outros), uso prévio de antimicrobianos, tempo de internação. Além disso, os RN foram avaliados quanto ao tempo de uso de dispositivos invasivos para cálculo da taxa de uso de cada um, sendo feita a relação entre desenvolvimento de infecção e dias de exposição a cada dispositivo. Os RN foram agrupados em cinco categorias de acordo com o peso apresentado ao nascer: < 750g, 751-1000g, 1001-1500g, 1501-2500g e > 2500g.

Os casos de IN foram determinados utilizando as definições do Centro de Controle de Doenças (CDC)<sup>15</sup>. Dados como pacientes-dia, dias de uso de dispositivos invasivos como cateter venoso central (CVC), ventilação mecânica, nutrição parenteral, sonda gástrica, dreno

e traqueostomia foram coletados. A incidência de IN e as taxas de IN associadas ao uso de dispositivos invasivos (número de IN associadas ao dispositivo por 1.000 dispositivos-dias) foram calculadas. Além disso, as taxas de incidência de IN clinicamente diagnosticadas e microbiologicamente confirmadas foram calculadas.

As amostras biológicas de sítios orgânicos estéreis como sangue e líquido cefalorraquidiano, bem como aquelas de outros sítios como secreção ocular e urina, para realização da análise microbiológica, foram coletadas com base em critérios clínicos estabelecidos pela equipe médica. O isolamento primário do micro-organismo foi feito no sistema Bactec, no caso das amostras de corrente sanguínea, e em placas com ágar específicos para bactérias Gram positivas, negativas e fungos. A identificação em nível de espécie bem como o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foram realizados utilizando o sistema automatizado Vitek® Biomérieux. Os dados microbiológicos foram obtidos do setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU. Foram excluídas do estudo apenas culturas positivas para micro-organismos que geralmente são considerados contaminantes (por exemplo: *Corynebacterium* sp., *Bacillus* sp., *Micrococcus*).

Foi utilizado como grupo controle deste estudo os neonatos admitidos na UTIN durante o período de estudo e que não apresentaram nenhum episódio de infecção durante o tempo que ficaram internados na unidade.

### ***Análise estatística***

As variáveis quantitativas foram descritas através de média, mediana, desvio padrão máximo e mínimo. As variáveis qualitativas foram descritas (frequência e porcentagem) por meio de tabelas de dupla entrada e gráficos. Os fatores de risco para infecção bacteriana e fúngica nos neonatos foram avaliados pela regressão logística univariada e pela regressão logística múltipla seguida da seleção de variáveis pelo método stepwise<sup>16</sup>. A comparação do número de micro-organismos isolados de infecção nos RN internados ao longo dos anos foi feita utilizando o teste de comparação múltipla com correção de Bonferroni<sup>17</sup>. Todos os testes foram aplicados utilizando um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) e as análises foram realizadas utilizando o programa SPSS v.20.

### ***Comitê de Ética***

O estudo foi realizado após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (CEP-UFU), com parecer número 989.139/2015.

### **Resultados**

Entre janeiro de 2013 e dezembro de 2016 foram admitidos 881 neonatos na UTIN do HC-UFU, tendo sido registrado um total de 18310 pacientes-dias. Do total de RN incluídos no estudo, 53,9% eram do sexo masculino e 56,4% nasceram com idade gestacional igual ou menor a 34 semanas. A maior parte (34,6%) foi considerada de baixo peso ao nascer (1500-2499g) e 18,2% foram considerados de extremo baixo peso (<1000g). O principal motivo para internação desses neonatos na unidade foi o peso abaixo de 1500g (32,8%), seguido de problemas respiratórios (31,5%). Do total de RN, 73,7% ficaram mais de sete dias internados na UTIN.

Dos 881 pacientes, 221 (25%) apresentaram algum tipo de infecção, sendo que em 214 (96,8%) foi constatada infecção por bactérias, 19 (8,6%) por fungos e em 12 (5,4%) neonatos foi confirmada infecção bacteriana e fúngica associadas, resultando em uma taxa de infecção hospitalar igual a 12/1000 pacientes-dia. A taxa de infecção bacteriana/1000 pacientes dia foi de 11,6, ao passo que a taxa de infecção fúngica por 1000 pacientes dia foi igual a um. A infecção mais comum foi sepse (63,8%), seguida de conjuntivite (29,8%) e infecção do trato urinário (6,7%). Infecções em outros sítios anatômicos corresponderam a 5,4% do total de infecções confirmadas no período de estudo. Em 46 (20,8% do total de RN com infecção) neonatos foi confirmada infecção em dois ou mais sítios anatômicos.

A densidade de utilização (DU) de dispositivos considerados de risco para ocorrência de infecção invasiva foi igual a 0,48 para PICC, 0,09 para CUV, 0,02 para flebotomia, intracath e dreno, 0,22 para ventilação mecânica, 0,015 para sonda vesical, 0,003 para traqueostomia e 0,35 para nutrição parenteral. Já a DU dos dispositivos naqueles RN que desenvolveram infecção bacteriana ou fúngica foi de, respectivamente, 0,23 e 0,03 para PICC, 0,03 para CUV, 0,01 e 0,006 para flebotomia, 0,01 e 0,002 para intracath, 0,01 e 0,001 para dreno, 0,16 e 0,02 para nutrição parenteral, 0,11 e 0,02 para ventilação mecânica, 0,008 e 0,0004 para sonda vesical, 0,001 e 0,0004 para traqueostomia.



As taxas de uso destes dispositivos relacionados à infecção/pacientes dias foram de 18,5 para CUV, 4,13 para PICC, 5,1 para uso de nutrição parenteral e 6,1 para o uso de ventilação mecânica.

A tabela 1 mostra os fatores de risco para infecção bacteriana e evolução dos neonatos internados no período do estudo. Foram considerados fatores de risco estatisticamente significativos para ocorrência de infecção bacteriana: IG média, peso médio ao nascer, SNAPPE II >24, uso e DU de flebotomia, intracath, PICC, CUV, nutrição parenteral, de ventilação mecânica, dreno, sonda vesical, além do tempo de internação médio. O tempo de uso dos dispositivos invasivos foi em média três vezes maior no grupo com infecção bacteriana quando comparado com o grupo de neonatos sem infecção. O tempo de internação dos RN com infecção bacteriana foi duas vezes maior que o grupo sem infecção. Uso de CUV ( $P = 0,0216$ ) e a densidade de utilização de PICC ( $P = 0,0009$ ) foram fatores de risco independentes para o desenvolvimento de infecção por bactérias.

**Tabela 1**– Fatores de risco para aquisição de infecção bacteriana e evolução dos neonatos internados entre 2013-2016

	Sem infecção (660)	Com infecção (214)	p valor	Modelo Univariado			p valor	Modelo Multivariado		
				OR	OR (95%CI)			OR	OR (95%CI)	
					Menor	Maior			Menor	Maior
IG média	33 semanas	32,8 semanas	0,0239*	0,99	0,99	1,00	-	-	-	-
Peso médio	1943,12 gramas	1769,1gramas	0,0173*	1,00	1,00	1,00	-	-	-	-
Apgar5min <7	75 (11,3%)	23 (10,8%)	0,3188	0,95	0,87	1,05	-	-	-	-
Snappe II>24	146 (22,1%)	85 (38%)	0,0019*	1,01	1,004	1,019	-	-	-	-
Flebotomia	15(2,3%)	11 (5,1%)	0,0493*	2,19	1,0	4,80	-	-	-	-
DU Flebotomia	0,008	0,01	0,0101*	1,05	1,01	1,09	-	-	-	-
Intracath	20 (3%)	17 (8%)	0,0026*	2,78	1,43	5,42	-	-	-	-
DU Intracath	0,01	0,01	0,0003*	1,09	1,04	1,14	-	-	-	-
PICC	351 (53,2%)	181 (84,5%)	0,000*	4,76	3,19	7,11	-	-	-	-
DU PICC	0,23	0,23	0,000*	1,08	1,07	1,10	0,0009*	1,03	1,01	1,05
CUV	240 (36,7%)	106 (49,5%)	0,0008*	1,70	1,25	2,33	0,0216*	0,60	0,38	0,93
DU CUV	0,06	0,03	0,000*	1,11	1,06	1,17	-	-	-	-
Nutrição parenteral	281(42,6%)	159 (74,3%)	0,000*	3,85	2,74	5,43	-	-	-	-
DU nutrição parenteral	0,17	0,16	0,000*	1,09	1,07	1,10	-	-	-	-
Ventilação mecânica	266 (40,3%)	138 (64,5%)	0,000*	2,66	1,93	3,66	-	-	-	-
DU ventilação mecânica	0,09	0,11	0,000*	1,07	1,05	1,08	-	-	-	-
Dreno	28 (4,2%)	26 (12,1%)	0,0001*	3,15	1,80	5,50	-	-	-	-
DU Dreno	0,011	0,001	0,0014*	1,09	1,03	1,14	-	-	-	-
Sonda vesical	31 (4,7%)	23 (10,7%)	0,0024*	2,38	1,36	4,17	-	-	-	-
DU Sonda vesical	0,006	0,008	0,0020*	1,17	1,06	1,29	-	-	-	-
Sonda gástrica	587 (88,9%)	200 (93,4%)	0,0694	1,73	0,96	3,14	-	-	-	-
DU Sonda gástrica	0,42	0,35	0,000*	1,06	1,05	1,07	-	-	-	-
Traqueostomia	3 (0,45%)	2 (0,9%)	0,4236	2,08	0,35	12,54	-	-	-	-
DU Traqueostomia	0,001	0,001	0,3427	1,05	0,95	1,15	-	-	-	-
Tempo de internação médio – dias (DP)	15,88(14,57)	35,24(23,42)	0,000*	1,06	1,05	1,07	-	-	-	-
Óbito	60 (9%)	26 (12,1%)	0,1524	1,43	0,88	2,35	-	-	-	-

**Nota:** OR: odds ratio; IG: idade gestacional, DU: densidade de utilização = nº de CVC-dias/nº de pacientes-dias; DP: desvio padrão. \*p< 0,05.

A idade gestacional média dos neonatos com infecção fúngica foi de 29 semanas e a média de peso destes foi igual a 1408,53 gramas, sendo que 52,6% (10) nasceram com peso inferior a 1000 gramas. Foram considerados fatores de risco estatisticamente significativos para ocorrência de infecção fúngica a IG média, peso, SNAPPE II >24, DU de flebotomia, intracath, CUV, dreno, sonda gástrica, uso de DU de PICC, nutrição parenteral, ventilação mecânica, de traqueostomia, tempo de internação, além do uso de três ou mais antimicrobianos e tempo de antimicrobianoterapia. Aqueles pacientes em uso de PICC, traqueostomia e de três ou mais classes de antimicrobianos apresentaram 11 vezes mais risco de adquirir infecção fúngica. Adicionalmente, neonatos em uso de nutrição parenteral, ventilação mecânica e dreno estavam cerca de seis vezes mais expostos ao risco de infecções fúngicas em relação àqueles que não utilizaram esses dispositivos.

O tempo de uso de dispositivos invasivos que podem ser considerados de risco para desenvolvimento de infecção por fungos foi em média cinco vezes maior em relação ao grupo de neonatos sem infecção. O tempo de internação dos RN com infecção fúngica foi três vezes maior que o grupo sem infecção. A análise multivariada mostrou que o tempo de internação médio ( $P = 0,0037$ ) e óbito ( $P = 0,0036$ ) foram estatisticamente maiores no grupo de RN com infecção fúngica (Tabela 2).

**Tabela 2** –Fatores de risco para aquisição de infecção fúngica e evolução dos neonatos internados entre 2013-2016

	Sem infecção (660)	Com infecção (19)	p valor	Modelo Univariado			Modelo Multivariado			
				OR	OR (95%CI)		p valor	OR	OR (95%CI)	
					Menor	Maior			Menor	Maior
IG média	33 semanas	29 semanas	0,0038*	0,98	0,96	0,99	-	-	-	-
Peso médio	1943,12 gramas	1408,53 gramas	0,0212*	0,9992	0,9986	0,9999	-	-	-	-
Apgar5min <7	75 (11,3%)	2(10,5%)	0,4584	0,91	0,70	1,17	-	-	-	-
Snappe II>24	146 (22,1%)	13 (68,4%)	0,0014*	1,03	1,01	1,05	-	-	-	-
Flebotomia	15(2,3%)	2 (10,5%)	0,0778	3,92	0,86	17,89	-	-	-	-
DU Flebotomia	0,008	0,006	0,003*	1,07	1,02	1,12	-	-	-	-
Intracath	20 (3%)	1 (5,2%)	0,8184	1,27	0,17	9,78	-	-	-	-
DU Intracath	0,01	0,002	0,0441*	1,06	1,00	1,13	-	-	-	-
PICC	351 (53,2%)	18 (94,7%)	0,0164*	11,85	1,57	89,16	-	-	-	-
DU PICC	0,23	0,032	0,0000*	1,06	1,04	1,08	-	-	-	-
CUV	240 (36,7%)	11 (57,9%)	0,1099	2,12	0,84	5,32	-	-	-	-
DU CUV	0,06	0,003	0,0102*	1,16	1,04	1,29	-	-	-	-
Nutrição parenteral	281(42,6%)	16 (84,2%)	0,0077*	5,40	1,56	18,65	-	-	-	-
DU Dias de nutrição parenteral	0,17	0,02	0,000*	1,06	1,04	1,09	-	-	-	-
Ventilação mecânica	266 (40,3%)	16 (84,2%)	0,0035*	6,35	1,84	21,96	-	-	-	-
DU Dias de ventilação mecânica	0,09	0,02	0,000*	1,06	1,04	1,08	-	-	-	-
Dreno	28 (4,2%)	5 (26,3%)	0,0008*	6,17	2,13	17,86	-	-	-	-
DU Dreno	0,011	0,001	0,5616	1,02	0,95	1,10	-	-	-	-
Sonda vesical	31 (4,7%)	1 (5,2%)	0,8709	0,84	0,11	6,45	-	-	-	-
DU Sonda vesical	0,006	0,0004	0,8175	1,02	0,83	1,26	-	-	-	-
Sonda gástrica	587 (88,9%)	19 (100%)	0,9891	1,00	-	-	-	-	-	-
DU Sonda gástrica	0,42	0,04	0,000*	1,05	1,03	1,07	-	-	-	-
Traqueostomia	3 (0,45%)	1 (5,2%)	0,0304*	11,88	1,26	11,60	-	-	-	-
DU Traqueostomia	0,001	0,0004	0,3035	1,07	0,94	1,23	-	-	-	-
Tempo de internação médio	15,88	50,79	0,000*	1,04	1,03	1,06	0,0037*	10,24	2,13	49,27
Uso de antimicrobiano	268 (40,6%)	17 (89,5%)	0,005*	8,21	1,88	35,74	-	-	-	-
Uso de 3 ou mais antimicrobianos	58 (8,8%)	14 (73,7%)	0,000*	11,84	4,20	33,33	-	-	-	-
Tempo de uso de antimicrobiano	5.01(7,99)	19 (19,75)	0,000*	1,08	1,05	1,11	-	-	-	-
Óbito	60 (9%)	6 (31,6%)	0,0034*	4,42	1,63	11,96	0,0036*	1,14	1,04	1,24

**Nota:** OR: odds ratio; IG: idade gestacional, DU: densidade de utilização = nº de CVC-dias/nº de pacientes-dias. \*p< 0,05.

Entre 2013 e 2016 foram isolados 401 micro-organismos de neonatos internados na unidade, dos quais 145 (36,1%) foram apenas no ano de 2016 e o mais frequente foi o SCON, correspondendo a 41,3% do total de isolados. Cinquenta e oito por cento dos isolados foram bactérias Gam positivas, 37% foram bactérias Gram negativas e 5% leveduras (Tabela 3).

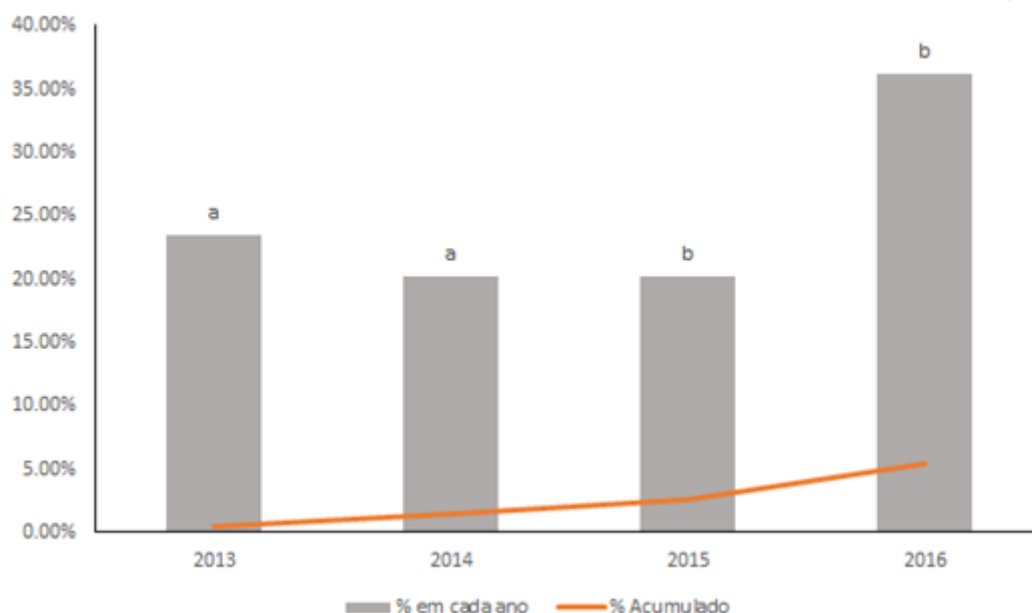
**Tabela 3**—Micro-organismos causadores de infecções invasivas em neonatos internados na UTIN do estudo nos anos de 2013 a 2016

Micro-organismos	2013		2014		2015		2016		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Streptococcus</i> sp.	2	2,1	1	1,3	1	1,3	2	1,4	6	1,6
SCON	41	43,5	37	45,5	38	46,7	49	33,8	165	41,3
<i>Staphylococcus aureus</i>	21	22,2	6	7,4	10	12,3	14	9,6	51	12,7
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	4,3	3	3,8	2	2,4	1	0,7	10	2,5
<i>Escherichia coli</i>	4	4,3	3	3,8	3	3,8	7	4,8	17	4,2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	3,2	1	1,3	3	3,8	15	10,3	22	5,5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0	0	0	0	0	1	0,7	1	0,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	5,3	15	18,5	1	1,3	19	13,1	40	10
<i>Serratia marcescens</i>	4	4,3	2	2,4	2	2,4	5	3,4	13	3,2
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	1,1	0	0	3	3,7	1	0,7	5	1,2
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	0	4	4,9	8	9,9	4	2,8	16	4,0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	0	0	0	0	0	1	0,7	1	0,2
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	5,3	2	2,4	1	1,3	6	4,1	14	3,5
<i>Citrobacter koseri</i>	0	0	1	1,3	0	0	0	0	1	0,2
Bactérias ESBL +*	0	0	0	0	1	1,3	8	5,5	9	2,2
Outras**	2	2,2	2	2,4	3	3,7	3	2,1	10	2,5
<i>Candida albicans</i>	1	1,1	2	2,4	4	4,8	4	2,8	11	2,8
<i>C. parapsilosis</i>	1	1,1	1	1,3	0	0	4	2,8	6	1,6
<i>C. guilliermondii</i>	0	0	0	0	0	0	1	0,7	1	0,2
<i>Trichosporon</i> sp.	0	0	1	1,3	1	1,3	0	0	2	0,4
<b>Total de isolados</b>	<b>94</b>	<b>23,5%</b>	<b>81</b>	<b>20,2%</b>	<b>81</b>	<b>20,2%</b>	<b>145</b>	<b>36,1%</b>	<b>401</b>	<b>100%</b>

**Nota:** \*espécies produtoras de ESBL: *Klebsiella pneumoniae* (8), *Escherichia coli* (1). \*\*outras espécies isoladas em 2013: *Staphylococcus lugdunensis* (1), *Haemophilus* sp. (1); 2014: *Staphylococcus warneri* (1), *Proteus mirabilis* (1); 2015: *Burkholderia cepacia* (1), *Elizabethkingia meningoseptica* (1), *Cronobacter sakazakii* (1); 2016: *Enterobacter aerogenes* (1), *Ralstonia pickettii* (1), *Staphylococcus warneri* (1).

A Figura 1 mostra o acumulado de micro-organismos isolados em cada ano da pesquisa. Houve diferença estatística no número de isolados anos de 2015 e 2016 quando comparados com 2013 e 2014.

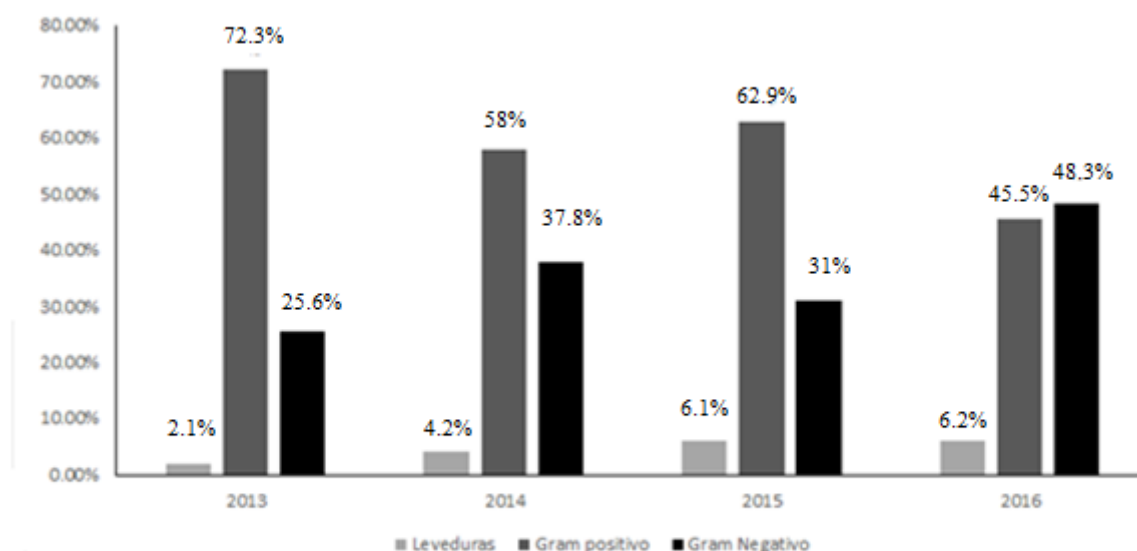
**Figura 1** – Comparação do número de micro-organismos e acumulado de leveduras isoladas de infecção nos RN internados na UTIN do HC-UFU entre os quatro anos de vigilância



**Nota:** entre os anos com letras diferentes  $p < 0,05$ .

A Figura 2 mostra a distribuição dos isolados em cada ano de estudo. Em 2013 observou-se um maior percentual de Gram positivos (72,3%) e apenas 2% foram leveduras. Já em 2014 e 2015, apesar dos Gram positivos ainda serem a maioria dos isolados, com 58% e 62% do total de isolados, observou-se um aumento de infecções por Gram negativos e leveduras. O isolamento de micro-organismos foi significativamente maior em 2016 quando comparado com os outros anos de estudo sendo 48,2% (70) do total de isolados Gram negativos e 6,2% (9) leveduras, sendo *P. aeruginosa* o Gram negativo mais frequente (27,4%).

**Figura 2** – Distribuição dos micro-organismos isolados dos RN internados na UTIN do estudo em cada ano de vigilância



## Discussão

A realização de uma vigilância epidemiológica contínua em unidades hospitalares de risco permite conhecer as infecções mais frequentes e os micro-organismos mais comuns, possibilitando a adoção de medidas para reduzir a ocorrência de IN, com reflexo na diminuição das taxas de morbimortalidade. Sepsé é a infecção mais grave em UTIN, apesar de ser a mais corriqueira, apresentando altas taxas de mortalidade. A vigilância epidemiológica na UTIN do HC-UFU entre 2013 e 2016 mostrou que a infecção mais frequente foi sepsé (63,8%), quatro vezes maior do que a observada na unidade em anos anteriores<sup>18</sup>.

Neonatos em uso de algum tipo de cateter tiveram até quatro vezes mais chances de desenvolver infecção bacteriana do que aqueles que não utilizaram. Peso abaixo de 2500 gramas, necessidade de nutrição parenteral, ventilação mecânica, uso de dreno e tempo de internação superior a sete dias também foram condições significativas para desenvolvimento de infecções por bactérias. O uso desses dispositivos e o baixo peso são condições descritas na literatura que aumentam significativamente a ocorrência de infecções invasivas<sup>19</sup>. Já a

densidade de utilização de PICC e uso de CUV foram fatores independentes para ocorrência de infecção bacteriana.

Em virtude da gravidade de alguns RN admitidos em UTIN, necessidade de procedimentos cirúrgicos, muitos são submetidos à antimicrobianoterapia profilática, que pode propiciar a colonização de pele, mucosas e trato gastrointestinal por leveduras, em especial *Candida* spp., que podem, em alguns casos, iniciar um grave processo infeccioso<sup>20</sup>. Neonatos com idade gestacional inferior a 28 semanas e peso abaixo de 1000 gramas apresentaram risco mais elevado de desenvolverem infecção fúngica invasiva, assim como já observado na literatura<sup>21,22</sup>. Neste estudo, observou-se um aumento expressivo de neonatos com quadro clínico mais grave, enfatizado pelo baixo peso ao nascer, IG < 34 semanas e SNAPPE II > 24. Aqueles RN que faziam uso de dispositivos como PICC, traqueostomia e três ou mais classes de antimicrobianos o risco de desenvolvimento de infecção fúngica chegou a ser 11,85 vezes maior. Além disso, o tempo médio de uso desses dispositivos foi de até 31,5 dias para PICC, considerado elevado, visto que tempo de uso superior a sete dias pode propiciar o desenvolvimento de infecções invasivas, acarretando aumento nos custos hospitalares e nas taxas de morbimortalidade<sup>23</sup>. Neonatos acometidos por infecções fúngicas ficaram em média 50 dias internados. Através da análise multivariada foi confirmado que o tempo de internação prolongado foi fator de risco como sendo independente para aquisição de infecção por fungos. Diversos autores afirmam que a antimicrobianoterapia de amplo espectro por longo prazo e a permanência prolongada em ambiente hospitalar, respectivamente, potencializam as chances de ocorrência de infecção fúngica invasiva, comprometendo fortemente o estado de saúde do neonato<sup>6,11,24</sup>.

Neste estudo, foi observado que neonatos que desenvolveram infecção fúngica foram admitidos na unidade em estado mais crítico, já que 37% eram prematuros extremos, 63% tiveram infecção bacteriana prévia e, em virtude da gravidade do seu quadro clínico permaneciam em média 34,91 e 15,55 mais dias internados na unidade do que aqueles RN sem infecção ou somente com infecção bacteriana, respectivamente. Além disso, neonatos com infecção fúngica foram a óbito 2,6 vezes mais (dados não demonstrados), sendo que cinco dos seis neonatos com infecção por fungo que evoluíram para óbito haviam desenvolvido processo infeccioso concomitante por bactérias. De acordo com dados da literatura, as taxas de morbimortalidade por infecção fúngica invasiva, em especial candidíase, em neonatos críticos são altas, mostrando que esse tipo de infecção é mais grave



do que infecções bacterianas com taxas de óbito mais elevadas e sequelas mais severas, sendo também um problema de saúde pública mundial que merece atenção e uma profilaxia maior<sup>8</sup>.

Infecções invasivas por bactérias Gram positivas são frequentes em UTIN de hospitais de países desenvolvidos<sup>25</sup>. Em países em desenvolvimento, bacteremias por Gram negativos são mais comuns, sendo responsáveis por até 78% dos casos<sup>26</sup>. Neste estudo, SCON foi o micro-organismo mais frequente, correspondendo a 41,3% do total de isolados, entretanto por ser um micro-organismo de baixa virulência, nenhum RN foi a óbito em consequência de infecções por esses. Por outro lado, observou-se um aumento expressivo no isolamento de Gram negativos em 2015 e 2016, com destaque para *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* que corresponderam a 15% (2015) e 31,7% (2016), respectivamente, do total de isolados. O aumento de infecções por Gram negativos é algo preocupante, por desencadear processos infecciosos notoriamente mais graves do que aqueles ocasionados por bactérias Gram positivas não só por acometerem pacientes mais debilitados, como os neonatos de extremo baixo peso (< 1000g), mas também por apresentarem resistência aos antimicrobianos de amplo espectro, como é o caso daquelas produtoras de ESBL, que em 2016 correspondeu a 10% do total de Gram negativos. Morkel (2014)<sup>26</sup> afirma em seu estudo que em países em desenvolvimento, muitas vezes, o acesso a antimicrobianos de nova geração são limitados devido ao alto custo.

A vigilância também revelou um aumento nas infecções invasivas por leveduras, em especial por espécies de *Candida*, já que a taxa de infecção aumentou significativamente de 2,1% em 2013 para 6,2% em 2016. Um estudo de 12 anos de vigilância realizado em dois hospitais terciários nos EUA mostrou um aumento de 15 para 30 pacientes com candidíase invasiva de 2000 para 2003, seguida de uma redução significativa na ocorrência desta infecção, impulsionada principalmente pelo uso profilático de antifúngico<sup>8</sup>.

Estudos anteriores realizados na mesma unidade mostraram o predomínio de IN por bactérias Gram positivas, em especial SCON, com isolamento que chegou a ser duas vezes maior do que o número de Gram negativos entre 2009 e 2010<sup>18,27</sup>. Na época desses estudos a justificativa para redução de isolamento de Gram negativos foi a reforma estrutural realizada na UTIN do HC-UFU, resultando na melhora da qualidade do atendimento, aumento do número de pias, espaço entre os leitos e do número de profissionais. Entretanto, neste estudo, o aumento de infecções bacterianas por bactérias Gram negativas em 2015, sendo mais acentuado em 2016, pode ser justificado pela crise econômica do país, iniciada no fim de

2014 e que resultou no corte de gastos com a saúde e mão de obra qualificada. Isso tudo refletiu na dispensa de profissionais contratados da unidade, bem como na escassez de medicamentos e antimicrobianos de novas gerações (os quais são mais caros), na utilização de dispositivos invasivos com qualidade inferior àquela utilizada anteriormente.

Infecções por bactérias Gram negativas são notoriamente mais graves do que aquelas causadas por Gram positivas não só por acometerem pacientes mais debilitados, como os neonatos de extremo baixo peso (< 1000g), mas também por apresentarem resistência aos antimicrobianos de amplo espectro, como é o caso daquelas produtoras de ESBL, que em 2016 correspondeu a 10% do total de Gram negativos. Em países com mesma situação econômica, como o Brasil, a taxa de isolamento de *Klebsiella pneumoniae* ESBL positivas em UTIN pode passar dos 50%. Esses resultados são preocupantes pelo fato de países com menor poder aquisitivo terem um acesso mais limitado aos mais recentes antimicrobianos lançados no mercado<sup>26</sup>. Em países como Kuwait, Turquia e Egito, *Klebsiella* spp. também foi o Gram negativo mais frequente, sendo que 14,3% eram produtores de ESBL nestes dois últimos países<sup>25,28,29</sup>.

Em conclusão, neste estudo foi observado um aumento expressivo nas infecções desencadeadas por bactérias Gram negativas e leveduras quando comparado com estudos anteriores na mesma UTIN. Aumento esse ocasionado pela admissão de neonatos em estado de saúde mais grave, com destaque para aqueles com peso inferior a 1500g e possivelmente devido a situação financeira precária do país, que impactou na maior ocorrência de óbitos. Esses resultados ressaltam a importância da vigilância epidemiológica constante e a manutenção das medidas de controle de infecções na unidade.

## Referências

01. Souza ABG, et al. Enfermagem Neonatal: Cuidado integral ao recém-nascido 2011; 1. ed., São Paulo: Martinari.
02. Geffers C, Baerwolff S, Schwab F, Gastmeier P. Incidence of healthcare-associated infections in high-risk neonates: results from the German surveillance system for very-low-birthweight infants. J Hosp Infect 2008 May; 68(3):214-221. doi: 10.1016/j.jhin.2008.01.016 <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2008.01.016>
03. Auriti C, Ronchetti MP, Pezzotti P, Marrocco G, Quondamcarlo A, Seganti G, et al. Determinants of nosocomial infection in 6 neonatal intensive care units: an Italian multicenter prospective cohort study. Infect Control HospEpidemiol. 2010 Sep; 31(9):926-933. doi: 10.1086/655461 <https://doi.org/10.1086/655461>

04. Verstraete E, Boelens J, De Coen K, Claeys G, Vogelaers D, Vanhaesebrouck P, et al. Healthcare-associated bloodstream infections in a neonatal intensive care unit over a 20-year period (1992–2011): trends in incidence, pathogens, and mortality. *Infect Control HospEpidemiol* 2014 May; 35(5):511-518. doi: 10.1086/675836  
<https://doi.org/10.1086/675836>
05. Crivaro V, Bogdanović L, Bagattini M, Iula, VD, Catania M, Raimondi F, et al. Surveillance of healthcare-associated infections in a neonatal intensive care unit in Italy density of using 2006–2010. *BMC Infect Dis*. 2015 Mar; 15:152. doi: 10.1186/s12879-015-0909-9. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-0909-9>
06. Garzillo C, Bagattini M, Bogdanović L, Di Popolo A, Iula VD, Catania MR, et al. Risk factors for *Candida parapsilosis* bloodstream infection in a neonatal intensive care unit: a case-control study. *Ital J Pediatr*. 2017 Jan; 43(1):10. doi: 10.1186/s13052-017-0332-5. <https://doi.org/10.1186/s13052-017-0332-5>
07. Resende DS, Peppe AL, Dos Reis H, Abdallah VO, Ribas RM, Gontijo Filho PP. Late onset sepsis in newborn babies: epidemiology and effect of a bundle to prevent central line associated bloodstream infections in the neonatal intensive care unit. *Braz J Infect Dis* 2015 Jan-Feb; 19(1): 52-57. doi: 10.1016/j.bjid.2014.09.006  
<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2014.09.006>
08. Agarwal RR, Agarwal RL, Chen X, Lua JL, Ang JY. Epidemiology of Invasive Fungal Infections at Two Tertiary Care Neonatal Intensive Care Units Over a 12-Year Period (2000–2011). *Glob Pediatr Health*, 2017 Mar; 30:4. doi: 10.1177/2333794X17696684. <https://doi.org/10.1177/2333794X17696684>
09. Nour I, Eldegla HE, Nasef N, Shouman B, Abdel-Hady H, Shabaan AE. Risk factors and clinical outcomes for carbapenem-resistant Gram-negative late-onset sepsis in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect* 2017 Sep; 97(1):52-58. doi: 10.1016/j.jhin.2017.05.025. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.05.025>
10. Fu J, Ding Y, Wei B, Wang L, Xu S, Qin P, et al. Epidemiology of *Candida albicans* and non-*C. albicans* of neonatal candidemia at a tertiary care hospital in western China. *BMC Infect Dis* 2017 May; 17(1):329. doi: 10.1186/s12879-017-2423-8. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2423-8>
11. Urzúa S, Ferrés M, García P, Sánchez A, Luco M. Strategies to reduce density of use of infections and antibiotic use and its effects in a neonatal care unit. *Rev Chilena Infectol* 2017 Apr; 34(2):99-107. doi: 10.4067/S0716-10182017000200001. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182017000200001>
12. Izquierdo G, Santolaya ME. Invasive candidiasis in newborns: diagnosis, treatment and prophylaxis. *Rev Chilena Infectol* 2014 Feb; 31(1):73-83. doi: 10.4067/S0716-10182014000100011. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000100011>
13. Tekin R, Dal T, Pirinccioglu H, Oygucu SE. A 4-Year Surveillance of Device-associated Nosocomial Infections in a Neonatal Intensive Care Unit. *Pediatr Neonatol* 2013 Oct; 54(5):303-308. doi: 10.1016/j.pedneo.2013.03.011. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2013.03.011>
14. Density of use of deck MA, Horan TC, Peterson KD, Allen-Bridson K, Morrell G, Anttila A, et al. National Healthcare Safety Network report, data summary for 2011, device associated density of use. *Am J Infect Control* 2013 Apr; 91(4):286-300. doi: 10.1016/j.ajic.2013.01.002. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2013.01.002>
15. Gastmeier P, Geffers C, Schwab F, Fitzner J, Obladen M, Rüden H. Development of a surveillance system for nosocomial infections: the component for neonatal intensive care units in Germany as an example. *J Hosp Infect*, 2004 Jun; 57(3):126-131. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2003.12.038>

16. Hosmer DW, Lemeshow S. Applied Logistic Regression 2004; Second Edition, New York: John Wiley & Sons, 392p.
17. Zar JH. Biostatistical Analysis 1999; 4th edition, Prentice Hall, 663p.
18. Urzedo JE, Levenhagen MM, Pedroso RS, Abdallah VO, Sabino SS, Brito DV. Nosocomial infections in a neonatal intensive care unit density of using 16 years: 1997-2012. *Rev Soc Bras Med Trop* 2014 May-Jun; 47(3):321-326.  
<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0101-2014>
19. Dong Y, Speer CP. Late-onset neonatal sepsis: recent developments. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2015 May; 3: F257-63. doi: 10.1136/archdischild-2014-306213.  
<https://doi.org/10.1136/archdischild-2014-306213>
20. Marcos-Zambrano LJ, Escibano P, Bouza E, Guinea J. Aplicación de las técnicas de tipificación molecular a estudio de brotes hospitalarios de candidemia. *Rev Iberoam Micol* 2014 Abr-Jun; 31(2):97-103. doi: 10.1016/j.riam.2013.06.003.  
<https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.06.003>
21. Lee JH, Hornik CP, Benjamin DK, Herring AH, Clark RH, Cohen Wolkowicz M, et al. Risk factors for invasive candidiasis in infants >1500 g birth weight. *Pediatr Infect Dis J* 2013 Mar; 32(3):222-226. doi: 10.1097/INF.0b013e3182769603.  
<https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3182769603>
22. Calley JL, Warris A. Recognition and diagnosis of invasive fungal infections in neonates. *J Infect* 2017 Jun; 74(1):S108-S113. doi: 10.1016/S0163-4453(17)30200-1.  
[https://doi.org/10.1016/S0163-4453\(17\)30200-1](https://doi.org/10.1016/S0163-4453(17)30200-1)
23. Deleers M, Dodémont M, Van Overmeire B, Hennequin Y, Vermeylen D, Roisin S, et al. High positive predictive value of Gram stain on catheter-drawn blood samples for the diagnosis of catheter-related bloodstream infection in intensive care neonates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016 Apr; 35(4):691-696. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2588-X>
24. Arsenault AB, Bliss JM. Neonatal Candidiasis: New Insights into an Old Problem at a Unique Host-Pathogen Interface. *Curr Fungal Infect Rep*, 2015 Dez; 9(4):246-252.
25. Hammoud MS, Al-Taiar A, Al-Abdi SY, Bozaid H, Khan A, Almuhaire LM, et al. Late-onset neonatal sepsis in Arab states in the Gulf region: two-year prospective study. *Int J Infect Dis* 2017 Feb; 55:125-130. doi: 10.1016/j.ijid.2017.01.006.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.01.006>
26. Morkel G, Bekker A, Marais BJ, Kirsten G, Van Wyk J, Dramowski A. Bloodstream infections and antimicrobial resistance patterns in a South African neonatal intensive care unit. *Paediatrics and International Child Health* 2014 May; 34(2):108-114. doi: 10.1179/2046905513Y.0000000082.  
<https://doi.org/10.1179/2046905513Y.0000000082>
27. De Brito CS, De Brito DV, Abdallah VO, Gontijo Filho PP. Occurrence of bloodstream infection with different types of central vascular catheter in critically neonates. *J Infect* 2010 Feb; 60(2):128-132. doi: 10.1016/j.jinf.2009.11.007.  
<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2009.11.007>
28. Cura C, Ozen M, Akaslan Kara A, Alkan G, Sesli Cetin E. Health care associated infection surveillance in a tertiary neonatal intensive care unit: A prospective clinical study after moving to a new building. *Am J Infect Control* 2016 Jan; 44(1):80-84. doi: 10.1016/j.ajic.2015.07.032. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.07.032>
29. Gadallah MA, Aboul Fotouh AM, Habil IS, Imam SS, Wassef G. Surveillance of health care associated infections in a tertiary hospital neonatal intensive care unit in Egypt: 1-year follow-up. *Am J Infect Control* 2014 Nov; 42(11):1207-1211. doi: 10.1016/j.ajic.2014.07.020. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2014.07.020>

## 4.2 – Artigo 2

### **Presença de *Candida* spp. nas mãos de profissionais de saúde: virulência e resistência a antifúngicos**

Ralciane de P. Menezes<sup>1,2</sup>, Felipe Flávio Silva<sup>3</sup>, Sávia G. O. Melo<sup>3</sup>, Priscila G. V. Alves<sup>1</sup>, Murilo O. Brito<sup>4</sup>, Meliza O. Bessa<sup>5</sup>, Mário Paulo A. Penatti<sup>1</sup>, Reginaldo dos S. Pedroso<sup>1,2</sup>, Vânia O. S. Abdallah<sup>2</sup>, Denise von D. B. Röder<sup>2,6</sup>

<sup>1</sup>Escola Técnica de Saúde - ESTES, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brasil

<sup>2</sup>Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina – FAMED, UFU, Uberlândia, MG, Brasil

<sup>3</sup>Graduação em Enfermagem, FAMED, UFU, Uberlândia, MG

<sup>4</sup>Graduação em Gestão em Saúde Ambiental – Instituto de Geografia (IG), UFU, Uberlândia, MG, Brasil

<sup>5</sup>Graduação em Biologia – Instituto de Biologia (INBIO), UFU, Uberlândia, MG, Brasil

<sup>6</sup> Instituto de Ciências Biomédicas – ICBIM, UFU, Uberlândia, MG, Brasil

### **Resumo**

A colonização das mãos de profissionais de saúde por micro-organismos patogênicos, capazes de expressar fatores de virulência, como *Candida* spp., é preocupante devido ao máximo contato entre pacientes e profissionais em Unidade de Terapia Intensiva. Os objetivos deste estudo foram: avaliar, *in vitro*, os fatores de virulência: atividade hemolítica, expressão de DNase, formação de biofilme e susceptibilidade aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e micafungina de espécies de *Candida* isoladas das mãos de profissionais de saúde de uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN). Foram estudados 50 isolados de *Candida* spp. dos quais 19 foram *C. parapsilosis stricto sensu*, três *C. metapsilosis*, um *C. orthopsilosis*, sete *C. albicans*, seis *C. famata*, cinco *C. lusitaniae*, três *C. krusei*, dois *C. kefyr*, dois *C. tropicalis*, um *C. glabrata* e um *C. guilliermondii*. A pesquisa de atividade hemolítica e de DNase foi feita utilizando ágar sangue e ágar DNase, respectivamente. A

produção de biofilme foi avaliada através da capacidade de redução do sal de sódio XTT e a avaliação da susceptibilidade dos isolados aos antifúngicos foi feita através da metodologia de microdiluição em caldo. Os resultados deste estudo foram: 49 isolados foram capazes de expressar pelo menos um dos três fatores de virulência pesquisados, sendo que 17 expressaram simultaneamente todos os três fatores. *C. albicans* apresentaram atividade hemolítica mais acentuada que os isolados de *C. parapsilosis* ( $P=0,0395$ ) e *C. lusitaniae* ( $P=0,0284$ ). A produção de DNase foi estatisticamente diferente entre o complexo *C. parapsilosis* e *C. albicans* ( $P=0,0257$ ), complexo *C. parapsilosis* e *C. krusei* ( $P=0,0488$ ), entre *C. famata* e *C. albicans* ( $P=0,0124$ ) e *C. famata* e *C. krusei* ( $P=0,0216$ ). Quarenta e três isolados foram capazes de formar biofilme. Setenta e oito por cento dos isolados foram sensíveis aos três antifúngicos. Esta pesquisa demonstrou que isolados de *Candida* provenientes de colonização das mãos de profissionais de saúde são capazes de expressar importantes fatores de virulência.

**Palavras-chave:** *Candida* spp., virulência, biofilme, antifúngicos.

## Introdução

Espécies de *Candida* agrupam os principais patógenos fúngicos oportunistas que acometem pacientes internados em serviços de saúde. Em recém-nascidos (RN), *Candida* spp. é o terceiro micro-organismo mais isolado de infecções invasivas, sendo *C. albicans* e *C. parapsilosis* as espécies mais frequentes, seguidas de *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* [1,2]. A morbimortalidade por candidíase invasiva em neonatos críticos pode chegar a 59% e aproximadamente 60% dos neonatos que se recuperaram desse tipo de infecção apresentam alguma sequela neurodegenerativa [3].

Neonatos internados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) possuem sistema imune imaturo que, associado ao baixo peso, prematuridade, doença de base e a fatores de risco extrínsecos (uso de cateter venoso central, nutrição parenteral, dentre outros) estão mais expostos a infecções [1].

A instalação de infecção por *Candida* spp. se dá quando há um desequilíbrio na relação parasito-hospedeiro, resultado da associação entre ineficiência das defesas do indivíduo e expressão de fatores de virulência pelo micro-organismo. Existem vários fatores de virulência descritos para fungos, e para espécies de *Candida*, a atividade hemolítica,

expressão de proteases, fosfolipases e DNase, além da capacidade de formação de biofilme, são importantes para a colonização tecidual pelo micro-organismo e para as diversas fases de consolidação de um processo infeccioso [2,4].

Os mecanismos pelos quais os fatores de virulência contribuem para a patogênese são diversos. Por exemplo, as hemolisinas promovem a lise das hemácias, o que permite a obtenção do ferro, que é importante no desenvolvimento e multiplicação da levedura [5]. O mecanismo de contribuição da enzima DNase na virulência do micro-organismo não está totalmente claro, mas tem sido proposto que ela colabora no mecanismo de escape contra a ação dos neutrófilos degradando o DNA que o compõe [6,7].

Já a expressão de outros fatores como a formação de biofilme, pode tornar a levedura menos susceptível a ação de antifúngicos, além de possibilitar a aderência, colonização e manutenção de células viáveis em dispositivos invasivos e nos tecidos do hospedeiro. O biofilme é uma estrutura complexa composta por leveduras, hifas e pseudo-hifas que são envoltas por uma matriz extracelular, que permite não só a fixação do micro-organismo em superfícies de dispositivos médicos e invasivos, como ainda dificulta a ação das defesas naturais e de antifúngicos como fluconazol e anfotericina B [2].

Estima-se que cerca de 60% dos profissionais de saúde podem apresentar *Candida* spp. na microbiota da pele, sendo *C. parapsilosis* a mais frequente, conforme alguns estudos [8]. Este conhecimento é importante porque evidencia que estes micro-organismos circulam no ambiente, sendo carregadas por pessoas. Este fato é importante em ambientes de serviços de saúde, onde a circulação de micro-organismos com virulentos ou resistentes a drogas podem ser transmitidos para indivíduos imunocomprometidos, caso as precauções de biossegurança não sejam adequadas. Assim, a via de circulação ou transmissão exógena da levedura está relacionada à presença unânime da mesma em ambiente hospitalar, bem como nas mãos daqueles que lidam diretamente com os pacientes. Desse modo, essa forma de transmissão pode ser evitada pela adoção de técnicas adequadas e padronizadas de higienização das mãos antes e após a manipulação do paciente [9].

Assim, o presente estudo teve como objetivo pesquisar, *in vitro*, os fatores de virulência: atividade hemolítica, expressão de DNase e formação de biofilme e a susceptibilidade aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e micafungina de espécies de *Candida* isoladas das mãos de profissionais de saúde de uma UTI neonatal.

## Material e Métodos

O estudo foi realizado com isolados de *Candida* spp. obtidos de mãos de profissionais de saúde lotados em uma UTIN de um hospital de alta complexidade que possui 520 leitos, dos quais 15 pertencem a UTIN e faz parte do Berçário de Alto Risco da Instituição.

Os isolados de leveduras (50) foram obtidos a partir de amostras coletadas de 134 profissionais da UTIN. Os profissionais, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), simularam a técnica de lavagem de mãos em um saco de polipropileno esterilizado contendo 30 mL de solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) esterilizada. O material foi colocado em tubos tipo Falcon de 15 mL esterilizados, e centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 0,1 mL do sedimento foi semeado em placas com ágar Sabouraud dextrose (ASD) (Isofar, Duque de Caixas, RJ, Brasil), acrescido de cloranfenicol, assim como em placas com ágar cromogênico (Himedia, Mumbai, Índia) e incubadas a 30°C por até 72 horas [10].

As leveduras foram identificadas pela metodologia clássica [11], e os isolados de *C. albicans* foram confirmados utilizando reação em cadeia pela polimerase (PCR) com iniciadores específicos para diferenciação de *C. dubliniensis* conforme proposto por Estrada-Barraza et al. [12]. Os isolados identificados como *C. parapsilosis* foram diferenciados nas espécies *C. parapsilosis strito sensu*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* pela metodologia de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição - RFLP-PCR, conforme Tavanti e colaboradores [13].

### ***Pesquisa de Atividade Hemolítica e DNase***

A partir de uma cultura recente em ASD (24-48 horas) foi feita uma suspensão de cada isolado em solução salina (0,9%) com turbidez equivalente ao tubo 2 da escala de McFarland ( $1 \times 10^8$  a  $5 \times 10^8$  UFC/mL). Posteriormente, alíquotas de 5 µL de cada suspensão foram depositadas em pontos equidistantes em placas de Petri (90x15mm) contendo ágar DNase (Hexis, São Paulo, Brasil) e ágar sangue de carneiro 7% [6]. A incubação foi feita a 30°C por sete dias para pesquisa de DNase e por 48 horas para análise da atividade hemolítica [5,14].

Os testes foram feitos em duplicata e a interpretação e descrição dos resultados foram realizadas conforme a seguir: a presença da atividade hemolítica foi constatada através da visualização da hemólise em torno da colônia. A atividade hemolítica foi mensurada pela



razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o mesmo somado com a zona de hemólise (dcp). Os resultados obtidos foram expressos pela relação  $dc/dcp$ :  $H_i$  (índice hemolítico) e classificados como negativo ( $H_i = 1$ ), moderado ( $0,63 < H_i < 1$ ) e acentuado (ou  $H_i \leq 0,63$ ) [15].

Os resultados da atividade de DNase foram expressos como positivo e negativo de acordo com a presença ou ausência de um halo de clareamento em volta da colônia [6].

### ***Pesquisa da formação de Biofilme***

A avaliação da capacidade de formação de biofilme pelos isolados estudados foi feita conforme metodologia proposta por Pierce et al. [16] com modificações. Resumidamente, 10  $\mu$ L da cultura recente em ASD de cada isolado foi inoculada em 15 mL de caldo Yeast, Peptona e Dextrose (YPD) e incubadas por 12 a 18 horas a 35°C. Posteriormente, o material foi centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante desprezado e o sedimento lavado três vezes com tampão salina fosfato (PBS) (1:10), centrifugado e ressuspensão em PBS não diluído. Em seguida, foi feita uma suspensão em RPMI 1640 (Himedia, Mumbai, Índia) suplementado com glicose e tamponado com MOPS ([N-morfolino] propano-ácido sulfônico) (Hexis, São Paulo, Brasil) com turvação equivalente ao tubo 0.5 da escala de McFarland, contendo aproximadamente  $1 \times 10^6$  UFC/mL. Foram dispensados 100  $\mu$ L em cada poço de placas de 96 poços. Após incubação a 35°C por 24 horas, as amostras foram lavadas três vezes com PBS não diluído para retirada das células planctônicas e acrescido de 100  $\mu$ L de solução sal de sódio XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5Carboxanilide) e Menadiona (Sigma-Aldrich, Alemanha). As placas foram embrulhadas com papel alumínio e incubadas novamente a 35°C por 2 horas. Decorrido este tempo, 80  $\mu$ L de cada amostra foram transferidos para outra placa e realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 490 nm, sendo o teste feito em quadruplicata e resultado expresso de acordo com a média das absorbâncias observadas em cada teste. Os resultados foram classificados de acordo com a absorbância em: 1) não produtores de biofilme ( $DO < 0,10$ ), 2) fracos produtores ( $0,11 < DO < 0,40$ ), 3) produtores moderados ( $0,41 < DO < 0,74$ ) e 4) altos produtores de biofilme ( $DO \geq 0,75$ ).

### ***Teste de Susceptibilidade aos Antifúngicos***

A avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos fluconazol (Fluoxol, La Paz, Bolívia), anfotericina B (Cristália, São Paulo, Brasil) e micafungina (Raffo, Buenos Aires, Argentina) foi feita pelo método de microdiluição em caldo, conforme descrito nos

documentos M27-A3-S3 e M27-S4 [17,18]. Brevemente, a partir de uma colônia de 24 horas crescida em ASD foi feita uma suspensão em RPMI 1640, suplementado com glicose (2%) e tamponado com MOPS, contendo  $1 \times 10^6$  células/mL e pipetados 100 uL em placas de 96 poços contendo as diferentes concentrações de cada antifúngico, para uma concentração final em cada poço variando de 0,03 µg/mL a 16 µg/mL para anfotericina B e micafungina, e variando de 0,125 a 64 µg/mL para o fluconazol. Após 24 horas de incubação a 35°C foi realizada a leitura das placas em espectrofotômetro a 490nm. Os testes foram feitos em duplicata e o resultado expresso pela média da absorbância observada para cada concentração do antifúngico. *C. albicans* ATCC 90028, *C. parapsilosis* ATCC 22019 foram utilizadas como controle dos testes realizados.

Em ensaios com azólicos e micafungina, a menor concentração capaz de induzir inibição em torno de 50% do crescimento verificado no micro-organismo avaliado, em relação ao poço-controle, foi identificada como a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da droga. Já a anfotericina B a CIM foi a menor concentração capaz de inibir 80% do crescimento [17].

Os critérios de interpretação de MIC e pontos de corte para cada antifúngico e cada espécie foram considerados de acordo com a norma vigente nos documentos M27-A3-S3 e M27-S4 do CLSI e estão descritos na Tabela 1 [17,18].

**Tabela 1** – Pontos de coorte padronizados para interpretação dos valores de MIC para espécies de *Candida* segundo CLSI

Antifúngico	Espécies	Variação do CIM (µg/mL)				Referência
		S	SDD	I	R	
Anfotericina B	Todas	≤ 1	-	-	> 1	CLSI, 2008
	<i>C. albicans</i>	≤ 2	4	-	≥ 8	CLSI, 2012
	<i>C. glabrata</i>	-	≤ 32	-	≥ 64	CLSI, 2012
Fluconazol	<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	CLSI, 2012
	<i>C. parapsilosis</i>	≤ 2	4	-	≥ 8	CLSI, 2012
	<i>C. tropicalis</i>	≤ 2	4	-	≥ 8	CLSI, 2012
	Outras espécies	≤ 8	16-32	-	≥ 64	CLSI, 2008
	<i>C. albicans</i>	≤ 0,25	-	0.5	≥ 1	CLSI, 2012
	<i>C. glabrata</i>	≤ 0,06	-	0.12	≥ 0.25	CLSI, 2012
	<i>C. tropicalis</i>	≤ 0,25	-	0.5	≥ 1	CLSI, 2012
Micafungina	<i>C. krusei</i>	≤ 0,25	-	0.5	≥ 1	CLSI, 2012
	<i>C. parapsilosis</i>	≤ 2	-	4	≥ 8	CLSI, 2012
	<i>C. guilliermondii</i>	≤ 2	-	4	≥ 8	CLSI, 2012
	Another species	≤ 2	-	-	≥ 4	CLSI, 2008

**Nota:** S: sensível, SDD: sensível dose-dependente, I: intermediário, R: resistente.

### ***Comitê de Ética***

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (CEP-UFU), com parecer número 989.139/2015.

### ***Análise estatística***

Para comparar a atividade hemolítica, de DNase e produção de biofilme foi utilizado o teste de Mann-Whitney, quando a comparação foi feita entre duas espécies, e Kruskal-Wallis, para a comparação entre todas as espécies. Já para avaliar a susceptibilidade aos antifúngicos foi utilizado o Teste T de Student quando a comparação foi feita entre duas espécies para cada antifúngico, quando a comparação foi feita entre todas as espécies utilizou-se o teste Anova one-way. Já para comparar a resposta de cada espécie entre as três drogas com ação antifúngica, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Foram considerados significativos os valores de  $P < 0,05$ .

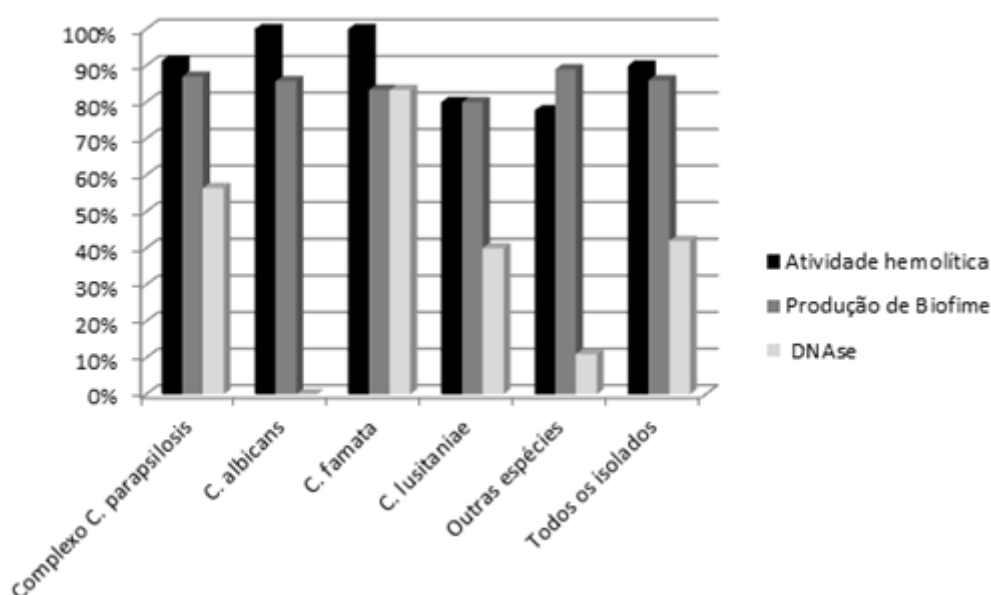
## Resultados

Dos 50 isolados identificados, 19 foram *C. parapsilosis stricto sensu*, três *C. metapsilosis*, um *C. orthopsilosis*, sete *C. albicans*, seis *C. famata*, cinco *C. lusitaniae*, três *C. krusei*, dois *C. kefyr*, dois *C. tropicalis*, um *C. glabrata* e um *C. guilliermondii*.

Na avaliação dos fatores de virulência, 49 (98,0%) isolados foram capazes de expressar pelo menos um dos três fatores de virulência pesquisados, sendo que 17 (34,0%) expressaram simultaneamente todos os fatores estudados.

Apenas um isolado de *C. metapsilosis* não produziu nenhum destes fatores. A Figura 1 mostra a frequência de isolados que apresentaram atividade hemolítica, expressaram DNase e formaram biofilme, de acordo com as principais espécies.

**Figura 1** -Expressão de fatores de virulência em isolados de *Candida* spp. provenientes das mãos de profissionais de saúde de uma UTIN



Nota: Outras espécies: *C. krusei* (3), *C. kefyr* (2), *C. tropicalis* (2), *C. glabrata* (1), *C. guilliermondii* (1).

Atividade hemolítica foi observada para todos os isolados de *C. albicans* e *C. famata*, e pela maioria dos isolados de *C. parapsilosis* (91,2%) e de *C. lusitaniae* (80,0%). A maioria dos isolados de *C. albicans* (71,4%) e *C. famata* (83,3%) tiveram forte atividade hemolítica. Ao comparar a atividade dessa enzima entre as espécies, os isolados de *C. albicans* apresentaram atividade hemolítica mais acentuada que os isolados de *C. parapsilosis* ( $P=$

0,0395) e *C. lusitaniae* ( $P= 0,0284$ ). Os isolados de *C. famata* também mostraram uma atividade maior do que *C. parapsilosis* ( $P= 0,0192$ ), *C. lusitaniae* ( $P= 0,0176$ ) e o grupo das outras espécies ( $P= 0,0392$ ).

Dos 21 (42,0%) isolados que apresentaram atividade de DNase, a maioria pertencia ao complexo *C. parapsilosis* (13 isolados, 56,5%) e *C. famata* (cinco isolados, 83,3%). Nenhum isolado de *C. albicans* e um de *C. guilliermondii* expressaram a enzima *in vitro* (Tabela 2). Diferença estatisticamente significativa na produção dessa enzima foi encontrada entre o complexo *C. parapsilosis* e *C. albicans* ( $P= 0,0257$ ), complexo *C. parapsilosis* e *C. krusei* ( $P= 0,0488$ ), entre *C. famata* e *C. albicans* ( $P= 0,0124$ ) e *C. famata* e *C. krusei* ( $P= 0,0216$ ).

**Tabela 2** - Atividade hemolítica, DNase e produção de biofilme dos isolados de *Candida* spp. provenientes das mãos de profissionais de saúde de uma UTIN

Espécie	Número de isolados n (%)	Escore atividade hemolítica <sup>a</sup> n (%)			Expressão de DNase n (%)		Escore biofilme <sup>b</sup> n (%)			
		1	2	3	Negativo	Positivo	1	2	3	4
Complexo <i>C.</i>										
<i>parapsilosis</i>	23(100%)	2(8,8%)	16(69,5%)	5(21,7%)	10(43,5%)	13(56,5%)	3(13%)	14(60,8%)	5(21,7%)	1(4,5%)
<i>C. albicans</i>	7(100%)	0	2(28,6%)	5(71,4%)	7(100%)	0	1(14,4%)	3(42,8%)	3(42,8%)	0
<i>C. famata</i>	6(100%)	0	1(16,7%)	5(83,3%)	1(16,7%)	5(83,3%)	1(16,7%)	3(50%)	2(33,3%)	0
<i>C. lusitaniae</i>	5(100%)	1(20%)	4(80%)	0	3(60%)	2(40%)	1(20%)	3(60%)	1(20%)	0
Outras espécies*	9(100%)	2(22,2%)	5(55,6%)	2(22,2%)	8(88,8%)	1(11,2%)	1(11,1%)	3(33,3%)	4(44,5%)	1(11,1%)
Total	50(100%)	5(10%)	28(56%)	17(34%)	29(58%)	21(42%)	7(14%)	26(52%)	15(30%)	2(4%)

Nota: <sup>a</sup> Escores atividade hemolítica: 1: não apresentou atividade enzimática ( $Hi = 1$ ); 2: atividade enzimática moderada ( $0,63 < Hi < 0,99$ ); 3: atividade enzimática acentuada ( $Hi \leq 0,63$ ). <sup>b</sup> Escores para produção de biofilme: 1: não produtor de biofilme; 2: fraco produtor de biofilme; 3: produtor moderado; 4: forte produtor de biofilme. \*Outras espécies: *C. krusei* (3), *C. kefyr* (2), *C. tropicalis* (2), *C. glabrata* (1), *C. guilliermondii* (1).

Com relação à produção de biofilme, 43 (86,0%) isolados foram capazes de formá-lo, sendo dois com forte expressão, 15 com expressão moderada e 26 de forma fraca. A maioria dos isolados foi considerada fracos formadores de biofilme (52%), sendo observada expressão intensa em apenas dois isolados: um de *C. parapsilosis* e outro de *C. kefyr* (Tabela 2). Um isolado de *C. krusei* também não formou biofilme. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na formação de biofilme entre as espécies estudadas (Tabela 3).

A Tabela 3 apresenta as faixas de variação de MIC dos três antifúngicos testados. *C. lusitaniae* apresentou o maior MIC para anfotericina B, complexo *C. parapsilosis* para fluconazol e *C. famata* para micafungina. Setenta e oito por cento dos isolados foram sensíveis aos três antifúngicos. Anfotericina B foi o antifúngico com maior número de isolados susceptíveis (49/50), seguido de micafungina (48/50) e fluconazol (41/50). O único isolado resistente à anfotericina B foi de *C. lusitaniae*, a resistência a micafungina foi apresentada por *C. famata* (1) e *C. glabrata* (1). Já ao fluconazol, a resistência foi constatada pelos três isolados de *C. krusei*, e por dois isolados do complexo *C. parapsilosis*, do qual também três amostras foram consideradas SDD. Um isolado de *C. albicans* também foi SDD ao fluconazol.

**Tabela 3** - Valores de CIM apresentados pelas espécies de *Candida* provenientes das mãos de profissionais de saúde de uma UTIN

Espécies (n)	Anfotericina B				Fluconazol				Micafungina			
	Intervalo µg/mL	CIM50	CIM90	Média µg/mL	Intervalo µg/mL	CIM50	CIM90	Média µg/mL	Intervalo µg/mL	CIM50	CIM90	Média µg/mL
Complexo <i>C. parapsilosis</i> (23)	0,06-1	0,25	0,5	0,274	0,25-64	1	4	6,66	0,03-1	1	1	0,767
<i>C. albicans</i> (7)	0,125-0,5	0,25	0,25	0,232	0,25-4	0,25	0,5	0,857	0,03-0,5	0,06	0,06	0,11
<i>C. famata</i> (6)	0,125-0,5	0,125	0,5	0,291	1-4	2	2	2	0,03-8	1	1	1,88
<i>C. lusitaniae</i> (5)	0,125-2	0,5	1	0,75	0,25-1	0,5	0,5	0,5	0,03-2	0,5	2	1
Outras espécies*(9)	0,03-1	0,125	0,5	0,30	0,5-8	0,5	2	2,25	0,015-1	0,03	0,06	0,185

**Note:** MIC50: concentração de antifúngico que inibe o crescimento de 50% dos isolados. MIC90: concentração de antifúngico que inibe o crescimento de 90% dos isolados.

\*Outras espécies: *C. krusei* (3), *C. kefyr* (2), *C. tropicalis* (2), *C. glabrata* (1), *C. guilliermondii* (1).



Analisando a susceptibilidade de cada espécie em relação aos três antifúngicos testados, o complexo *C. parapsilosis* apresentou-se significativamente menos susceptível ao fluconazol (41S) quando comparado com anfotericina B (50S) e micafungina (50S) ( $P = 0,005$ ). Ao comparar a susceptibilidade entre espécies diferentes, os isolados de *C. famata* apresentaram CIM para fluconazol significativamente maior do que *C. lusitaniae* ( $P = 0,0076$ ). CIM estatisticamente maiores também foram observados para micafungina entre os isolados do complexo *C. parapsilosis* e *C. albicans* ( $P = 0,0002$ ) e entre *C. parapsilosis* e o grupo de outras espécies ( $P = 0,039$ ) (Tabela 4).

A tabela 4 mostra também a variabilidade dos CIM de acordo com as principais espécies incluídas no estudo. A variabilidade intraespécie observada para os isolados de *C. parapsilosis* se destacou entre as demais espécies (média de CIM 6,66 µg/mL e desvio padrão de +/- 17,7).

**Tabela 4** - Comparação da produção de enzimas, biofilme e susceptibilidade aos antifúngicos entre as espécies isoladas das mãos de profissionais de saúde de uma UTIN

	Complexo <i>C. parapsilosis</i> (23)	<i>C. albicans</i> (7)	<i>C. famata</i> (6)	<i>C. lusitaniae</i> (5)	Outras espécies* (9)	<i>P</i>
Atividade hemolítica	0,715 ± 0,1	0,637 ± 0,04	0,625 ± 0,04	0,758 ± 0,1	0,735 ± 0,15	0,0197
Produção de Biofilme	0,377 ± 0,3	0,40 ± 0,2	0,319 ± 0,1	0,170 ± 0,1	0,507 ± 0,5	0,636
CIM Anfotericina B (µg/mL)	0,274 ± 0,2	0,232 ± 0,1	0,291 ± 0,1	0,75 ± 0,7	0,301 ± 0,2	0,048
CIM Fluconazol (µg/mL)	6,66 ± 17,7	0,857 ± 1,2	2 ± 1	0,5 ± 0,2	2,25 ± 2,6	0,767
CIM Micafungina (µg/mL)	0,767 ± 0,5	0,11 ± 0,1	1,88 ± 2,7	1,0 ± 0,8	0,185 ± 0,2	0,052

\*Outras espécies: *C. krusei* (3), *C. kefyr* (2), *C. tropicalis* (2), *C. glabrata* (1), *C. guilliermondii* (1).

## Discussão

É consenso na literatura que a falta ou a inadequada higienização das mãos de profissionais de saúde são uma das principais formas de transmissão horizontal de micro-organismos responsáveis pela ocorrência de infecções invasivas em pacientes críticos, como neonatos. Isto ressalta a importância de se estudar a expressão de fatores de virulência e a sensibilidade de micro-organismos presentes na microbiota, incluindo *Candida* spp., de modo a prever a patogenicidade do micro-organismo, adicionado à compreensão da relação parasito-hospedeiro e do processo de instalação da doença.

Há vários estudos relatando a expressão de enzimas fosfolipase e proteinase por espécies de *Candida* isoladas de diferentes sítios anatômicos [6,15]. Entretanto, pesquisas que avaliam a produção de hemolisina e DNase ainda são escassos, tendo sido encontrado apenas dois relatos, de um mesmo grupo de estudos, na literatura da pesquisa de produção dessas enzimas por *Candida* spp. isolada das mãos [8,19]. Todas as espécies incluídas no estudo apresentaram atividade hemolítica, com variação, no entanto, quanto à intensidade de expressão. Apenas dois isolados do complexo *C. parapsilosis* (*C. parapsilosis* *stricto sensu* e *C. metapsilosis*), *C. lusitaniae* (um), *C. glabrata* (um) e *C. krusei* (um) não apresentaram o fator hemolítico. Quanto à intensidade, atividade hemolítica acentuada foi expressa pela maioria dos isolados de *C. albicans* e *C. famata*. Esta porcentagem se assemelha àquela encontrada em estudos com leveduras provenientes de infecções orais e invasivas de pacientes críticos [6,20]. O isolado de *C. famata* com índice hemolítico mais acentuado (0,58) não foi capaz de expressar nenhum dos outros fatores de virulência pesquisados. As hemolisinas possibilitam ao patógeno sobreviver e persistir no hospedeiro, pois permite o fornecimento do íon ferro para o metabolismo celular. A extensão de atividade hemolítica apresentada por diferentes isolados são cepa e espécie dependente, conforme já assinalado na literatura, apesar do mecanismo da expressão gênica, assim como da participação nas vias metabólicas não estarem elucidados [21].

*C. famata* é uma levedura com raro isolamento em infecções invasivas bem como da microbiota de indivíduos saudáveis [22]. Entretanto, já houve relatos de isolamento em infecções de RN de muito baixo peso internados em UTIN [23]. Desse modo, a presença desta levedura na microbiota da pele de profissionais de saúde que lidam diariamente com neonatos críticos é algo preocupante, ainda mais porque estes

isolados foram capazes de expressar em alta intensidade mecanismos que permitem a instalação da doença e evasão das defesas do hospedeiro.

A produção de DNase é descrita para alguns gêneros de bactérias como *Staphylococcus*, porém poucos estudos têm demonstrado a expressão desta enzima entre fungos, inclusive para espécies de *Candida*, sendo raros os relatos na literatura que tratam deste assunto [6,15]. Neste estudo, pouco mais de 40% dos isolados apresentaram atividade de DNase, e *C. famata* e o complexo *C. parapsilosis*, em sua maioria, foram positivos para a atividade da enzima em questão.

Os isolados de *C. albicans*, por sua vez, foram negativos para DNase, embora, todos tenham expressado de forma moderada ou acentuada atividade hemolítica e biofilme. Um estudo anterior realizado por nosso grupo demonstrou que 20% dos isolados provenientes de infecção invasiva avaliados quanto a produção de DNase, apresentaram atividade da enzima, sendo a maioria dos isolados de *C. albicans* [6]. Outro estudo realizado somente com *C. albicans* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos e negativos observou a expressão da enzima em 32% e 12,2% nos respectivos grupos [15]. Isolados de diferentes sítios anatômicos, e de mesmos sítios, porém oriundos de pacientes em diferentes condições patológicas, expressam fatores de virulência, *in vitro*, em intensidades variadas. Diferentes estudos mostram esta condição, e observa-se que a expressão de atividade de DNase também é variável conforme a cepa considerada e entre as diferentes espécies.

Na microbiota da pele é mais comum a presença de *C. parapsilosis*, porém *C. albicans*, mesmo sendo encontrada com maior frequência em mucosas, também pode ser veiculada por mãos, assim como outras espécies. O contato destes isolados com indivíduos imunocomprometidos ou dispositivos médicos pode possibilitar a colonização do tecido ou do dispositivo. Como os isolados são capazes de expressar fatores de virulência que permitem a aderência, formação de biofilme, e expressão de enzimas hidrolíticas, que por sua vez possibilitam a invasão do tecido, manutenção do processo infeccioso e na evasão dos mecanismos de defesa do indivíduo, infere-se que este conhecimento e informação possam contribuir com maior rigorosidade e cuidados no atendimento de pacientes em UTIN.

Nas leveduras, a formação de biofilme tem sido estudada com maior atenção desde a última década em virtude do aumento de infecções fúngicas invasivas no intuito

de compreender o seu processo de instalação e como ele influencia na diminuição da suscetibilidade aos antifúngicos [24]. Neste estudo foi avaliada a intensidade da formação de biofilme por espécies de *Candida* isoladas das mãos de profissionais de saúde de uma UTI neonatal e verificou-se que a maioria dos isolados (86,0%) foi formador de biofilme, com 34% apresentando formação moderada ou acentuada, facilitando ainda mais a permanência deste micro-organismo na unidade. As espécies com maior número de isolados positivos foram complexo *C. parapsilosis* e *C. albicans*. Contrariando a literatura, *C. albicans* foi a espécie com maior porcentagem de isolados com produção moderada de biofilme [25]. Esses resultados chamam a atenção em virtude do sítio e população de isolamento, a qual está em contato diário com pacientes que ainda não apresentam suas defesas imunológicas totalmente formadas e, que são submetidos diariamente a procedimentos invasivos para instalação de dispositivos propícios para colonização e posterior formação dessa matriz extracelular, como cateteres, nutrição parenteral e sondas.

Relatos sobre a susceptibilidade de espécies de *Candida* a antifúngicos têm contribuído para conhecimento acerca da situação e epidemiologia, além da vigilância quanto ao surgimento de resistência entre a população de micro-organismos que circulam em determinado ambiente. *Candida* spp. é o quarto patógeno mais frequente em infecções invasivas [2]. Relatos de espécies resistentes ao fluconazol, por exemplo, é uma situação preocupante já que este geralmente é o antifúngico de primeira escolha no tratamento de candidíases invasivas em neonatos. A maioria dos isolados estudados foi sensível aos três antifúngicos testados, como também tem sido observado em outros estudos que avaliaram a sensibilidade de isolados de candidemia e candidíase superficial no Brasil e no mundo [2,26]. Cinco isolados do complexo *C. parapsilosis* apresentou uma sensibilidade dose dependente (N=3) bem como resistência (N=2) ao fluconazol, além de terem apresentado um valor de CIM significativamente maior também para micafungina em relação às outras espécies, situação preocupante, pois esta é a espécie não-*albicans* mais comum em candidíases invasivas em neonatos [1]. Bonassolia, Bertolia e Svidzinski [8], em estudo com *C. parapsilosis* isoladas mãos de profissionais de saúde encontraram um número menor (7,6%) de isolados com sensibilidade reduzida e apresentou um valor de CIM inferior (CIM médio 5,42 µg/mL) ao observado neste estudo. Esta sensibilidade reduzida e resistência ao fluconazol também foi relatada por outros autores que estudaram *Candida* spp. isoladas de

infecções invasivas e de ambiente [27,28]. Resistência *in vitro* à anfotericina B e micafungina foi observada por *C. lusitaniae*, *C. famata* e *C. glabrata*. O isolamento, a partir de mãos de profissionais de saúde, de leveduras resistentes às principais classes de antifúngicos disponíveis para o tratamento de candidíase invasiva chama a atenção, não só, porque estes profissionais trabalham com um público com o sistema imunológico que não está formado e que apresentam diversos fatores de risco para instalação de infecções como os neonatos prematuros e com muito baixo peso, com os quais muitas vezes não se pode errar na escolha da terapia antifúngica. A susceptibilidade reduzida apresentada pelos isolados deste estudo pode estar relacionada com a expressão de biofilme, já que isolados resistentes foram moderados ou fortes formadores de biofilme, ao passo que aqueles SDD expressaram fracamente o biofilme. Essa condição é viável porque essa matriz extracelular pode conferir proteção e permitir a disseminação das células fúngicas [2].

Em conclusão, uma diversidade de espécies de *Candida* foi obtida da microbiota das mãos de profissionais de saúde, com predomínio do complexo *C. parapsilosis*. Além disso, o estudo demonstra que isolados provenientes de colonização das mãos de profissionais de saúde são virulentos, já que a maioria dos isolados foram capazes de expressar ao menos um dos três fatores de virulência avaliados, com destaque para *C. famata*, espécie emergente em ambiente hospitalar, que expressou de forma significativa atividade hemolítica, DNase e biofilme. Isolados resistentes às classes de antifúngicos utilizados no tratamento de candidíases invasivas em UTIN também foram encontrados, sendo o fluconazol o antifúngico com maior número de isolados com susceptibilidade reduzida. Esses resultados alertam sobre a necessidade de maior rigor na prática de higienização das mãos contribuindo para o controle das infecções e aplicação efetiva das medidas de precaução para impedir o contato desses micro-organismos presentes na microbiota com pacientes em estado crítico de saúde.

### **Conflito de interesse**

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de Iniciação Científica concedidas a Felipe Flávio

Silva e Sáva Gonçalves Oliveira Melo. Agradecem também ao Curso Técnico em Análises Clínicas (ESTES-UFU) por disponibilizar os equipamentos e reagentes necessários para realização de todos os testes. À professora Dra. Regina Helena Pires da Universidade de Franca por ceder as cepas ATCC do complexo *C. parapsilosis*.

## Referências

- 1 - Izquierdo G, Santolaya ME. Invasive candidiasis in newborns: diagnosis, treatment and prophylaxis. Rev Chilena Infectol. 2014; 31(1): 73-83.  
<https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000100011>
- 2 - Seneviratne CJ, Rajan S, Wong SS, et al. Antifungal susceptibility in serum and virulence determinants of candida blood stream isolates from Hong Kong. Front Microbiol. 2016; 7: 216. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00216>
- 3 - Strollo S, Lionakis MS, Adjemian J, Steiner CA, Prevots DR. Epidemiology of hospitalizations associated with invasive candidiasis, United States, 2002-2012. Emerg Infect Dis. 2016; 23(1): 7-13. <https://doi.org/10.3201/eid2301.161198>
- 4 - Mandelblat M, Frenkel M, Abbey D, Ben Ami R, Berman J, Segal E. Phenotypic and genotypic characteristics of Candida albicans isolates from bloodstream and mucosal infections. Mycoses. 2017; 60(8): 534-545. <https://doi.org/10.1111/myc.12623>
- 5 - Favero D, Furlaneto-Maia L, França EJ, Góes HP, Furlaneto MC. Haemolytic factor production by clinical isolates of Candida species. Current Microbiology. 2011; 68(6): 161-166.
- 6 - Riceto EB, Menezes RP, Penatti MP, Pedroso RS. Enzymatic and hemolytic activity in different Candida species. Rev Iberoam Micol. 2015; 32(2): 79-82.  
<https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.11.003>
- 7 - Zhang X, Zhao S, Sun L, et al. Different virulence of Candida albicans is attributed to the ability of escape from neutrophil extracellular traps by secretion of DNase. Am J Transl Res. 2017; 9(1): 50-62.
- 8 - Bonassoli LA, Bertoli M, Svidzinski TI. High frequency of Candida parapsilosis on the hands of healthy hosts. J Hosp Infect. 2005; 59(2): 159-162.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.06.033>
- 9 - Brühwasser C, Hinterberger G, Mutschlechner, W, Kaltseis J, Lass-Flörl C, Mayr A. A point prevalence survey on hand hygiene, with a special focus on Candida species. Am J Infect Control. 2016; 44(1): 71-73.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.07.033>

- 10 - Orozco PA, Cortés JA, Parra CM. Colonization by yeasts in newborns and healthcare personnel in a neonatal intensive care unit at a university hospital in Bogotá, Colombia. *Rev Iberoam Micol.* 2009; 26(2): 108-111.  
[https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(09\)70020-8](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(09)70020-8)
- 11 - Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins Vaccari EM, Melo NT. *Tratado de Micologia Médica.* 2002, São Paulo: Sarvier.
- 12 - Estrada-Barraza D, Dávalos Martínez A, Flores-Padilla L, Mendoza-de Elias R, Sánchez-Vargas LO. Comparación entre métodos convencionales, chromAgar Candida y el método de la PCR para identificación de especies de Candida em aislamientos clínicos. *Rev Iberoam Micol.* 2011; 28: 36-42.  
<https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.11.003>
- 13 - Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR, Maiden MCJ, Odds FC. Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis spp. nov.to replace Candida parapsilosis groups II and III. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(1): 284–292.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.284-292.2005>
- 14 - Sánchez M, Colom F. Extracellular DNase activity of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii. *Rev Iberoam Micol.* 2010; 27(1): 10-13.  
<https://doi.org/10.1016/j.riam.2009.11.004>
- 15 - Menezes RP, Riceto EBM, Borges AS, Röder DVB, Pedroso RS. Evaluation of virulence factors of Candida albicans isolated from HIV positive individuals using HAART. *Arch Oral Biol.* 2016; 66: 61-65.  
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.02.004>
- 16 - Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat. Protoc.* 2008; 3(9): 1494–1500.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.141>
- 17 - CLSI. Clinical and laboratory standards institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved standard-M27-A3-S3. Clinical and Laboratory Standards Institute 2008.
- 18 - CLSI. Clinical and laboratory standards institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement. Document M27-S4. Clinical and Laboratory Standards Institute 2012.
- 19 - Tamura NK, Negri MF, Bonassoli LA, Svidzinski TI. Virulence factors for Candida spp. recovered from intravascular catheters and hospital workers hands. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007; 40(1): 91-93.  
<https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000100021>



- 20 - Gomes CC, Guimarães LS, Pinto LCC, Camargo GADCG, Valente MIB, Sarquis MIM. Investigations of the prevalence and virulence of *Candida albicans* in periodontal and endodontic lesions in diabetic and normoglycemic patients. *J Appl Oral Sci.* 2017; 25(3): 274-281.  
<https://doi.org/10.1590/1678-7757-2016-0432>
- 21 - Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2012; 36(2): 288-305.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x>
- 22 - Beyda ND, Chuang SH, Alam MJ, et al. Treatment of *Candida famata* bloodstream infections: case series and review of the literature. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68(2): 438-443. <https://doi.org/10.1093/jac/dks388>
- 23 - Raturi S, Chandran S, Viswanathan R. A case of *Candida famata* sepsis in a very low birth weight infant successfully treated with fluconazole following antifungal susceptibility testing. *Med J Dr DY Patil Univ* 2015; 8: 528-530.  
<https://doi.org/10.4103/0975-2870.160828>
- 24 - Treviño-Rangel RJ, Rodríguez-Sánchez IP, Rosas-Taraco AG, Hernández-Bello R, González JG, González GM. Biofilm formation and genetic variability of BCR1 gene in the *Candida parapsilosis* complex. *Rev Iberoam Micol.* 2015; 32(3): 180-184.  
<https://doi.org/10.1016/j.riam.2014.11.001>
- 25 - Alenzi FQ. Virulence factors of *Candida* species isolated from patients with urinary tract infection and obstructive uropathy. *Pak J Med Sci.* 2016; 32(1): 143-146.
- 26 - Razzaghi-Abyaneh M, Sadeghi G, Zeinali E, et al. Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from superficial candidiasis in outpatients in Iran. *J Mycol Med.* 2014; 24(2): e43-50.  
<https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.01.004>
- 27 - Liao X, Qiu H, Li R, et al. Risk factors for fluconazole resistant invasive candidiasis in intensive care unit patients: an analysis from the China survey of candidiasis study. *J Crit Care.* 2015; 30(4): 862.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2015.04.002>
- 28 - Savastano C, De Oliveira Silva E, Gonçalves LL, Nery JM, Silva NC, Dias AL. *Candida glabrata* among *Candida* spp. from environmental health practitioners of a Brazilian Hospital. *Braz J Microbiol.* 2016; 47(2): 367-372.  
<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.05.001>

## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, R. R.; AGARWAL, R. L.; CHEN, X.; LUA, J. L.; ANG, J. Y. Epidemiology of Invasive Fungal Infections at Two Tertiary Care Neonatal Intensive Care Units Over a 12-Year Period (2000-2011). **Glob Pediatr Health.**, EUA, v. 4, Mar 2017.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Critérios Diagnósticos de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde Neonatologia**. 1ª ed., 2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a1a48200443f494ab438b64e461d9186/Modulo+3+-+Neonatologia.pdf?MOD=AJPERES>. Acessado em: 20 Abr 2016.
- AKEME YAMAMOTO, A. C.; DE PAULA, C. R.; DIAS, L. B.; TADANO, T.; MARTINS, É. R.; AMADIO, J. V.; HAHN, R. C. Epidemiological and clinical characteristics of nosocomial candidiasis in university hospitals in Cuiabá--Mato Grosso, Brazil. **Rev Iberoam Micol.**, Barcelona, v. 29, n. 3, p. 164-168, Jul-Set 2012.
- AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **J Med Microbiol**, London, v. 55, p. 999- 1008, Ago 2006.
- AMARAL-LOPES, S.; MOURA, A. Neonatal fungal sepsis by *Candida krusei*: A report of three cases and a literature review. **Medical Mycology Case Reports**, Amsterdam, v. 1, n. 1, p. 24–26, Abr 2012. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2012.04.002>
- ANTHONY, M.; BEDFORD-RUSSELL, A.; COOPER, T.; FRY, C.; HEATH, P. T.; KENNEA, N.; MCCARTNEY, M.; PATEL, B.; POLLARD, T.; SHARLAND, M.; WILSON, P. Managing and preventing outbreaks of Gram-negative infections in UK neonatal units. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, London, v. 98, n. 6, p. F549-553, Nov 2013. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2012-303540>
- APGAR, V. A. A Proposal for a New Method of Evaluation of the Newborn Infant. **Anesth Analg**, Cleveland, v. 32, p. 250-259, Jul 1953. <https://doi.org/10.1213/00000539-195301000-00041>
- ARIKAN, S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. **Med Mycol**, Oxford, v. 45, n. 7, p. 569-587, Nov 2007. <https://doi.org/10.1080/13693780701436794>
- ARSENAULT, A. B.; BLISS, J. M. Neonatal Candidiasis: New Insights into an Old Problem at a Unique Host-Pathogen Interface. **Curr Fungal Infect Rep.**, Philadelphia, v. 9, n. 4, p. 246-252, Dez 2015.
- BACELO, K. L.; COSTA, K. R. C.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C.. Biotype stability of *Candida albicans* isolates after culture storage determined by randomly amplified polymorphic DNA and phenotypical methods. **Mycoses**, Berlin, v. 53, n. 6, p. 468-474, Nov 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2009.01741.x>
- BALLOT, D. E.; BOSMAN, N.; NANA, T.; RAMDIN, T.; COOPER, P. A. Background changing patterns of neonatal fungal sepsis in a developing country. **J Trop Ped**, London, v. 59, n. 6, p. 460-464, Dez 2013.
- BAPTISTA, M. I.; NONA, J.; FERREIRA, M.; SAMPAIO, I.; ABRANTES, M.; TOMÉ, M. T.; NETO, M. T.; BARROSO, R.; SERELHA, M.; VIRELLA,

D. Invasive fungal infection in neonatal intensive care units: a multicenter survey. **J Chemother.**, Firenze, v. 28, n. 1, p. 37-43, 2016.

BASSYOUNI, R. H.; WEGDAN, A. A.; ABDELMONEIM, A.; SAID, W.; ABO ELNAGA, F.

Phospholipase and Aspartyl Proteinase activities of *Candida* species causing vulvovaginal candidiasis in patients with Type 2 Diabetes Mellitus. **J Microbiol Biotechnol.**, Seoul, v. 25, n. 10, p. 1734-1741, Oct 2015.

BENJAMINA, M. D.; JOLIVETA, E.; DESBOIS, N.; PIGNOLA, J.; KETTERER-MARTINONA, S.; PIERRE-LOUISA, L.; FLECHELLESA, O. Colonisation à levures chez les prématurés de moins de 1500 g hospitalisés en réanimation néonatale. **Archives de Pédiatrie**, Paris, v. 23, p. 887-894, 2016.

BENJAMIN, D. K. JR.; STOLL, B. J.; FANAROFF, A. A.; MCDONALD, S. A.; OH, W.; 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**, Springfield, v. 117, n. 1, p. 84-92, Jan 2006. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-2292>

BENNETT, J. Agentes antimicrobianos: agentes antifúngicos. In: Goodman & Gilman: **As bases farmacológicas da terapêutica** by Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. 11ª Ed. McGraw Hill Interamericana do Brasil, Rio de Janeiro, 2007. Capítulo 48, p. 1103-1144.

BENTLIN, M. R.; RUGOLO, L. M.; FERRARI, L. S.; BRAZILIAN NEONATAL RESEARCH NETWORK (REDE BRASILEIRA DE PESQUISAS NEONATAIS). Practices related to late-onset sepsis in very low-birth weight preterm infants. **J Pediatr**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 2, p. 168-174, Mar-Abr 2015.

BEYDA, N. D.; CHUANG, S. H.; ALAM, M. J.; SHAH, D. N.; NG, T. M.; MCCASKEY, L.; GAREY, K. W.

Treatment of *Candida famata* bloodstream infections: case series and review of the literature. **J Antimicrob Chemother.**, New York, v. 68, n. 2, p. 438-443, Feb 2013.

BLANKENSHIP, J. R.; MITCHELL, A. P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Curr Opin Microbiol**, London, v. 9, n. 6, p. 588-594, Dez 2006.

BONATTI, H.; STELZMUELLER, I.; BERGER, N.; LECHNER, M.; GRIF, K.; GELTNER, C.; MARGREITER, R.; LASS-FLO, C. Infections caused by *Candida krusei* in five transplant and two surgical patients. **Surgical Infections**, New York, v. 10, n. 3, p. 265-271, Jun 2009. <https://doi.org/10.1089/sur.2008.073>

BOO, N. Y.; CHEAH, I. G. Factors associated with inter institutional variations in sepsis rates of very-low-birth-weight infants in 34 Malaysian neonatal intensive care units. **Singapore Med J**, Singapura, v. 57, n. 3, p. 144-152, Mar 2016. <https://doi.org/10.11622/smedj.2016056>

CALLEY, J. L.; WARRIS, A. Recognition and diagnosis of invasive fungal infections in neonates. **J Infect.**, London, Supl. 1, S108-S113, Jun 2017.

CANDIDO, R. C.; AZEVEDO, R. V. P.; KOMESU, M. C.. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 33, n. 5, p. 437-442, Sep-Oct 2000.

CANTEY, J. B.; MILSTONE, A. M. Bloodstream Infections Epidemiology and Resistance. **Clin Perinatol**, Philadelphia, v. 42, n. 1, p. 1-16, Mar 2015.  
<https://doi.org/10.1016/j.clp.2014.10.002>

CARDOSO, B. C. **Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis***. 2004. 85f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2004.

CARVALHO, J. K. **Sepse neonatal: o impacto da diversidade genética na evolução clínica e sua aplicabilidade na prevenção da mortalidade em recém-nascidos vulneráveis**. 2012. 145f. Dissertação (Mestrado em saúde da mulher e criança). Instituto Fernandes Figueira, Rio de Janeiro, RJ, 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). National Healthcare Safety Network (NHSN). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/nhsn/about-nhsn/index.html>>. Acesso em: 11 de março de 2016.

CHEN, J.; JIANG, Y.; WEI, B.; DING, Y.; XU, S.; QIN, P.; FU, J. Epidemiology of and risk factors for neonatal candidemia at a tertiary care hospital in western China. **BMC Infect Dis.**, London, v. 16, n. 1, p. 700, Nov 2016.

CLERIHEW, L.; LAMAGNI, T. L.; BROCKLEHURST, P.; MCGUIRE, W. Invasive fungal infection in very low birthweight infants: national prospective surveillance study. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, London, v. 91, n. 3, p. F188-192, Maio 2006.  
<https://doi.org/10.1136/adc.2005.082024>

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement. Document M27-S4. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2012.

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

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J.; BRAZILIAN NETWORK CANDIDEMIA STUDY. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 44, n. 8, p. 2816-2823, Ago 2006.

COSTA, K. R. C.; FERREIRA, J. C.; KOMESU, M. C.; CANDIDO, R. C.. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in oral candidosis: quantitative analysis, exoenzyme activity, and antifungal drug sensitivity. **Mycopathologia**, Amsterdam, v. 167, n. 2, p. 73-79, Feb 2009. <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9154-8>

COTTON, C. M.; MCDONALD, S.; STOLL, B.; GOLDBERG, R. N.; POOLE, K.; BENJAMIN, JR D. K.; NATIONAL INSTITUTE FOR CHILD HEALTH AND

HUMAN DEVELOPMENT NEONATAL RESEARCH NETWORK. The association of third-generation cephalosporin use and invasive candidiasis in extremely low birth-weight infants. **Pediatrics**, Springfield, v. 118, n. 2, p. 717-722, Ago 2006.

CRIVARO, V.; BOGDANOVIĆ, L.; BAGATTINI, M.; IULA, V. D.; CATANIA, M.; RAIMONDI, F.; TRIASSI, M.; ZARRILLI, R. Surveillance of healthcare-associated infections in a neonatal intensive care unit in Italy during 2006–2010. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 152, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-0909-9>

DA COSTA, V. G.; QUESADA, R. M.; ABE, A. T.; FURLANETO-MAIA, L.; FURLANETO, M. C. Nosocomial bloodstream *Candida* infections in a tertiary-care hospital in South Brazil: a 4-years survey. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 178, n. 3-4, p 243-250, Out 2014.

DIEZMANN, S.; COX, C. J.; SCHÖNIAN, G.; VILGALYS, R. J.; MITCHELL, T. G. Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 42, n. 12, p. 5624-5635, Dec 2004.

DIAS, V. M. O. **Infecção relacionada à assistência à saúde precoce em unidade neonatal de alto risco**. 2013. 86f. Dissertação (Mestrado Profissional em Farmacologia Clínica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2013.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev**, Washington, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>

FAVERO, D.; FURLANETO-MAIA, L.; FRANÇA, E. J.; GÓES, H. P.; FURLANETO, M. C. Hemolytic factor production by clinical isolates of *Candida* species. **Curr Microbiol**, New York, v. 62, n. 2, p. 161-166, Sep 2013.

FEJA, K. N.; 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**, St. Louis, v. 147, n. 2, p. 156-161, Ago 2005.

FERREIRA, J.; BOUZADA, M.C.F.; JESUS, L.A.; CORTES, M.C.W.; ARMOND, G.A.; CLEMENTE, W.T.; ANCHIETA, L.M.; ROMANELLI, R.M.C. Evaluation of national health-care related infection criteria for epidemiological surveillance in neonatology. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 4, p. 389-395, 2014.

FRANÇA, E. J.; FURLANETO-MAIA, L.; FURLANETO, M. C. Hemolytic capability and expression of a putative haem oxygenase encoding gene by blood isolates of *Candida tropicalis* are influenced by iron deprivation and the presence of hemoglobin and erythrocytes. **Microb Pathog.**, London, v. 105, p. 235-239, Abr 2017.

FU, J.; DING, Y.; WEI, B.; WANG, L.; XU, S.; QIN, P.; WEI, L.; JIANG, L. Epidemiology of *Candida albicans* and non-*C. albicans* of neonatal candidemia at a tertiary care hospital in western China. **BMC Infect Dis**, London, v. 17, n. 1, p. 329, May 2017. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2423-8>

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clin Microbiol Rev**, Washington, v. 12, n. 4, p. 501-517, Out 1999.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Phisiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia. **J Bras Patol Med Lab**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 3, p. 225-234, Jun 2010.

GONDIM, B.A.; DE BRITO, D. V. D.; BRITO, C. S.; VON DOLINGER, E. J. O.; ABDALLAH, V. O. S.; GONTIJO FILHO, P. P. Fatores de risco para colonização e sepse por *Candida albicans* e *Candida não albicans* em neonatos críticos. **Arq Ciênc Saúde**, v. 16, n. 3, p. 105-109, Jul-Set 2009.

HAMMOUD, M. S.; AL-TAIAR, A.; AL-ABDI, S. Y.; BOZAID, H.; KHAN, A.; ALMUHAIRI, L. M.; REHMAN, M. U. Late-onset neonatal sepsis in Arab states in the Gulf region: two-year prospective study. **Int J Infect Dis**, Hamilton, v. 55, p. 125-130, Fev 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.01.006>

HAWSER, S. P.; DOUGLAS, L. J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. **Infect Immun**, Washington, v. 62, n. 3, p. 915-921, Mar 1994.

HERNÁNDEZ-CASTRO, R.; ARROYO-ESCALANTE, S.; CARRILLO-CASAS, E. M.; MONCADA-BARRÓN, D.; ALVAREZ-VERONA, E.; HERNÁNDEZ DELGADO, L.; TORRES-NARVÁEZ, P.; LAVALLE-VILLALOBOS, A. Outbreak of *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: a health care workers source. **Eur J Pediatr**, Berlin, v. 169, n. 7, p. 783-787, Jul 2010. <https://doi.org/10.1007/s00431-009-1109-7>

HORNIK, C. P.; FORT, P.; CLARK, R. H.; WATT, K.; BENJAMIN, D. K. JR.; SMITH, P. B.; MANZONI, P.; JACQZ-AIGRAIN, E.; KAGUELIDOU, F.; COHEN-WOLKOWIEZ, M. Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. **Early Hum Dev**, Amsterdam, v. 88, n. 2, p. 69-74, Maio 2012. [https://doi.org/10.1016/S0378-3782\(12\)70019-1](https://doi.org/10.1016/S0378-3782(12)70019-1)

IZQUIERDO, G.; SANTOLAYA, M. E. Invasive candidiasis in newborns: diagnosis, treatment and prophylaxis. **Rev Chilena Infectol**, Santiago, v. 31, n. 1, p. 73-83, Fev 2014. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000100011>

JUYAL, D.; ADEKHANDI, S.; NEGI, V.; SHARMA, N. An outbreak of neonatal candidemia due to non-*albicans* *Candida* species in a resource constrained setting of Uttarakhand state, India. **J Clin Neonatol**, Mumbai, v. 2, n. 4, p. 183-6, Oct 2013. <https://doi.org/10.4103/2249-4847.123098>

KAUFMAN, D. A.; BROWN, A. T.; EISENHUTH, K. K.; YUE, J.; GROSSMAN, L. B.; HAZEN, K. C. More serious infectious morbidity and mortality associated with simultaneous candidemia and coagulase-negative staphylococcal bacteremia in neonates and *in vitro* adherence studies between *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. **Early Hum Dev**, Amsterdam, v. 90, n. 1, p. S66-70, Mar 2014. [https://doi.org/10.1016/S0378-3782\(14\)70021-0](https://doi.org/10.1016/S0378-3782(14)70021-0)



- KAYANGE, N.; KAMUGISHA, E.; MWIZAMHOLYA, D. L.; JEREMIAH, S.; MSHANA, S. E. Predictors of positive blood culture and deaths among neonates with suspected neonatal sepsis in a tertiary hospital, Mwanza – Tanzania. **BMC Pediatr**, London, v. 10, p. 39, Jun 2010. <https://doi.org/10.1186/1471-2431-10-39>
- KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R. O. *Candida* infections of medical devices. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington; v. 11; n.17; p. 255-267; Apr 2004.
- KOPELMAN, B. I.; et al. **Diagnóstico e tratamento em neonatologia**. São Paulo: Atheneu, 2004.
- KUHN, D. M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 2, p. 878-888, Fev 2002. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.2.878-888.2002>
- KUMAMOTO, C. A. *Candida* biofilms. **Curr Opin Microbiol**, London, v. 5, n. 6, p. 608-611, Dez 2002.
- KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie Leeuwenhoek**, Amsterdam; v. 73; n. 4; p. 331-371; May 1998.
- LAI, C.C., WANG, C.Y., LIU, W.L., HUANG, Y.T., HSUEH, P.R. Time to positivity of blood cultures of different *Candida* species causing fungaemia. **J Med Microbiol**, London, v. 61, n. 5, p. 701–704, May 2012. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.038166-0>
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**, 9ª ed. São Paulo; Sarvier; 2002.
- LAHKAR, V.; SAIKIA, L.; PATGIRI, S. J.; NATH, R.; DAS P. P. Estimation of biofilm, proteinase & phospholipase production of the *Candida* species isolated from the oropharyngeal samples in HIV-infected patients. **Indian J Med Res**, New Delhi, v. 145, n. 5, p. 635-640, Mai 2017.
- LATTIF, A. A.; MUKHERJEE, P. K.; CHANDRA, J.; SWINDELL, K.; LOCKHART, S. R.; DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A.; GHANNOUM, M. A. Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*. **Int J Med Microbiol**, Jena, v. 300, n. 4, p. 265-270, Abr 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.09.001>
- LEE, J. H.; HORNIK, C. P.; BENJAMIN, D. K. JR.; HERRING, A. H.; CLARK, R. H.; COHEN-WOLKOWIEZ, M.; SMITH, P. B. Risk factors for invasive candidiasis in infants >1500 g birth weight. **Pediatr Infect Dis J**, Baltimore, v. 32, n. 3, p. 222-226, Mar 2013.
- LI, Y. H.; TIAN, X. L. *Quorum Sensing* and bacterial social interactions in biofilms. **Sensors**, Suíça, v. 12, n. 3, p. 2519-2538, 2012.
- LOCKHART, S. R.; IQBAL, N.; CLEVELAND, A. A.; FARLEY, M. M.; HARRISON, L. H.; BOLDEN, C. B, et al. Species identification and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance in

two US cities. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 50, p. 3435-3442, 2012.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.01283-12>

LÓPEZ, C.; GIRO, L.; RAMOS, L.; RAMADÁN, S.; BULACIO, L. Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. **Rev Argent Microbiol**, Buenos Aires, v. 37, n. 1, p. 16-21, Jan-Mar 2005.

LOVERO, G.; DE GIGLIO, O.; MONTAGNA, O.; DIELLA, G.; DIVENUTO, F.; LOPUZZO, M.; RUTIGLIANO, S.; LAFORGIA, N.; CAGGIANO, G.; MONTAGNA, M. T. Epidemiology of candidemia in neonatal intensive care units: a persistent public health problem. **Ann Ig.**, Roma, v. 28, n. 4, p. 282-287, Jul-Ago 2016.

MACHARASHVILI, N.; KOURBATOVA, E.; BUTSASHVILI, M.; TSERTSVADZE, T.; MCNUTT, L.; LEONARD, M. K. Etiology of neonatal blood stream infections in Tbilisi, Republic of Georgia. **Int J Infect Dis**, Hamilton, v. 13, n. 4, p. 499-505, Jul 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2008.08.020>

MAERTENS, J. A. History of the development of azole derivatives. **Clin Microbiol Infect**, London, v. 10, Suppl 1, p. 1-10, Mar 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1470-9465.2004.00841.x>

MALANI, A.N.; PSARROS, G.; MALANI, P.N.; KAUFFMAN, C.A. Is age a risk factor for *Candida glabrata* colonisation? **Mycoses**, Berlin, v. 54, n. 6, p. 531-537, Nov 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01941.x>

MANDELBLAT, M.; FRENKEL, M.; ABBEY, D.; BEN AMI, R.; BERMAN, J.; SEGAL, E. Phenotypic and genotypic characteristics of *Candida albicans* isolates from bloodstream and mucosal infections. **Mycoses**, Berlin, v. 60, n. 8, p. 534-545, Aug 2017. <https://doi.org/10.1111/myc.12623>

MARRETO, J. P. M. **Caracterização da candidemia por *C. parapsilosis* (sensu latu) em recém-nascido: aspectos epidemiológicos, clínicos, moleculares e susceptibilidade a antifúngicos**. 2014. 77f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2014.

MATTHEW, E.; ROUSSOS, N.; KONSTANTINOS, Z. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. **Inter. J. Infect. Dis.**, London, v. 14, n. 21, p. 954-966, Nov 2010.

MARCHANT, E. A.; et al. Neonatal sepsis due to Coagulase-negative *Staphylococci*. **Clin Dev Immunol**, Cairo, doi: 10.1155/2013/586076, Mar 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/586076>

MARCOS-ZAMBRANO, L. J.; ESCRIBANO, P.; BOUZA, E.; GUINEA, J. Aplicación de las técnicas de tipificación molecular al estudio de brotes hospitalarios de candidemia. **Rev Iberoam Micol**, Barcelona, v. 31, n. 2, p. 97-103, Abr-Jun 2014. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.06.003>

MENEZES, R. P. **Avaliação da frequência, atividade enzimática e sensibilidade a antifúngicos de leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal de**



**pacientes portadores do HIV.** 2014, 107f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2014.

MOTTA, A. L.; ALMEIDA, G. M.; ALMEIDA J. N.; BURATTINI, M. N.; ROSSI, F. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. **Braz. J. Infect. Dis.**, Salvador, v. 14, n. 5, p. 441-448, Oct 2010.

MUKHERJEE, P. K.; CHANDRA, J. *Candida* biofilm resistance. **Drug Resist Updat**, Philadelphia, v. 7, n. 4-5, p. 301-309, Ago-Out 2004. <https://doi.org/10.1186/cc10574>

MUSKETT, H.; SHAHIN, J.; EYRES, G.; HARVEY, S.; ROWAN, K.; HARRISON, D. Risk factors for invasive fungal disease in critically ill adult patients: a systematic review. **Crit Care**, London, v. 15, n. 6, p. R287, Nov 2011.

NAMBIAR, S.; SINGH, N. Change in epidemiology of health care associated infections in a neonatal intensive care unit. **Pediatr Infect Dis J**, Baltimore, v. 21, n. 9, p. 839-842, Set 2002.

NGUYEN, K.; ZMETER, G.; CLARIS, O.; KASSAI, B. Epidemiology of invasive *Candida* infection in a neonatal intensive care unit in France. **Acta Paediatrica**, Stockholm, v. 101, n. 3, p. 137-139, Mar 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2011.02514.x>

NIKAWA, H. The role of saliva and serum in *Candida albicans* biofilm formation on denture acrylic surfaces. **Microb Ecol Health Dis**. v. 9, p. 35-48, 2003. <https://doi.org/10.3109/08910609609167727>

NOUR, I.; ELDEGLA, H. E.; NASEF, N.; SHOUMAN, B.; ABDEL-HADY, H.; SHABAAN, A. E. Risk factors and clinical outcomes for carbapenem-resistant Gram-negative late-onset sepsis in a neonatal intensive care unit. **J Hosp Infect**, New York, v. 97, n. 1, p. 52-58, Set 2017.

PACETTI, S. A.; GELONE, S. P. Caspofungin acetate for treatment of invasive fungal infections. **Ann Pharmacother**, Cincinnati, v. 37, n. 1, p. 90-98, Jan 2003. <https://doi.org/10.1345/aph.1C114>

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol Rev**, Washington, v. 20, n. 1, p. 133-163, Jan 2007. <https://doi.org/10.1128/CMR.00029-06>

PFALLER, M.A., DIEKEMA, D.J., GIBBS, D.L., NEWELL, V.A., NG, K.P., COLOMBO, A.L., FINQUELIEVICH, J., BARNES, R., *et al.* Geographic and Temporal Trends in Isolation and Antifungal Susceptibility of *Candida parapsilosis*: a Global Assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 3, p. 842-849, 2008. <https://doi.org/10.1128/JCM.02122-07>

PERLMAN, S. E.; SAIMAN, L.; LARSON, E. L. Risk factors for late-onset health care-associated bloodstream infections in patients in neonatal intensive care units. **Am J Infect Control**, St. Louis, v. 35, n. 3, p. 177-182, Abr 2007.

PORTE, L.; LEÓN, P.; GÁRATE, C.; GUZMÁN, A.M.; LABARCA, J.; GARCÍA, P. Susceptibilidad a azoles y anfotericina B de aislados de *Candida* spp. Experiencia de

una red de salud universitaria, entre 2004 y 2010. **Rev Chil Infect**, Santiago, v. 29, n. 2, p. 149-155, 2012. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182012000200005>

PORTELA, M. B.; LIMA DE AMORIM, E.; SANTOS, A. M.; CURVELO, A. R.; DE OLIVEIRA MARTINS, K.; CAPILLÉ, C. L.; SOARES, M. A. R.; BARBOSA, A. C. G. F. *Candida* species from oral cavity of HIV infected children exhibit reduced virulence factors in the HAART era. **Microb Pathog.**, London, v. 102, p. 74-81, Jan 2017.

RATURI, S.; CHANDRAN, S.; VISWANATHAN R. A case of *Candida famata* sepsis in a very low birth weight infant successfully treated with fluconazole following antifungal susceptibility testing. **Med J Dr DY Patil Univ**, v. 8, n. 4, p. 528-530, Jul 2015. <https://doi.org/10.4103/0975-2870.160828>

RESENDE, D. S.; PEPPE, A. L.; DOS REIS, H.; ABDALLAH, V. O.; RIBAS, R. M.; GONTIJO FILHO, P. P.

Late onset sepsis in newborn babies: epidemiology and effect of a bundle to prevent central line associated bloodstream infections in the neonatal intensive care unit. **Braz J Infect Dis.**, Salvador, v. 19, n. 1, p. 52-57, Jan-Fev 2015.

RICETO, E. B.; MENEZES, R. P.; PENATTI, M. P.; PEDROSO, R. S. Enzymatic and hemolytic activity in different *Candida* species. **Rev Iberoam Micol., Barcelona**, v. 32, n. 2, p. 79-82, Abr-Jun 2015.

ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C. **Drogas antifúngicas utilizadas na terapêutica contemporânea. In: Micologia Médica à luz de autores contemporâneos.** Guanabara-Koogan AS, Rio de Janeiro, 2004.

RODRIGUEZ, D.; ALMIRANTE, B.; PARK, B. J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PLANES, A. M.; SANCHEZ, F.; GENE, A.; XERCAVINS, M.; FONTANALS, D.; RODRIGUEZTUDELA, J. L.; WARNOCK, D. W.; PAHISSA, A.; BARCELONA CANDIDEMIA PROJECT STUDY GROUP. Candidemia in neonatal intensive care units: Barcelona, Spain. **Pediatr Infect Dis J**, Baltimore, v. 25, n. 3, p. 224-229, Mar 2006.

ROILIDES, E. Invasive candidiasis in neonates and children. **Early Human Development**, v. 87, p. 75-76, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2011.01.017>

SAIMAN, L.; LUDINGTON, E.; DAWSON, J. D.; PATTERSON, J. E.; RANGEL-FRAUSTO, S.; WIBLIN, R. T.; BLUMBERG, H. M.; PFALLER, M.; RINALDI, M.; EDWARDS, J. E.; WENZEL, R. P.; JARVIS, W.; NATIONAL EPIDEMIOLOGY OF MYCOSES STUDY GROUP. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. **Pediatr Infect Dis J**, Baltimore, v. 20, n. 12, p. 1119-1124, Dez 2001.

SAIMAN, L.; LUDINGTON, E.; PFALLER, M.; RANGEL-FRAUSTO, S.; WIBLIN, R. 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. The National Epidemiology of Mycosis Survey study group. **Pediatr Infect Dis J**, Baltimore, v. 19, n. 4, p. 319-324, Abr 2000.

SANCHIS, M.; GUARRO, J.; SUTTON, D. A.; FOTHERGILL, A. W.; WIEDERHOLD, N.; CAPILLA, J.

Voriconazole and posaconazole therapy for experimental *Candida lusitanae* infection. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, New York, v. 84, n. 1, p. 48-51, Jan 2016.

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

SÁNCHEZ, M.; COLOM, F. Extracellular DNase activity of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Rev. Iberoamericana de Micologia**, Barcelona, v. 27, n. 1, p. 10-13, Jan-Mar 2010. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2009.11.004>

SANCHEZ, B. A. A.; SIBAJA A. P.; CAMACHO, R. A.; GUEVARA E. *E.Candida famata* mediastinitis. A rare complication of open heart surgery. Case report and briefreview. **IDCases.**, Amsterdam, v. 5, p. 37-39, Jul 2016.

SARDI, J. C.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES GIANNINI, M. J. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **J Med Microbiol**, London, v. 62, n. 1, p. 10-24, Jan 2013. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.045054-0>

SCHAEFER, T. I. M. **Avaliação das condições da pele do recém-nascido em terapia intensiva neonatal**. 2014. 78f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2014.

SELLAMI, A.; SELLAMI H.; NEJI, S.; MAKNI, F.; ABBES, S.; CHEIKHROUHO, F.; CHELLY, H.; BOUAZIZ, M.; HAMMAMI, B.; BEN JEMAA, M.; KHALED, S.; AYADI, A. Antifungal Susceptibility of Bloodstream *Candida* Isolates in Sfax Hospital: Tunisia. **Mycopathologia**, New York, v. 171, n. 6, p. 417-422, Jun 2011.

SENEVIRATNE, C. J.; RAJAN, S.; WONG, S. S.; TSANG, D. N.; LAI, C. K.; SAMARANAYAKE, L. P.; JIN, L. Antifungal susceptibility in serum and virulence determinants of *candida* blood stream isolates from Hong Kong. **Front Microbiol.**, Suíça, v.26, p. 7-216, Fev 2016.

SHANE, A. L.; STOLL, B. J. Neonatal sepsis: progress towards improved outcomes. **J Infect.**, London, v. 68, n. 1, p. S24-32, Jan 2014.

SILVA, C. M. **Candidemia em neonatos: epidemiologia, perfil de susceptibilidade antifúngica e avaliação dos fatores de virulência dos agentes etiológicos**. 2015. 119f. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2015.

SILVA, S. C. M. **Virulence factors of non-*Candida albicans* *Candida* species**. 2010. 253f. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica). Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2010.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Trends Microbiol**, Cambridge, v. 19, n. 5, p. 241-247, May 2011. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.02.003>

SOARES, L. P. M. A.; OLIVEIRA, R. T.; CARNEIRO, I. C. R. S. Infecções da corrente sanguínea por *Candida* spp. em unidade neonatal de hospital de ensino da

Região Norte do Brasil: estudo dos fatores de risco. **Rev Pan-Amaz Saúde**, Manaus, v. 4, n. 3, p. 19-24, Set 2013.

SOUZA, A. B. G., et al. **Enfermagem Neonatal: Cuidado integral ao recém-nascido**. 1. ed., São Paulo: Martinari, 2011.

STEINBACH, W. J.; ROILIDES, E.; BERMAN, D.; HOFFMAN, J. A.; GROLL, A. H.; BIN-HUSSAIN, I.; PALAZZI, D. L.; CASTAGNOLA, E.; HALASA, N.; VELEGRAKI, A.; DVORAK, C. C.; CHARKABARTI, A.; SUNG, L.; DANZIGER-ISAKOV, L.; LACHENAUER, C.; ARRIETA, A.; KNAPP, K.; ABZUG, M. J.; ZIEBOLD, C.; LEHRNBECHER, T.; KLINGSPOR, L.; WARRIS, A.; LECKERMAN, K.; MARTLING, T.; WALSH, T. J.; BENJAMIN, D. K. JR.; ZAOUTIS, T. E.; INTERNATIONAL PEDIATRIC FUNGAL NETWORK. Results from a prospective, international, epidemiologic study of invasive candidiasis in children and neonates. **Pediatr Infect Dis J**, Baltimore, v. 31, n. 12, p. 1252-1257, Dez 2012.

TAIRA, C. L.; OKAY, T. S.; DELGADO, A. F.; CECCON, M. E.; DE ALMEIDA M. T.; DEL NEGRO, G. M. A multiplex nested PCR for the detection and identification of *Candida* species in blood samples of critically ill paediatric patients. **BMC Infect Dis**, London, Jul 2014, doi: 10.1186/1471-2334-14-406. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-406>

TAVANTI, A. A. D.; DAVIDSON, N. A. R.; GOW, M. C. J.; MAIDEN, F. C.; ODDS. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 43, n. 1, p. 284–292, Jan 2005. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.284-292.2005>

TEKIN, R.; DAL, T.; PIRINCCIOGLU, H.; OYGUCU, S. E. A 4-Year Surveillance of Device-associated Nosocomial Infections in a Neonatal Intensive Care Unit. **Pediatr Neonatol**, Singapore, v. 54, n. 5, p. 303-308, Out 2013.

TESTONI, D.; SMITH, P. B.; BENJAMIN JR.; D. K. The use of antifungal therapy in Neonatal Intensive Care. **Clin Perinatol**, v. 39, n. 1, p. 83–98, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2011.12.008>

TOMAZ, V. S.; CAMPOS NETO, F. H.; ALMEIDA, P. C.; MAIA, R. C. F.; MONTEIRO, W. M. S.; CHAVES, E. M. C. Medidas de prevenção e controle de infecções neonatais: opinião da equipe de enfermagem. **Rev Rene**, Fortaleza, v. 12, n. 2, p. 271-278, abr-jun 2011.

TROFA, D.; GÁCSE, A.; NOSANCHINK, J. D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. **Clin Microbiol Rev**, Washington, v. 21, n. 4, p. 606-625, Out 2008.

TSAI, M. H.; CHU, S. M.; LEE, C. W.; HSU, J. F.; HUANG, H. R.; CHIANG, M. C.; FU, R. H.; LIEN, R.; HUANG, Y. C. Recurrent late-onset sepsis in the neonatal intensive care unit: incidence, clinical characteristics and risk factors. **Clin Microbiol Infect**, London, v. 20, n. 11, p. O928-935, Nov 2014.

TSAI, M. H.; WU, I. H.; LEE, C. W.; CHU, S. M.; LIEN, R.; HUANG, H. R.; CHIANG, M. C.; FU, R. H.; HSU, J. F.; HUANG, Y. C. Neonatal gram-

negative bacillary late-onset sepsis: A case-control-control study on a prospectively collected database of 5,233 admissions. **Am J Infect Control**, St. Louis, v. 44, n. 2, p. 146-153, Fev 2016. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12661>

TSENG, T. Y.; CHEN, T. C.; HO, C. M.; LIN, P. C.; CHOU, C. H.; TSAI, C. T.; WANG, J. H.; CHI, C. Y.; HO, M. W. Clinical features, antifungal susceptibility, and outcome of *Candida guilliermondii* fungemia: An experience in a tertiary hospital in mid-Taiwan. **J Microbiol Immunol Infect.**, Taiwan, v. 1182, n. 17, p. 30050-30056, Mai 2017.

TZIALLA, C.; BORGHESI, A.; SERRA, G.; STRONATI, M.; CORSELLO, G. Antimicrobial therapy in neonatal intensive care unit. **Ital J Pediatr**, London, v. 41, n. 27, p. Abr 2015.

URZÚA, S.; FERRÉS, M.; GARCÍA, P.; SÁNCHEZ, A.; LUCO, M. Strategies to reduce infections and antibiotic use and its effects in a neonatal care unit. **Rev Chilena Infectol**, Santiago, v. 34, n. 2, p. 99-107, Apr 2017. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182017000200001>

VAN ASBECK, E. C.; HUANG, Y. C.; MARKHAM, A. N.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 164, n. 6, p. 287-293, Dez 2007.

VON DOLINGER DE BRITO, D.; DE ALMEIDA SILVA, H.; JOSE OLIVEIRA, E.; ARANTES, A.; ABDALLAH, V. O.; TANNUS JORGE, M.; GONTIJO FILHO, P. P. Effect of neonatal intensive care unit environment on the incidence of hospital-acquired infection in neonates. **J Hosp Infect**, New York, v. 65, n. 4, p. 314-318, Abr 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2006.01.038>

ZHANG, X.; ZHAO, S.; SUN, L.; LI, W.; WEI, Q.; ASHMAN, R. B.; HU, Y. Different virulence of *Candida albicans* is attributed to the ability of escape from neutrophil extracellular traps by secretion of DNase. **Am J Transl Res**. Madison, v. 9, n. 1, p. 50-62, Jan 2017.

## ANEXO A – PARECER COMITÊ DE ÉTICA COM PESQUISA EM SERES HUMANOS - UFU



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Candidíase invasiva em neonatos críticos: etiologia, patogenia e perfil molecular

**Pesquisador:** Ralciane de Paula Menezes

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 40921314.4.0000.5152

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 989.139

**Data da Relatoria:** 05/02/2015

#### Apresentação do Projeto:

Conforme apresenta o protocolo: A hipótese apresentada pelos pesquisadores é a seguinte: "A hipótese do estudo é que os casos de infecção por *Candida* spp. podem ser desencadeados por microrganismos já presentes na microbiota do neonato, ou na microbiota da pele dos profissionais do setor, ou na microbiota da pele dos responsáveis pelos neonatos, ou ainda por microrganismos presentes no ambiente hospitalar."

Os pesquisadores resumem a pesquisa da seguinte forma: "A ocorrência e as espécies de *Candida* que são responsáveis pela candidíase invasiva em neonatos variam entre as diferentes regiões do planeta. Esse tipo de infecção é considerado um problema de saúde pública mundial devido a sua morbimortalidade, principalmente entre os neonatos críticos, já que em função de sua maior suscetibilidade resultantes da imaturidade imunológica e por requererem cateteres vasculares para administração de alimento e medicamentos. Considerando a importância de traçar o perfil dos isolamentos de espécies de *Candida* em UTINs de diversas regiões do Brasil, e determinar a prevalência das diferentes espécies, e ainda a situação da resistência aos antifúngicos, propomos a realização do presente trabalho com os seguintes objetivos: verificar as espécies de *Candida*

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br





UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
UBERLÂNDIA/MG



Continuação do Parecer: 989.139

responsáveis pelos casos de candidíase invasiva e candidemia dos neonatos internados na UTIN entre junho de 2015 a maio de 2017; avaliar a importância potencial da colonização da pele no sítio de inserção do CVC, do canhão do cateter e das mucosas oral e intestinal na patogênese das infecções sanguíneas relacionadas à CVCs; verificar se, na ocorrência de candidíase invasiva, o microrganismo causador da infecção está no ambiente hospitalar; determinar os principais fatores de risco para o desenvolvimento de candidíase invasiva nos neonatos internados na UTIN durante o período de estudo; caracterizar fenotipicamente os isolados de *Candida* spp.; determinar a sensibilidade dos isolados aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol, voriconazol e 5-fluorocitosina, utilizando o sistema Vitek 2; diferenciar os isolados identificados através dos testes fenotípicos como *C. albicans* em *C. albicans* e *C. dubliniensis*, assim como aqueles isolados identificados como *C. parapsilosis* em *C. parapsilosis* stricto sensu, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, utilizando testes moleculares e analisar o perfil molecular dos isolados de *Candida* spp., pelas metodologia de RAPD-PCR e por marcadores de Microssatélites, e verificar a relação genética entre eles."

#### Objetivo da Pesquisa:

Informam como objetivos:

" Objetivo primário: Traçar o perfil dos isolamentos de espécies de *Candida* na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, e determinar a prevalência das diferentes espécies, e ainda a situação da resistência aos antifúngicos.

Objetivo Secundário:

Fazer a Vigilância Epidemiológica da UTIN durante o período de estudo utilizando o sistema NHSN; Verificar as espécies de *Candida* responsáveis pelos casos de candidíase invasiva e candidemia dos neonatos internados na UTIN durante o período do estudo; Avaliar a importância potencial da colonização da pele no sítio de inserção do CVC, do canhão do cateter e das mucosas oral e intestinal na patogênese das infecções sanguíneas relacionadas à CVCs; Determinar os principais fatores de risco para o desenvolvimento de candidíase invasiva nos neonatos internados na UTIN durante o período de estudo; No caso da ocorrência de um caso índice de candidíase invasiva, investigar a presença da *Candida* spp. no ambiente, nas mãos dos profissionais de saúde em contato direto com o neonato, assim como nas mães (mãos, boca e mamilos); Investigar a ocorrência de colonização por *Candida* spp. nas mucosas oral e intestinal dos neonatos internados na UTIN; Caracterizar fenotipicamente os isolados de *Candida* spp. através da avaliação da morfologia, da pesquisa da produção das exoenzimas hemolisina e DNase e da capacidade de

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144  
UF: MG Município: UBERLÂNDIA  
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 989.139

produção de biofilme por esses isolados; Determinar a sensibilidade dos isolados aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol, voriconazol e 5-fluorocitosina, utilizando o sistema Vitek 2; Diferenciar os isolados identificados através dos testes fenotípicos como *C. albicans* em *C. albicans* e *C. dubliniensis*, assim como aqueles isolados identificados como *C. parapsilosis* em *C. parapsilosis* stricto sensu, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, utilizando testes moleculares;

Analisar o perfil molecular dos isolados de *Candida* spp., pelas metodologias de RAPD-PCR e por marcadores de Microssatélites, e verificar a relação genética entre eles."

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo os pesquisadores:

Riscos:

O risco existente durante a realização da pesquisa é o da revelação da identidade dos participantes. Porém, considerando a conduta e a forma de avaliar os dados dos indivíduos que participarem da pesquisa, esse evento será reduzido ao mínimo. A identidade desses será mantida sob sigilo profissional, em todas as instâncias, sendo conhecida apenas pelos pesquisadores principais e pelo médico especialista que acompanha os pacientes.

Benefícios:

Como benefício, a pesquisa permitirá conhecer a colonização por espécies de *Candida* tanto entre os recém nascidos admitidos na UTIN quanto naqueles que vierem a desenvolver infecção sistêmica por *Candida* spp., fornecendo informações sobre a incidência e epidemiologia de colonização e infecção, além de conhecer a patogenicidade das espécies de *Candida* isoladas.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A metodologia informada é a seguinte:

"Desenho do estudo Pesquisa de colonização nas mucosas oral e intestinal dos neonatos e das mãos dos profissionais de saúde da UTIN: adicionalmente, serão realizadas dentro do período de estudo, cinco coletas, com intervalo de seis meses entre cada uma, sendo a primeira em junho de 2015, a segunda em dezembro de 2015, terceira em junho de 2016, quarta em dezembro de 2016 e a última em maio de 2017. Nessa ocasião, serão coletadas amostras da mucosa oral e perianal de todos os neonatos internados na UTIN e cujos responsáveis autorizem a coleta após assinatura do TCLE. Além disso, também serão coletadas amostras das mãos dos profissionais de saúde que estejam trabalhando no setor no dia da coleta e que aceitem participar da pesquisa após assinatura do TCLE. Pesquisa de contaminação por *Candida* spp no ambiente da UTIN: na

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
 Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144  
 UF: MG Município: UBERLÂNDIA  
 Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br





Continuação do Parecer: 989.139

ocorrência de um caso índice de infecção por *Candida* spp, serão coletadas amostras do ambiente da UTIN, incluindo o leito, a cabeceira do leito do recém nascido e água do respirador. Caso seja confirmado algum caso de candidíase durante o período de estudo, será realizada coleta de todas as amostras citadas anteriormente, independente de quando foi realizada a última vigilância e quando será a próxima, sendo mantidas as datas das coletas de vigilância determinadas previamente. Pesquisa de colonização por *Candida* spp. nos responsáveis pelos neonatos infectados Além disso, quando confirmada infecção por *Candida* spp., também serão coletadas amostras das mãos e mucosa oral dos responsáveis pelos neonatos com ainfecção, e no caso das mães também serão coletadas amostras da região do mamilo, após a assinatura do TCLE pelos mesmos. Coletas microbiológicas especificamente para a investigação de candidíase invasiva Nos neonatos que apresentarem suspeita de candidíase invasiva e/ou candidemia será coletada amostra do canhão do CVC, assim como a ponta do CVC será analisada quando for retirada. Amostra de estudo: Isolados provenientes de infecções Canhão do cateter Ponta do CVC Mucosa oral e perianal Amostras do ambiente e profissionais Amostras dos responsáveis pelo neonato Isolamento dos microrganismos: Técnica do "vortexing" Técnica Semi- quantitativa de Maki ou "Roll-plate" Estocagem das amostras Identificação das leveduras Testes fenotípicos: Pesquisa de exoenzimas Hemolisina DNase Formação de Biofilme Teste de sensibilidade aos antifúngicos Perfil molecular: Diferenciação de *C. albicans* e *C. dubliniensis* Diferenciação do complexo *C. parapsilosis* Perfil molecular por RAPD-PCR Perfil molecular utilizando marcadores de microssatélites."

**"Critério de Inclusão:**

Serão incluídos nos estudo, todos os recém nascidos que estiverem no serviço de Unidade Terapia Intensiva Neonatal do HC-UFU nos dias estabelecidos para coleta de Vigilância entre junho de 2015 e maio de 2017, aqueles que desenvolverem algum tipo de infecção por *Candida* spp. durante o período de estudo.

**Critério de Exclusão:**

Serão excluídos do estudo aqueles indivíduos cujos responsáveis não concordem com a participação dos mesmos na pesquisa ou que sejam incapazes de assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. Já em relação aos profissionais de saúde do setor, serão excluídos aqueles que não estiverem na Unidade nos dias de realização das coletas de Vigilância e nos dias de coleta após confirmação de algum neonato com candidíase, seja por motivo de folga, férias, afastamento ou que não aceitem participar da

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
 Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144  
 UF: MG Município: UBERLÂNDIA  
 Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 989.139

pesquisa. Em relação aos responsáveis pelos neonatos com infecção por *Candida spp.* confirmada, serão excluídos aqueles que não concordem em participar da pesquisa ou que sejam incapazes de assinar o termo de consentimento livre e esclarecido."

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresenta todos os termos.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Dezembro de 2015.

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Dezembro de 2016.

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Dezembro de 2017.

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: Dezembro de 2018

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
 Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144  
 UF: MG Município: UBERLÂNDIA  
 Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 989.139

**Orientações ao pesquisador :**

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12 ) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e).

UBERLÂNDIA, 17 de Março de 2015

---

**Assinado por:**  
**Sandra Terezinha de Farias Furtado**  
 (Coordenador)

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
 Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144  
 UF: MG Município: UBERLÂNDIA  
 Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br





## ANEXO C – ARTIGO 1 – VERSÃO EM INGLÊS

### **Temporal trends, risk factors, and outcomes in nosocomial infections: an epidemiological study in a neonatal intensive care unit**

RALCIANE DE PAULA MENEZES<sup>1,2</sup>, FELIPE FLÁVIO SILVA<sup>3</sup>, SÁVIA GONÇALVES OLIVEIRA MELO<sup>3</sup>, MURILO BRITO DE OLIVEIRA<sup>4</sup>, PRISCILA GUERINO VILELA ALVES<sup>2</sup>, MELIZA ARANTES BESSA<sup>5</sup>, LÚCIO BORGES ARAÚJO<sup>6</sup>, MARIO PAULO AMANTE PENATTI<sup>1</sup>, REGINALDO DOS SANTOS PEDROSO<sup>1,2</sup>, VÂNIA OLIVETTI STEFFEN ABDALLAH<sup>2</sup>, DENISE VON DOLINGER DE BRITO RÖDER<sup>2,7</sup>

<sup>1</sup>Healthcare Technical School- ESTES, Federal University of Uberlandia (UFU), Uberlandia, MG, Brazil

<sup>2</sup>Health Sciences Postgraduate Program, Faculty of Medicine - FAMED, UFU, Uberlandia, MG, Brazil

<sup>3</sup>Graduate in Nursing, FAMED, UFU, Uberlandia, MG, Brazil

<sup>4</sup>Graduate in Environmental Health Management – Geography Institute (GI), UFU, Uberlandia, MG, Brazil

<sup>5</sup>Graduation in Biology – Biology Institute (INBIO), UFU, Uberlandia, MG, Brazil

<sup>6</sup>Mathematics College- FAMAT, UFU, Uberlandia, MG, Brazil

<sup>7</sup>Biomedical Sciences Institute- ICBIM, UFU, Uberlandia, MG, Brazil

### **Abstract**

Associated with increased survival of preterm infants admitted to Neonatal Intensive Care Units (NICU), is increased invasive infections that can lead to death. The objective of this study was to describe the temporal trend, risk factors, and outcome of invasive infections in a NICU of a hospital of high complexity, emphasizing the differences between bacterial and fungal infections. The study was carried out between January 2013 and December 2016, with daily follow-up of the newborns by the NHSN system. Data were collected such as gestational age (GA), birth weight, use of invasive and antimicrobial devices, infections, and hospitalization. In total of 881 newborns, 214 were found to have bacterial infection, 19 by fungi, and in 12 infants bacterial and fungal infections were confirmed, resulting in a hospital infection rate of 12/1000 patient-days. GA, weight, SNAPE > 24, and use of devices such as catheters, mechanical

ventilation, and parenteral nutrition were statistically significant for bacterial and fungal infections. Death was 2.6 times higher in those with fungal infection than in those with bacterial infection. Occurrence of invasive infections was more meaningful in 2015 and 2016, a period in which Gram-negative bacteria and yeasts were more frequent, impacting morbidity and mortality. These results highlight the importance of constant epidemiological surveillance and measures of effective control of infections in the unit.

**Key words:** NICU, neonates, epidemiological surveillance, bacterial infections, fungal infections

## Introduction

The survival of preterm newborns (NB) in recent years has increased considerably due to the advances and use of technology in medicine, which have allowed the maintenance of the newborn in the hospital environment until it completes its development and maturation of organs and systems<sup>1</sup>. However, neonates in these conditions usually present a serious state of health and, therefore, stay weeks to months in Neonatal Intensive Care Units (NICU) until they are able to be discharged and in this period use several invasive devices to help maintain vital functions and allow the administration of medicines and foods. Their prolonged stay in a hospital environment, together with the various invasive procedures to which they are subjected, and the immature immune system of these neonates, can facilitate the establishment and development of nosocomial infections (NI) by bacteria and fungi, which can be serious and lead to patient death<sup>2-6</sup>.

Gram-positive bacteria are mainly responsible for the occurrence of sepsis in developed countries, with emphasis on *Staphylococcus* coagulase negative (CONS), with *S. epidermidis* the most frequent<sup>7</sup>. However, the occurrence of invasive infections in NB by Gram-negative bacteria and fungi, especially *Candida* spp., has increased considerably in the last decades<sup>6,8,9</sup>. Infections caused by these agents increase hospitalization costs and are associated with higher mortality rates, which can reach 50% when caused by Gram-negative and 34% when triggered by fungi<sup>10,11</sup> and may contribute to the large number of neonates who have neurodegenerative sequelae<sup>9,12</sup>.

Surveillance systems, such as the National Healthcare Safety Network (NHSN), which allow the continuous and daily follow-up of NICU patients, are of great relevance because they allow access to the profile of patients admitted to the unit, infectious syndromes, etiological agents of higher occurrence, and to evaluate which devices are associated with the occurrence of infections at anytime of the year and to detect intercurrents that may compromise proper functioning of the unit<sup>13</sup>. However, despite the importance of daily surveillance, few countries perform this monitoring effectively in the NICU, being more common in developed countries<sup>5</sup>. The objective of this study was to describe the temporal trend, risk factors, and outcome of invasive infections in a NICU of a hospital of high complexity, emphasizing the differences between bacterial and fungal infections.

### **Patients and methods**

The study was carried out in the NICU of a public hospital, tertiary care, reference in the region, which has 520 beds, of which 15 belong to a NICU.

All newborns admitted to the unit for more than 24 hours between January 2013 and December 2016, with voluntary and confidential participation, were included in the study. All NB present at the NICU were monitored daily, from admission to discharge or death, using the NHSN system for the collection of epidemiological data<sup>14</sup>. We collected data such as gestational age, birth weight, Apgar 5', SNAPPEII, previous antimicrobial use, length of hospital stay, and use of invasive devices such as: types of central venous catheters (central catheter for peripheral insertion- PICC, umbilical venous catheter, venous dissection- phlebotomy, intracath), parenteral nutrition, mechanical ventilation, among others). In addition, the NB were evaluated for the utilization density (DU - number of CVC-days/number of patient-days)) of invasive devices to calculate the rate of use for each, and the relationship between infection development and days of exposure to each device was determined. The newborns were grouped into five categories according to birth weight: <750g, 751–1,000g, 1,001–1,500g, 1,501–2,500g, and >2,500g.

Nosocomial infection cases were determined using the definitions of the Centers for Disease Control (CDC)<sup>15</sup>. Patient-days and device-days were collected for central venous catheters (CVC), mechanical ventilation, parenteral nutrition, gavage, drain, and tracheostomy. Descriptive statistics were provided for each year of participation and the



data summated. The incidence of NI (number of patients with at least one NI per 100 patients) and device-associated NI rates (number of device-associated NI per 1,000 device-days) were calculated for each unit and totaled for each year of participation. Additionally, incidence densities of clinically diagnosed and microbiologically confirmed NI were calculated.

Biological samples from sterile organic sites such as blood and cerebrospinal fluid, as well as from other sites such as ocular secretion and urine, were collected based on the clinical parameters established by the medical team. The primary isolation of the microorganism was done in the bactec system, in the case of blood stream samples, and in plaques with specific agar for Gram positive and negative bacteria and fungi. Species level identification as well as antimicrobial susceptibility testing were performed using the Vitek® Biomérieux automated system. Microbiological data were obtained from the Microbiology Sector of the Laboratory of Clinical Analysis of the HC-UFU. Only positive cultures for microorganisms that are generally considered contaminants (eg *Corynebacterium* sp., *Bacillus* sp., *Micrococcus*) were excluded from the study.

The control group of this study was formed by infants admitted to the NICU during the four years of surveillance and who did not present any episode of infection during the time they were hospitalized in the unit.

### **Statistical analysis**

Quantitative variables were described through mean, median, maximum, and minimum standard deviation. The qualitative variables were described (frequency and percentage) by means of double-entry tables and graphs. Risk factors for neonatal bacterial and fungal infection were assessed by univariate logistic regression and multiple logistic regression followed by selection of variables by the *stepwise* method<sup>16</sup>. Comparison of the number of microorganisms isolated from infections in infants hospitalized at the time of the year was done using the multiple comparison test with Boferroni correction<sup>17</sup>. All tests were applied using a significance level of 5% ( $p < 0.05$ ) and the analyses were performed using the SPSS v.20 program.

## Ethics Committee

The research was approved by the Committee of Ethics in Research with Human Beings of the Federal University of Uberlandia (CEP-UFU), with number 989.139/2015.

## Results

Between January 2013 and December 2016, 881 newborns were admitted to the NICU of the Clinical Hospital of the Federal University of Uberlandia, and a total of 18,310 patient-days were registered. Among NB included in the study, 53.9% were male and 56.4% were born with gestational age equal to or less than 34 weeks. Many (34.6%) were considered low birth weight (1500–2499g) and 18.2% were considered to be extremely low weight (<1000g). The main reason for hospitalization of these infants at the unit was weight below 1500g (32.8%), followed by respiratory problems (31.5%). Of the total NB, 73.7% were hospitalized more than seven days in the NICU.

In total of 881 patients, 221 (25%) presented some type of infection, 214 (96.8%) bacterial infection was confirmed, 19 (8.6%) were caused by fungi, and in 12 (5.4%) neonates bacterial and fungal infections were confirmed, resulting in a hospital infection rate equal to 12/1000 patient-days. The rate of bacterial infection per 1000 patient days was 11.6, while the rate of fungal infection per 1000 patient days was equal to one. The most common infection was sepsis (63.8%), followed by conjunctivitis (29.8%) and urinary tract infection (6.7%). Infections in other anatomical sites corresponded to 5.4% of the total infections confirmed during the study period. In 46 (20.8% of all newborn infants) infection was confirmed in two or more anatomical sites.

The utilization density (UD) of devices considered to be at risk for invasive infection was 0.48 for peripheral insertion of a central catheter, 0.09 for umbilical venous catheter, 0.22 for mechanical ventilation, 0.015 for bladder catheter, 0.003 for tracheostomy, and 0.35 for parenteral nutrition. On the other hand, the UD of the devices used in those NB that developed bacterial or fungal infection were 0.23 and 0.03 for PICC, 0.03 for umbilical venous catheter, 0.01 and 0.006 for phlebotomy, 0.01 and 0.002 for intracath, 0.01 and 0.001 for drain, 0.16 and 0.02 for parenteral nutrition,

0.11 and 0.02 for mechanical ventilation, 0.008 and 0.0004 for bladder catheter, and 0.001 and 0.0004 for tracheostomy, respectively.

The usage rates of these devices related to infection/patient days were 18.5 for umbilical venous catheter, 4.13 for PICC, 5.1 for use of parenteral nutrition, and 6.1 for the use of mechanical ventilation.

Table 1 shows the risk factors for bacterial infection and evolution of the state of health of hospitalized neonates for death or discharge during the study period. Statistically significant risk factors for the occurrence of bacterial infection were: mean GA, mean birth weight, SNAPPE II > 24, use and UD of phlebotomy, intracath, PICC, CUV, parenteral nutrition, mechanical ventilation, drainage, bladder catheter, gastric tube beyond the mean length of hospital stay. The time of use of the invasive devices was on average three times higher in the group with bacterial infection when compared to the group of neonates without infection. The hospitalization time of neonates with bacterial infection was twice as long as the group without infection. Use of CUV ( $P = 0.0216$ ) and the density of use of PICC ( $P = 0.0009$ ) were independent risk factors for the development of bacterial infection.

**Table 1** - Risk factors for acquisition of bacterial infection and evolution of neonates hospitalized between 2013–2016

	Without infection(660)	With infection (214)	p value	Univariate Model			Multivariate Model			
				OR	OR (95%CI)		p value	OR	OR (95%CI)	
					Lower	Upper			Lower	Upper
Average GA	33 weeks	32.8 weeks	0.0239*	0.99	0.99	1.00	-	-	-	-
Average weight	1943.12 g	1769.1g	0.0173*	1.00	1.00	1.00	-	-	-	-
Apgar 5'<7	75 (11.3%)	23 (10.8%)	0.3188	0.95	0.87	1.05	-	-	-	-
Snappell>24	146 (22.1%)	85 (38%)	0.0019*	1.01	1.004	1.019	-	-	-	-
Phlebotomy	15(2.3%)	11 (5.1%)	0.0493*	2.19	1.0	4.80	-	-	-	-
UD Phlebotomy	0.008	0.01	0.0101*	1.05	1.01	1.09	-	-	-	-
Intracath	20 (3.0%)	17 (8.0%)	0.0026*	2.78	1.43	5.42	-	-	-	-
UD Intracath	0.01	0.01	0.0003*	1.09	1.04	1.14	-	-	-	-
PICC	351 (53.2%)	181 (84.5%)	0.000*	4.76	3.19	7.11	-	-	-	-
UD PICC	0.23	0.23	0.000*	1.08	1.07	1.10	0.0009*	1.03	1.01	1.05
UVC	240 (36.7%)	106 (49.5%)	0.0008*	1.70	1.25	2.33	0.0216*	0.60	0.38	0.93
UD UVC	0.06	0.03	0.000*	1.11	1.06	1.17	-	-	-	-
Parenteral Nutrition	281(42.6%)	159 (74.3%)	0.000*	3.85	2.74	5.43	-	-	-	-
UD Parenteral Nutrition	0.17	0.16	0.000*	1.09	1.07	1.10	-	-	-	-
Mechanical ventilation	266 (40.3%)	138 (64.5%)	0.000*	2.66	1.93	3.66	-	-	-	-
UD Mechanical ventilation	0.09	0.11	0.000*	1.07	1.05	1.08	-	-	-	-
Drain	28 (4.2%)	26 (12.1%)	0.0001*	3.15	1.80	5.50	-	-	-	-
UD Drain	0.011	0.001	0.0014*	1.09	1.03	1.14	-	-	-	-
Vesical probe	31 (4.7%)	23 (10.7%)	0.0024*	2.38	1.36	4.17	-	-	-	-
UD Vesical probe	10.006	0.008	0.0020*	1.17	1.06	1.29	-	-	-	-
Gastric probe	587 (88.9%)	200 (93.4%)	0.0694	1.73	0.96	3.14	-	-	-	-
UD of Gastric probe	0.42	0.35	0.000*	1.06	1.05	1.07	-	-	-	-
Tracheostomy	3 (0.45%)	2 (0.9%)	0.4236	2.08	0.35	12.54	-	-	-	-
UD Tracheostomy	0.001	0.001	0.3427	1.05	0.95	1.15	-	-	-	-
Average length of hospital stay - days	15.88(14.57)	35.24(23.42)	0.000*	1.06	1.05	1.07	-	-	-	-
Death	60 (9.0%)	26 (12.1%)	0.1524	1.43	0.88	2.35	-	-	-	-

**Note:** OR-odds ratio, GA-gestational age, UVC- umbilical venous catheter, UD - utilization density = n° of CVC-days/n° of patient-days; SD- standard deviation. \*  $P<0.05$ .

The mean gestational age of the neonates with fungal infection was 29 weeks and their mean weight was 1408.53 grams, of which 52.6% (10) were born weighing less than 1000 grams. Statistically significant risk factors for the occurrence of fungal infection were: mean GA, weight, SNAPPE II > 24, phlebotomy UD, intracath, CUV, drainage, gastric tube, UD use of PICC, parenteral nutrition, mechanical ventilation, tracheostomy, length of hospital stay, and the use of three or more antimicrobials and antimicrobial therapy time. The time of use of invasive devices that could be considered at risk for the development of fungal infection was on average five times higher in relation to the group of neonates without infection. The hospitalization length of newborns with fungal infection was three times higher than the group without infection. The multivariate analysis showed that the mean hospitalization length ( $P = 0.0037$ ) and death ( $P = 0.0036$ ) were statistically higher in the NB group with fungal infection (Table 2).

**Table 2** – Risk factors for acquisition of fungal infection and evolution of neonates hospitalized between 2013–2016

	Without infection(660)	With infection (19)	p value	Univariate Model			Multivariate Model			
				OR	OR (95%CI)		p value	OR	OR (95%CI)	
					Lower	Upper			Lower	Upper
Average GA	33 weeks	29 weeks	0.0038*	0.98	0.96	0.99	-	-	-	-
Average weight	1943.12 g	1408.53 g	0.0212*	0.9992	0.9986	0.9999	-	-	-	-
Apgar 5'<7	75 (11.3%)	2(10.5%)	0.4584	0.91	0.70	1.17	-	-	-	-
Snappell>24	146 (22.1%)	13 (68.4%)	0.0014*	1.03	1.01	1.05	-	-	-	-
Phlebotomy	15(2.3%)	2 (10.5%)	0.0778	3.92	0.86	17.89	-	-	-	-
UD Phlebotomy	0.008	0.006	0.003*	1.07	1.02	1.12	-	-	-	-
Intracath	20 (3.0%)	1 (5.2%)	0.8184	1.27	0.17	9.78	-	-	-	-
UD Intracath	0.01	0.002	0.0441*	1.06	1.00	1.13	-	-	-	-
PICC	351 (53.2%)	18 (94.7%)	0.0164*	11.85	1.57	89.16	-	-	-	-
UD PICC	0.23	0.032	0.0000*	1.06	1.04	1.08	-	-	-	-
UVC	240 (36.7%)	11 (57.9%)	0.1099	2.12	0.84	5.32	-	-	-	-
UD UVC	0.06	0.003	0.0102*	1.16	1.04	1.29	-	-	-	-
Parenteral Nutrition	281(42.6%)	16 (84.2%)	0.0077*	5.40	1.56	18.65	-	-	-	-
UD Parenteral Nutrition	0.17	0.02	0.000*	1.06	1.04	1.09	-	-	-	-
Mechanical ventilation	266 (40.3%)	16 (84.2%)	0.0035*	6.35	1.84	21.96	-	-	-	-
UD Mechanical ventilation	0.09	0.02	0.000*	1.06	1.04	1.08	-	-	-	-
Drain	28 (4.2%)	5 (26.3%)	0.0008*	6.17	2.13	17.86	-	-	-	-
UD Drain	0.011	0.001	0.5616	1.02	0.95	1.10	-	-	-	-
Vesical probe	31 (4.7%)	1 (5.2%)	0.8709	0.84	0.11	6.45	-	-	-	-
UD Vesical probe	0.006	0.0004	0.8175	1.02	0.83	1.26	-	-	-	-
Gastric probe	587 (88.9%)	19 (100%)	0.9891	1.00	-	-	-	-	-	-
UD Gastric probe	0.42	0.04	0.000*	1.05	1.03	1.07	-	-	-	-
Tracheostomy	3 (0.45%)	1 (5.2%)	0.0304*	11.88	1.26	11.60	-	-	-	-
UD Tracheostomy	0.001	0.0004	0.3035	1.07	0.94	1.23	-	-	-	-
Average length of hospital stay - days	15.88(14.57)	50.79	0.000*	1.04	1.03	1.06	0.0037*	10.24	2.13	49.27
Use of antibiotics	268 (40.6%)	17 (89.5%)	0.005*	8.21	1.88	35.74	-	-	-	-
Use of 3 or more antibiotics	58 (8.8%)	14 (73.7%)	0.000*	11.84	4.20	33.33	-	-	-	-
Time of antibiotic use – days	5.01(7.99)	19(19.75)	0.000*	1.08	1.05	1.11	-	-	-	-
Death	60 (9.0%)	6 (31.6%)	0.0034*	4.42	1.63	11.96	0.0036*	1.14	1.04	1.24

**Note:** OR-odds ratio, GA-gestational age, UVC- umbilical venous catheter, UD, utilization density = n° of CVC-days/n° of patient-days; SD- standard deviation. \*  $P<0.05$ .

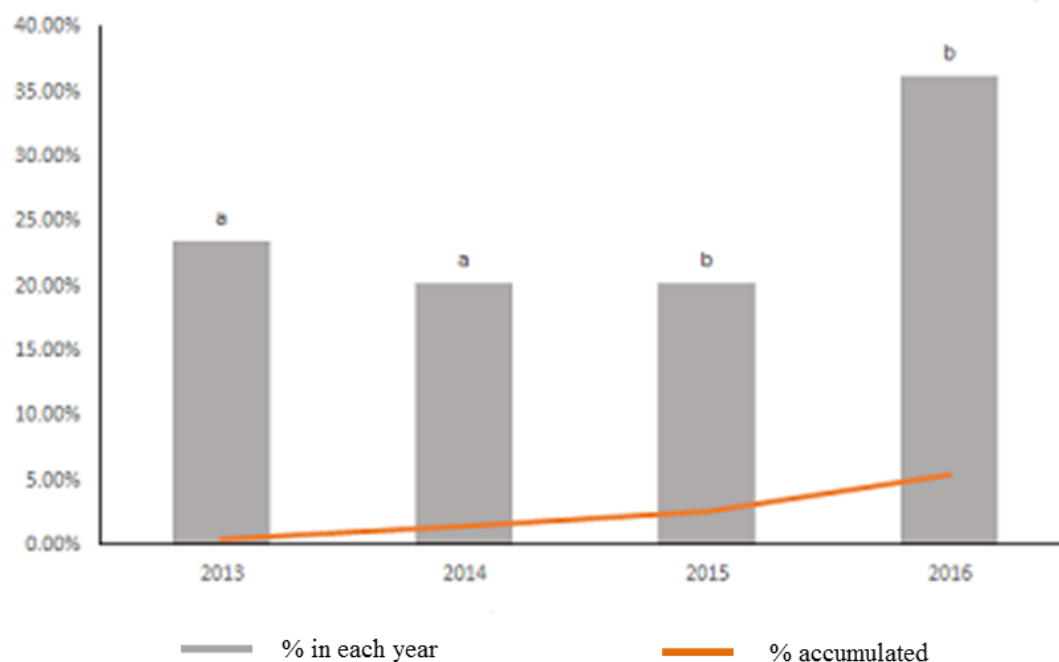
Between 2013 and 2016, 401 microorganisms were isolated from neonates hospitalized in the unit, of which 145 (36.1%) were only in the year 2016 and the most frequent was the CONS, corresponding to 41.3% of the total of isolates. Fifty-eight percent of the isolates were Gram-positive bacteria, 37% were Gram-negative bacteria, and 5% were yeasts (Table 3).

**Table 3** - Microorganisms causing invasive infections in neonates hospitalized at the NICU of the study in the years of 2013 to 2016

Microorganisms	2013		2014		2015		2016		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Streptococcus</i> sp.	2	2.1	1	1.3	1	1.3	2	1.4	6	1.6
CONS	41	43.5	37	45.5	38	46.7	49	33.8	165	41.3
<i>Staphylococcus aureus</i>	21	22.2	6	7.4	10	12.3	14	9.6	51	12.7
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	4.3	3	3.8	2	2.4	1	0.7	10	2.5
<i>Escherichia coli</i>	4	4.3	3	3.8	3	3.8	7	4.8	17	4.2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	3.2	1	1.3	3	3.8	15	10.3	22	5.5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0	0	0	0	0	1	0.7	1	0.2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	5.3	15	18.5	1	1.3	19	13.1	40	10.0
<i>Serratia marcescens</i>	4	4.3	2	2.4	2	2.4	5	3.4	13	3.2
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	1.1	0	0	3	3.7	1	0.7	5	1.2
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	0	4	4.9	8	9.9	4	2.8	16	4.0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	0	0	0	0	0	1	0.7	1	0.2
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	5.3	2	2.4	1	1.3	6	4.1	14	3.5
<i>Citrobacter koseri</i>	0	0	1	1.3	0	0	0	0	1	0.2
Bacteria ESBL +*	0	0	0	0	1	1.3	8	5.5	9	2.2
Others	2	2.2	2	2.4	3	3.7	3	2.1	10	2.5
<i>Candida albicans</i>	1	1.1	2	2.4	4	4.8	4	2.8	11	2.8
<i>C. parapsilosis</i>	1	1.1	1	1.3	0	0	4	2.8	6	1.6
<i>C. guilliermondii</i>	0	0	0	0	0	0	1	0.7	1	0.2
<i>Trichosporon</i> sp.	0	0	1	1.3	1	1.3	0	0	2	0.4
<b>Total isolates</b>	<b>94</b>	<b>23.5%</b>	<b>81</b>	<b>20.2%</b>	<b>81</b>	<b>20.2%</b>	<b>145</b>	<b>36.1%</b>	<b>401</b>	<b>100%</b>

**Note:** \*ESBL-producing species: *Klebsiella pneumoniae* (8), *Escherichia coli* (1). \*\* \*\*others species in 2013: *Staphylococcus lugdunensis* (1), *Haemophilus* sp. (1); 2014: *Staphylococcus warneri* (1), *Proteus mirabilis* (1); 2015: *Burkholderia cepacia* (1), *Elizabethkingia meningoseptica* (1), *Cronobacter sakazakii* (1); 2016: *Enterobacter aerogenes* (1), *Ralstonia pickettii* (1), *Staphylococcus warneri* (1).

The Figure 1 shows the accumulated microorganisms isolated in each year of research. There was a statistical difference in the number of isolates from the years of 2015 and 2016 when compared to 2013 and 2014.

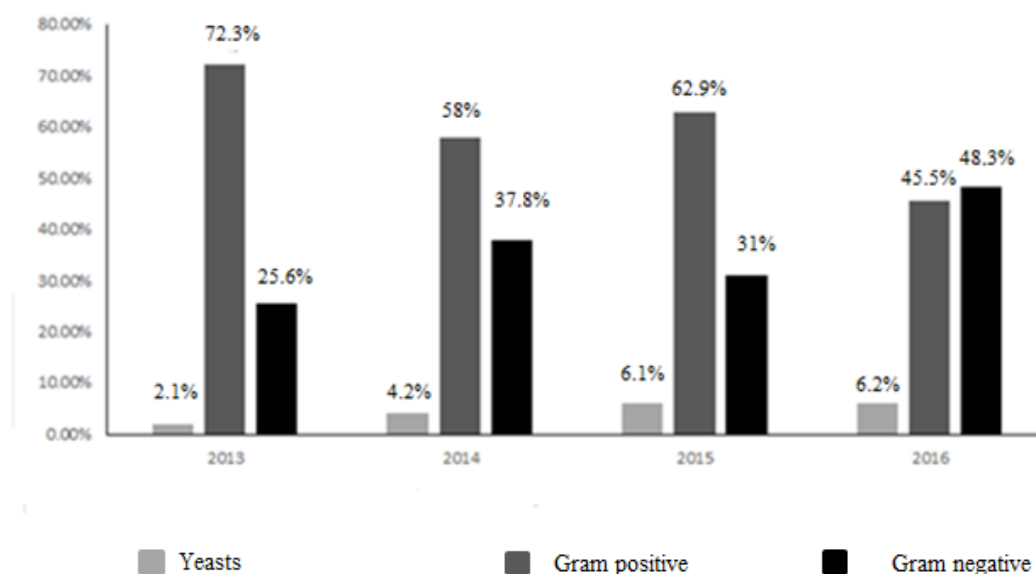


**Note:** Between years with different letters  $p < 0.05$ .

**Figure 1** - Comparison of the number of microorganisms and cumulative yeasts isolated from infection in infants admitted to the NICU of the study between the four years of surveillance

Figure 2 shows the distribution of the isolates in each year of study. In 2013, a higher percentage of Gram-positive bacteria (72.3%) was observed and only 2.0% were yeasts. In 2014 and 2015, although Gram-positive bacteria still were the majority of isolates, with 58.0% and 62.0% of the total of isolates, an increase of infections by Gram-negative bacteria and yeasts was observed. Isolation of microorganisms was significantly higher in 2016 than in the other study years, accounting for 48.2% (70) of the total of Gram-negative isolates and 6.2% (9) of yeasts, among Gram-negative bacteria *P. aeruginosa* was the more frequent (27.4%).





**Figure 2** - Distribution of microorganisms isolated from newborns admitted to the NICU of the study in each surveillance year

## Discussion

Continuous epidemiological surveillance in hospital units at risk for NI can be used to determine the most frequent infections and the most common microorganisms, making possible the adoption of measures to reduce the occurrence of NI, with the intent to reduce morbidity and mortality rates. Sepses are the most serious infections in NICU, although they are the most common, presenting high mortality rates. Epidemiological surveillance in the NICU of the Clinical Hospital of the Federal University of Uberlandia between 2013 and 2016 showed that the most frequent infection was sepsis (63.8%), four times higher than that observed in the unit in previous years<sup>18</sup>.

Neonates using some type of catheter were up to four times more likely to develop bacterial infection than those who did not. Weight below 2500 grams, need for parenteral nutrition, mechanical ventilation, drain use, and hospitalization time of more than seven days were also significant factors for the development of bacterial infections. The use of these devices and low birth weight are conditions described in the literature that significantly increase the occurrence of invasive infections<sup>19</sup>. However, the

utilization density of PICC and use of UVC were independent factors for the occurrence of bacterial infection.

Due to the severity of some NB admitted to the NICU, there is often need for surgical procedures, and many are submitted to prophylactic antibiotic therapy, which may favor colonization of the skin, mucous membranes, and gastrointestinal tract by yeasts, especially *Candida* spp., which may in some cases initiate a serious infectious process<sup>20</sup>. Neonates with gestational age less than 28 weeks and weight below 1000 grams presented a higher risk of developing invasive fungal infection, as already observed in the literature<sup>21,22</sup>. In this study, there was an expressive increase in neonates with a more severe clinical condition than some years ago, emphasized by low birth weight, gestational age <34 weeks, and SNAPPE II >24. Those NB requiring use of devices like PICC, tracheostomy, and three or more antibiotics classes had a risk of developing fungal infection 11.85 times greater. In addition, the average time of use of these devices was up to 31.5 days for PICC, considered as high, since time of use over seven days may lead to the development of invasive infections, leading to an increase in hospital costs as well as morbidity and mortality rates<sup>23</sup>. Newborns affected by fungal infections were hospitalized 50 days on average. Multivariate analysis confirmed that prolonged hospitalization length was an independent risk factor for acquisition of fungal infection. Several authors affirm that broad spectrum antibiotic therapy for long term and prolonged hospital stay, respectively, increase the chances of an invasive fungal infection, strongly compromising the infant's state of health<sup>6,11,24</sup>.

In this study, it was observed that neonates with fungal infection were admitted to the unit in the most critical state, since 37% were extremely premature, 63% had previous bacterial infection, and, due to the severity of their clinical condition, they remained hospitalized on average 34.91 and 15.55 more days in the unit than those infants without infection or only with bacterial infection, respectively. In addition, newborns with fungal infection died 2.6 times more (data not shown), and five of the six neonates with fungal infection who died had developed a concomitant bacterial infection. According to literature data, morbidity and mortality rates due to invasive fungal infection, especially candidiasis, in critically ill neonates are high, showing that this type of infection is more serious than bacterial infections with higher death rates and more severe sequelae, it is also a worldwide public health problem that deserves attention and greater prophylaxis<sup>8</sup>.

Invasive infections by Gram-positive bacteria are frequent in NICU of hospitals in developed countries<sup>25</sup>. In developing countries, NI by Gram-negative bacteria is more common, accounting for up to 78% of cases<sup>26</sup>. In this study, CONS was the most frequent microorganism, corresponding to 41.3% of the total number of isolates. However, because it was a microorganism of low virulence, no newborns died due to infections. On the other hand, there was an expressive increase in the isolation of Gram-negative bacteria in 2015 and 2016, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, which corresponded to 15% (2015) and 31.7% (2016), respectively, of the total isolates. The increase in Gram-negative infections is a cause for concern, as they trigger notoriously more serious infectious processes than those caused by Gram-positive bacteria, not only because they affect more debilitated patients, such as extremely low birthweight (<1000g), but also because resistance to broad spectrum antimicrobials, as is the case for ESBL producers, which in 2016 corresponded to 10% of the total Gram-negative bacteria. Morkel (2014)<sup>26</sup> reported in his study that in developing countries, often access to new-generation antimicrobials are limited because of the high cost.

Surveillance also revealed an increase in invasive infections by yeasts, especially *Candida* species, as the infection rate increased significantly from 2.1% in 2013 to 6.2% in 2016. A 12-year surveillance study conducted in two tertiary hospitals in the USA showed an increase from 15 to 30 patients with invasive candidiasis from 2000 to 2003, followed by a significant reduction in the occurrence of this infection, driven mainly by the prophylactic use of antifungal agents<sup>8</sup>.

Previous studies carried out in the same unit showed the predominance of NI by Gram-positive bacteria, especially CONS, with isolation that was more than twice the number of Gram-negative bacteria between 2009 and 2010<sup>18,27</sup>. At the time of these studies, the justification for the reduction of the use of Gram-negative insulation was structural reform carried out at the Clinical Hospital of the Federal University of Uberlandia NICU, resulting in improved quality of care as well as increased number of sinks, space between beds, and number of professionals. However, in this study, the increase of bacterial infections by Gram-negative bacteria in 2015, being more pronounced in 2016, can be justified by the economic crisis of the country, which began at the end of 2014 and resulted in the cut of expenses for health care and professionals. This all reflected in the dispensation of contracted professionals of the unit, as well as in

a shortage of medicines and new generation antibiotics (which are more expensive), as well as in the use of invasive devices of inferior quality to the ones used previously.

Gram-negative bacterial infections are notoriously worse than those caused by Gram-positive bacteria not only because they affect more debilitated patients, such as extremely low birth weight infants (<1000g), but also because they are resistant to broad-spectrum antimicrobials, as is the case of ESBL producers, which in 2016 corresponded to 10% of the total Gram-negative bacteria. In countries with the same economic situation, such as Brazil, the rate of isolation of *Klebsiella pneumoniae* ESBL positive in NICU may exceed 50%. These results are worrisome because less-wealthy countries have more limited access to the latest antimicrobials launched in the market<sup>26</sup>. In countries like Kuwait, Turkey, and Egypt, *Klebsiella* spp. was also the most frequent Gram-negative bacteria, with 14.3% being ESBL producers in the latter two countries<sup>25,28,29</sup>.

In conclusion, in this study, an expressive increase was observed in the infections triggered by Gram negative bacteria and yeasts when compared with previous studies in the same NICU. This increase was caused by the hospitalization of newborns in a more serious state of health, especially those with a weight lower than 1500g and possibly due to the country's precarious financial situation, which impacted on the highest occurrence of deaths. These results demonstrate the importance of constant epidemiological surveillance and the maintenance of infection control measures in the neonatal department.

## References

01. Souza ABG, et al. Enfermagem Neonatal: Cuidado integral ao recém-nascido 2011; 1. ed., São Paulo: Martinari.
02. Geffers C, Baerwolff S, Schwab F, Gastmeier P. Incidence of healthcare-associated infections in high-risk neonates: results from the German surveillance system for very-low-birthweight infants. J Hosp Infect 2008 May; 68(3):214-221. doi: 10.1016/j.jhin.2008.01.016  
<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2008.01.016>
03. Auriti C, Ronchetti MP, Pezzotti P, Marrocco G, Quondamcarlo A, Seganti G, et al. Determinants of nosocomial infection in 6 neonatal intensive care units: an Italian multicenter prospective cohort study. Infect Control HospEpidemiol. 2010 Sep; 31(9):926-933. doi: 10.1086/655461 <https://doi.org/10.1086/655461>
04. Verstraete E, Boelens J, De Coen K, Claeys G, Vogelaers D, Vanhaesebrouck P, et al. Healthcare-associated bloodstream infections in a neonatal intensive care unit over a

20-year period (1992–2011): trends in incidence, pathogens, and mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2014 May; 35(5):511-518. doi: 10.1086/675836

<https://doi.org/10.1086/675836>

05. Crivaro V, Bogdanović L, Bagattini M, Iula, VD, Catania M, Raimondi F, et al. Surveillance of healthcare-associated infections in a neonatal intensive care unit in Italy density of using 2006–2010. *BMC Infect Dis*. 2015 Mar; 15:152. doi:

10.1186/s12879-015-0909-9. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-0909-9>

06. Garzillo C, Bagattini M, Bogdanović L, Di Popolo A, Iula VD, Catania MR, et al. Risk factors for *Candida parapsilosis* bloodstream infection in a neonatal intensive care unit: a case-control study. *Ital J Pediatr*. 2017 Jan; 43(1):10. doi: 10.1186/s13052-017-0332-5.

<https://doi.org/10.1186/s13052-017-0332-5>

07. Resende DS, Peppe AL, Dos Reis H, Abdallah VO, Ribas RM, Gontijo Filho PP. Late onset sepsis in newborn babies: epidemiology and effect of a bundle to prevent central line associated bloodstream infections in the neonatal intensive care unit. *Braz J Infect Dis* 2015 Jan-Feb; 19(1): 52-57. doi: 10.1016/j.bjid.2014.09.006

<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2014.09.006>

08. Agarwal RR, Agarwal RL, Chen X, Lua JL, Ang JY. Epidemiology of Invasive Fungal Infections at Two Tertiary Care Neonatal Intensive Care Units Over a 12-Year Period (2000-2011). *Glob Pediatr Health*, 2017 Mar; 30:4. doi: 10.1177/2333794X17696684.

<https://doi.org/10.1177/2333794X17696684>

09. Nour I, Eldegla HE, Nasef N, Shouman B, Abdel-Hady H, Shabaan AE. Risk factors and clinical outcomes for carbapenem-resistant Gram-negative late-onset sepsis in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect* 2017 Sep; 97(1):52-58. doi:

10.1016/j.jhin.2017.05.025. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.05.025>

10. Fu J, Ding Y, Wei B, Wang L, Xu S, Qin P, et al. Epidemiology of *Candida albicans* and non-*C. albicans* of neonatal candidemia at a tertiary care hospital in western China. *BMC Infect Dis* 2017 May; 17(1):329. doi: 10.1186/s12879-017-2423-8.

<https://doi.org/10.1186/s12879-017-2423-8>

11. Urzúa S, Ferrés M, García P, Sánchez A, Luco M. Strategies to reduce density of use of infections and antibiotic use and its effects in a neonatal care unit. *Rev Chilena Infectol* 2017 Apr; 34(2):99-107. doi: 10.4067/S0716-10182017000200001.

<https://doi.org/10.4067/S0716-10182017000200001>

12. Izquierdo G, Santolaya ME. Invasive candidiasis in newborns: diagnosis, treatment and prophylaxis. *Rev Chilena Infectol* 2014 Feb; 31(1):73-83. doi: 10.4067/S0716-10182014000100011.

<https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000100011>

13. Tekin R, Dal T, Pirinccioglu H, Oygucu SE. A 4-Year Surveillance of Device-associated Nosocomial Infections in a Neonatal Intensive Care Unit. *Pediatr Neonatol* 2013 Oct; 54(5):303-308. doi: 10.1016/j.pedneo.2013.03.011.

<https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2013.03.011>

14. Density of use of deck MA, Horan TC, Peterson KD, Allen-Bridson K, Morrell G, Anttila A, et al. National Healthcare Safety Network report, data summary for 2011, device associated density of use. *Am J Infect Control* 2013 Apr; 91(4):286-300. doi: 10.1016/j.ajic.2013.01.002.

<https://doi.org/10.1016/j.ajic.2013.01.002>

15. Gastmeier P, Geffers C, Schwab F, Fitzner J, Obladen M, Rüden H. Development of a surveillance system for nosocomial infections: the component for neonatal intensive care units in Germany as an example. *J Hosp Infect*, 2004 Jun; 57(3):126-131.

<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2003.12.038>

16. Hosmer DW, Lemeshow S. Applied Logistic Regression 2004; Second Edition, New York: John Wiley & Sons, 392p.
17. Zar JH. Biostatistical Analysis 1999; 4th edition, Prentice Hall, 663p.
18. Urzedo JE, Levenhagen MM, Pedroso RS, Abdallah VO, Sabino SS, Brito DV. Nosocomial infections in a neonatal intensive care unit density of using 16 years: 1997-2012. *Rev Soc Bras Med Trop* 2014 May-Jun; 47(3):321-326.  
<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0101-2014>
19. Dong Y, Speer CP. Late-onset neonatal sepsis: recent developments. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2015 May; 3: F257-63. doi: 10.1136/archdischild-2014-306213.  
<https://doi.org/10.1136/archdischild-2014-306213>
20. Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Bouza E, Guinea J. Aplicación de las técnicas de tipificación molecular a estudio de brotes hospitalarios de candidemia. *Rev Iberoam Micol* 2014 Abr-Jun; 31(2):97-103. doi: 10.1016/j.riam.2013.06.003.  
<https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.06.003>
21. Lee JH, Hornik CP, Benjamin DK, Herring AH, Clark RH, Cohen Wolkowicz M, et al. Risk factors for invasive candidiasis in infants >1500 g birth weight. *Pediatr Infect Dis J* 2013 Mar; 32(3):222-226. doi: 10.1097/INF.0b013e3182769603.  
<https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3182769603>
22. Calley JL, Warris A. Recognition and diagnosis of invasive fungal infections in neonates. *J Infect* 2017 Jun; 74(1):S108-S113. doi: 10.1016/S0163-4453(17)30200-1.  
[https://doi.org/10.1016/S0163-4453\(17\)30200-1](https://doi.org/10.1016/S0163-4453(17)30200-1)
23. Deleers M, Dodémont M, Van Overmeire B, Hennequin Y, Vermeylen D, Roisin S, et al. High positive predictive value of Gram stain on catheter-drawn blood samples for the diagnosis of catheter-related bloodstream infection in intensive care neonates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016 Apr; 35(4):691-696. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2588-x>
24. Arsenault AB, Bliss JM. Neonatal Candidiasis: New Insights into an Old Problem at a Unique Host-Pathogen Interface. *Curr Fungal Infect Rep*, 2015 Dez; 9(4):246-252.
25. Hammoud MS, Al-Taiar A, Al-Abdi SY, Bozaid H, Khan A, Almuhaire LM, et al. Late-onset neonatal sepsis in Arab states in the Gulf region: two-year prospective study. *Int J Infect Dis* 2017 Feb; 55:125-130. doi: 10.1016/j.ijid.2017.01.006.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.01.006>
26. Morkel G, Bekker A, Marais BJ, Kirsten G, Van Wyk J, Dramowski A. Bloodstream infections and antimicrobial resistance patterns in a South African neonatal intensive care unit. *Paediatrics and International Child Health* 2014 May; 34(2):108-114. doi: 10.1179/2046905513Y.00000000082.  
<https://doi.org/10.1179/2046905513Y.00000000082>
27. De Brito CS, De Brito DV, Abdallah VO, Gontijo Filho PP. Occurrence of bloodstream infection with different types of central vascular catheter in critically neonates. *J Infect* 2010 Feb; 60(2):128-132. doi: 10.1016/j.jinf.2009.11.007.  
<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2009.11.007>
28. Cura C, Ozen M, Akaslan Kara A, Alkan G, Sesli Cetin E. Health care associated infection surveillance in a tertiary neonatal intensive care unit: A prospective clinical study after moving to a new building. *Am J Infect Control* 2016 Jan; 44(1):80-84. doi: 10.1016/j.ajic.2015.07.032. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.07.032>
29. Gadallah MA, Aboul Fotouh AM, Habil IS, Imam SS, Wassef G. Surveillance of health care associated infections in a tertiary hospital neonatal intensive care unit in Egypt: 1-year follow-up. *Am J Infect Control* 2014 Nov; 42(11):1207-1211. doi: 10.1016/j.ajic.2014.07.020. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2014.07.020>

## ANEXO D – ARTIGO 2 – VERSÃO EM INGLÊS

### Carriage of *Candida* spp. on hands of health care workers: virulence and antifungal resistance

Ralciane de P. Menezes<sup>1,2</sup>, Felipe Flávio Silva<sup>3</sup>, Sávia G. O. Melo<sup>3</sup>, Priscila G. V. Alves<sup>2</sup>, Murilo O. Brito<sup>4</sup>, Meliza O. Bessa<sup>5</sup>, Mario Paulo A. Penatti<sup>1</sup>, Reginaldo dos S. Pedroso<sup>1,2</sup>, Vânia O. S. Abdallah<sup>2</sup>, Denise von D. B. Röder<sup>2,6</sup>

<sup>1</sup> Healthcare Technical School- ESTES, Federal University of Uberlandia (UFU), Uberlandia, MG, Brazil

<sup>2</sup> Health Sciences Postgraduate Program, Faculty of Medicine- FAMED, UFU, Uberlandia, MG, Brazil

<sup>3</sup> Graduation in Nursing, FAMED, UFU, Uberlandia, MG

<sup>4</sup> Graduation in Environmental Health Management - Institute of Geography (IG), UFU, Uberlandia, MG, Brazil

<sup>5</sup> Graduation in Biology - Institute of Biology (INBIO), UFU, Uberlandia, MG, Brazil

<sup>6</sup> Institute of Biomedical Sciences - ICBIM, UFU, Uberlandia, MG, Brazil

#### Abstract

Colonisation of health professionals' hands by potentially pathogenic microorganisms capable of expressing virulence factors, such as *Candida* spp., is worrisome because of the high contact between patients and professionals. The aims were to evaluate, *in vitro*, the virulence factors: haemolytic activity, DNase expression, biofilm formation, and susceptibility for antifungal agents, specifically: amphotericin B, fluconazole, and micafungin of *Candida* species isolated on health professionals' hands from a Neonatal Intensive Care Unit (NICU). Fifty isolates of *Candida* spp. were studied: 19 *C. parapsilosis* *stricto sensu*, three *C. metapsilosis*, one *C. orthopsilosis*, seven *C. albicans*, six *C. famata*, five *C. lusitaniae*, three *C. krusei*, two *C. kefyr*, two *C. tropicalis*, one *C.*

*glabrata*, and one *C. guilliermondii*. The haemolytic activity and DNase were investigated using blood agar and DNase agar, respectively. Biofilm production was evaluated through XTT sodium salt reduction ability and the evaluation of the susceptibility of the isolates to antifungals was done through the microdilution methodology. Forty-nine isolates were able to express at least one of the three virulence factors investigated. *C. albicans* showed more intense haemolytic activity. DNase production was statistically different between the *C. parapsilosis* complex and *C. albicans*, between the *C. parapsilosis* complex and *C. krusei*, between *C. famata* and *C. albicans*, and between *C. famata* and *C. krusei*. Forty-three isolates produced biofilm. Seventy-eight percent of the isolates were sensitive to the three antifungals. This study demonstrated that *Candida* isolated from colonisation of health professionals' hands have virulence.

**Key words:** *Candida* spp., virulence, biofilm, antifungals, hand colonisation.

## Introduction

*Candida* species are the main opportunistic fungal pathogens that affect hospitalised patients in health services. In newborns, *Candida* spp. is the third most isolated microorganism of invasive infections, *C. albicans* and *C. parapsilosis* being the most frequent species, followed by *C. tropicalis*, *C. glabrata*, and *C. krusei* [1,2]. The morbimortality of invasive candidiasis in critical neonates may reach 59%, and approximately 60% of the neonates recovering from this type of infection have some neurodegenerative sequelae [3]. Newborns admitted to a Neonatal Intensive Care Unit (NICU) have an immature immune system, which is associated with low birth weight, prematurity, underlying disease, and extrinsic risk factors (central venous catheter use, parenteral nutrition, and others), and are exposed to infectious agents [1].

The installation of infection by *Candida* spp. occurs when there is an imbalance in the parasite-host relationship, a consequence of the association between the inefficiency of individual defenses and expression of virulence factors by microorganism. There are several virulence factors described for fungi. For *Candida* species, haemolytic activity, expression of proteases, phospholipases, and DNAs, and biofilm formation capacity, among others, are important for tissue colonization and for



various consolidation phases of the infection process [2,4]. Mechanisms by which virulence factors contribute to the pathogenesis are diverse. For example, haemolysins promote the lysis of red blood cells, allowing the iron to be obtained, which is important in the development and multiplication of yeast [5]. Mechanisms by which DNase enzymes contribute to the virulence of the microorganism are not entirely clear, but it has been proposed that it collaborates in the escape from neutrophil extracellular traps by degrading the DNA that compose it [6,7]. Biofilm formation may make the yeast less susceptible to antifungal actions, as well as allowing adhesion, colonisation, and maintenance of viable cells in invasive devices and host tissues. Biofilm is a complex structure composed of yeasts, hyphas, and pseudohyphas that are surrounded by an extracellular matrix, which allows not only fixation of the microorganism to surfaces of medical and invasive devices, but also the natural defenses and of antifungal drugs such as fluconazole and amphotericin B [2].

It is estimated that about 60% of health care professionals have *Candida* spp. in the microbiota of their skin, with *C. parapsilosis* being the most frequent according to some studies [8]. This knowledge is important because it shows that these microorganisms circulate in the environment, being carried by people. This fact is important in health service settings where the circulation of microorganisms with virulence or resistance to drugs can be transmitted to immunocompromised individuals if biosafety precautions are not adequate. Consequently, the route of exogenous circulation or transmission of yeast are related to their ubiquitous presence in a hospital environment, as well as on the hands of those who deal directly with patients. Therefore, this form of transmission can be avoided by adopting adequate and standardised techniques of hand hygiene before and after interaction with the patient [9].

The aim of the present article was to study, *in vitro*, the virulence factors: haemolytic activity, DNase expression, and biofilm formation as well as the susceptibility to antifungal agents amphotericin B, fluconazole, and micafungin of *Candida* species isolated from the hands of health professionals of a neonatal ICU.

## **Material and Methods**

The study was performed with isolates of *Candida* spp. obtained from hands of healthcare workers in a NICU of a hospital of high complexity that has 520 beds, of

which 15 belong to a NICU and is part of the High Risk Nursery of the Institution.

The yeast isolates (50) were obtained from samples collected from 134 NICU professionals. After signing the informed consent form, they simulated hand washing in a sterile polypropylene bag containing 30 mL of sterile physiological saline (NaCl 0.9%). The material was placed in 15 mL sterile falcon tubes and centrifuged at 4,000 rpm for 10 minutes. Then, the supernatant was discarded and 0.1 mL of the sediment was seeded on plates with Sabouraud dextrose agar (SDA) (Isifar, Duque de Caixas, RJ, Brazil), plus chloramphenicol, as well as on chromogenic agar plates (Himedia, Mumbai, India) and incubated at 30°C for up to 72 hours [10].

Yeasts were identified by the classical methodology [11], and *C. albicans* isolates were confirmed using polymerase chain reaction (PCR) with specific primers for differentiation of *C. dubliniensis* as proposed by Estrada-Barraza et al. [12]. Isolates identified as *C. parapsilosis* were differentiated into *C. parapsilosis strito sensu*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis* by restriction fragment length polymorphism (RFLP)-PCR, according to Tavanti et al. [13].

### ***Screening for haemolytic and DNase activities***

Each SDA culture (24–48 hours) was suspended in saline solution (0.9%) with turbidity equivalent to tube two of the McFarland scale ( $1 \times 10^8$  to  $5 \times 10^8$  CFU/mL). Subsequently, five  $\mu$ L aliquots of each suspension were deposited at points equidistant in Petri dishes (90x15mm) containing DNase agar (Hexis, São Paulo, Brazil) and sheep's blood agar 7% [6]. Incubation was done at 30°C for seven days for DNase research and for 48 hours for analysis of haemolytic activity [5,14].

Tests were done in duplicate, interpretation and description of the results were performed as follows: the presence of haemolytic activity was observed through visualisation of haemolysis around the colony. The haemolytic activity was measured by the ratio of colony diameter (dc) to the haemolysis zone (dcp). The results were expressed as dc/dcp: Hi (haemolytic index) and classified as negative ( $H_i=1$ ), moderate ( $0.63 < H_i < 1$ ) and marked (or  $H_i \leq 0.63$ ) [15].

The results of DNase activity were expressed as positive or negative according to the presence or absence of a whitening halo around the colony (Riceto et al., 2015).

### ***Biofilm formation assays***

Evaluation of the biofilm formation capacity by the studied isolates was done according to methodology proposed by Pierce et al. [16], with modifications. Briefly, 10 $\mu$ L of a 24 hour culture in SDA from each isolate was inoculated into 15mL yeast, peptone, and dextrose broth (YPD) and incubated for 12 to 18 hours at 35°C. Subsequently, the material was centrifuged at 4,000 rpm for five minutes, the supernatant discarded, and the pellet washed three times with phosphate buffered saline (PBS) (1:10), before centrifugation and resuspension in PBS. Then the suspension was diluted in RPMI 1640 (Himedia, Mumbai, India) supplemented with glucose and buffered with MOPS ([N-morpholino] propane sulfonic acid) (Hexis, São Paulo, Brazil) with turbidity equivalent 0.5 of the McFarland scale, containing approximately 1x10<sup>6</sup> CFU/mL. One hundred  $\mu$ L was dispensed into each well of 96-well plates. After incubation at 35°C for 24 hours, the samples were washed three times with 1x PBS to remove planktonic cells prior to addition of 100  $\mu$ L of 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenyl) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) and menadione, 0.5 mg/mL (0.1mM solution) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). The plates were wrapped with aluminum paper and incubated again at 35°C for two hours. After this time, 80 $\mu$ L of each sample was transferred to another plate and read in a spectrophotometer with wave compliance of 490nm. The test was done four times and results were expressed according to the mean of the absorbance observed in each test. The results were classified according to the absorbance in: 1) non-biofilm producers (OD <0.10), 2) weak producers (0.11 <OD <0.40), 3) moderate producers (0.41 < DO <0.74,) and 4) high biofilm producers (OD> 0.75).

### ***Antimicrobial resistance testing***

The evaluation of susceptibility to antifungal fluconazole (Fluoxol, La Paz, Bolivia), amphotericin B (Cristália, São Paulo, Brazil), and micafungin (Raffo, Buenos Aries, Argentina) was done by broth microdilution method, as described in documents M27-A3-S3 and M24-S4 [17,18]. Briefly, from a 24 hour colony on SDA a suspension was made in RPMI 1640, supplemented with glucose (2%) and buffered with MOPS, containing 1x10<sup>6</sup> cells/mL, and 100 $\mu$ L was pipetted in 96-well plates containing different concentrations of each antifungal, to a final concentration in each well ranging from 0.03  $\mu$ g/mL to 16  $\mu$ g/mL for amphotericin B and micafungin, and ranging from

0.125 to 64 µg/mL for fluconazole. After 24 hours of incubation at 35°C, the plates were read in a spectrophotometer at 490nm. Tests were done in duplicate and results expressed by the mean absorbance observed for each antifungal concentration. *C. albicans* ATCC 90028 and *C. parapsilosis* ATCC 22019 were used as controls for the performed tests.

Trials with azole and micafungin were used to determine the lowest concentration capable of inducing around 50% growth inhibition in the microorganism evaluated in relation to the control well, and identified as the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the drug. However, amphotericin B to MIC was the lowest concentration capable of inducing around 80% of growth [17].

The interpretation of MIC and cutoff points for each antifungal and each species were considered according to the current norm in CLSI documents M27-A3-S3 and M27-S4, and are described in Table 1 [17,18].

**Table 1** - Standard cut-off points for interpretation of MIC values for *Candida* species according to CLSI.

Antifungal agent	Species	MIC range (µg/mL)				Reference
		S	SDD	I	R	
Amphotericin B	All species	≤1	-	-	>1	CLSI, 2008
	<i>C. albicans</i>	≤2	4	-	≥8	CLSI, 2012
	<i>C. glabrata</i>	-	≤32	-	≥64	CLSI, 2012
Fluconazole	<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	CLSI, 2012
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2	4	-	≥8	CLSI, 2012
	<i>C. tropicalis</i>	≤2	4	-	≥8	CLSI, 2012
	Another species	≤ 8	16-32	-	≥ 64	CLSI, 2008
	<i>C. albicans</i>	≤0.25	--	0.5	≥1	CLSI, 2012
	<i>C. glabrata</i>	≤0.06	--	0.12	≥0.25	CLSI, 2012
	<i>C. tropicalis</i>	≤0.25	-	0.5	≥1	CLSI, 2012
Micafungin	<i>C. krusei</i>	≤0.25	-	0.5	≥1	CLSI, 2012
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2	-	4	≥8	CLSI, 2012
	<i>C. guilliermondii</i>	≤2	-	4	≥8	CLSI, 2012
	Another species	≤ 2	-	-	≥4	CLSI, 2008

**Note:** S: sensitive, SDD: sensitive dose-dependent, I: intermediate, R: resistant.

## Ethical statement

The research was approved by the Committee of Ethics in Research with Human Beings of the Federal University of Uberlandia (CEP-UFU), with number 989.139/2015.

## Statistical analysis

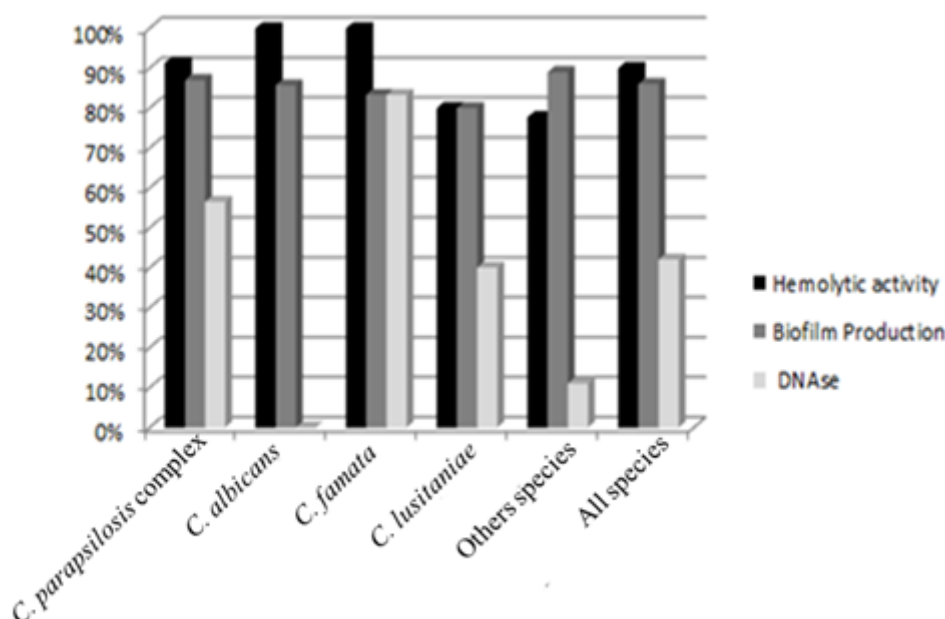
Comparing the haemolytic activity, DNase, and biofilm production, the Mann-Whitney test was used when a comparison was made between two species, and Kruskal-Wallis was used to compare all species. In order to evaluate antifungal susceptibility, Student's T-Test was used when comparing two species for each antifungal, when the comparison was made between all species, one-way Anova test was used. To compare the response of each species among the three antifungal drugs, the Kruskal-Wallis test was used. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.

## Results

Of the 50 isolates identified, 19 were *C. parapsilosis stricto sensu*, three *C. metapsilosis*, one *C. orthopsilosis*, seven *C. albicans*, six *C. famata*, five *C. lusitaniae*, three *C. krusei*, two *C. kefyr*, two *C. tropicalis*, one *C. glabrata*, and one *C. guilliermondii*.

Assessing of the virulence factors, 49 (98%) isolates were able to express at least one of the three virulence factors studied and 17 (34%) simultaneously expressed all the factors studied.

Only one isolate of *C. metapsilosis* did not produce any of these factors. Figure 1 shows the frequency of isolates that showed haemolytic activity, expressed DNase, and formed biofilms, according to the main species.



Note: Others species - *C. krusei* (3), *C. kefyr* (2), *C. tropicalis* (2), *C. glabrata* (1), *C. guilliermondii* (1).

**Figure 1** - Expression of virulence factors in *Candida* spp. from hands of health professionals from a NICU

Haemolytic activity was observed for all isolates of *C. albicans* and *C. famata*, and in the majority of isolates of *C. parapsilosis* (91.2%) and *C. lusitaniae* (80%). Most isolates of *C. albicans* (71.4%) and *C. famata* (83.3%) had strong haemolytic activity. When comparing the activity of this enzyme among species, *C. albicans* isolates had a more marked haemolytic activity than *C. parapsilosis* isolates ( $P = 0.0395$ ) and *C. lusitaniae* ( $P = 0.0284$ ). *C. famata* isolates also showed higher activity than *C. parapsilosis* ( $P = 0.0192$ ), *C. lusitaniae* ( $P = 0.0176$ ) and other species ( $P = 0.0392$ ).

Forty-two percent of all isolates were DNase activity positive, the majority belonged to *C. parapsilosis* complex (13 isolates, 56.5%) and *C. famata* (five isolates, 83.3%). No isolates of *C. albicans* and one of *C. guilliermondii* expressed the enzyme *in vitro* (Table 2). Statistically significant differences in the production of this enzyme were found between *C. parapsilosis* complex and *C. albicans* ( $P = 0.0257$ ), between *C. parapsilosis* complex and *C. krusei* ( $P = 0.0488$ ), between *C. famata* and *C. albicans* ( $P = 0.0124$ ), and between *C. famata* and *C. krusei* ( $P = 0.0216$ ).

**Table 2-** Haemolytic activity, DNase, and biofilm production of *Candida* spp. isolates from the hands of health professionals from the NICU

Species	Isolate number n (%)	Haemolytic activity score <sup>a</sup> n (%)			DNase expression n (%)		Biofilm score <sup>b</sup> n (%)			
		1	2	3	Negative	Positive	1	2	3	4
<i>C. parapsilosis</i>										
complex	23(100%)	2(8.8%)	16(69.5%)	5(21.7%)	10(43.5%)	13(56.5%)	3(13%)	14(60.8%)	5(21.7%)	1(4.5%)
<i>C. albicans</i>	7(100%)	0	2(28.6%)	5(71.4%)	7(100%)	0	1(14.4%)	3(42.8%)	3(42.8%)	0
<i>C. famata</i>	6(100%)	0	1(16.7%)	5(83.3%)	1(16.7%)	5(83.3%)	1(16.7%)	3(50%)	2(33.3%)	0
<i>C. lusitaniae</i>	5(100%)	1(20%)	4(80%)	0	3(60%)	2(40%)	1(20%)	3(60%)	1(20%)	0
Others species*	9(100%)	2(22.2%)	5(55.6%)	2(22.2%)	8(88.8%)	1(11.2%)	1(11.1%)	3(33.3%)	4(44.5%)	1(11.1%)
Total	50(100%)	5(10%)	28(56%)	17(34%)	29(58%)	21(42%)	7(14%)	26(52%)	15(30%)	2(4%)

**Note:** <sup>a</sup>Haemolytic activity scores: 1: did not present enzymatic activity ( $H_i=1$ ); 2: moderate enzymatic activity ( $0.63 < H_i < 0.99$ ); 3: Enhanced enzymatic activity ( $H_i \leq 0.63$ ).

<sup>b</sup>Score for biofilm production: 1: non-biofilm producer; 2: weak biofilm producer; 3: moderate producer; 4: strong biofilm producer. \* Other species: *C. krusei* (3), *C. kefyr* (2), *C. tropicalis* (2), *C. glabrata* (1), *C. guilliermondii* (1).

Regarding biofilm, 43 (86%) of isolates were able to form it, two with strong expression, 15 with moderate expression, and 26 with weak formation. Most of the isolates were classified as weak biofilm producers (52%), and intense expression was observed in only two isolates: one from *C. parapsilosis* and another from *C. kefyr* (Table 2). One *C. krusei* isolate also did not form a biofilm. No statistically significant difference was found in biofilm formation among the species studied (Table 4).

Table 3 shows the ranges of MIC variation among the three antifungals tested. *C. lusitaniae* presented the highest MIC for amphotericin B, *C. parapsilosis* complex for fluconazole, and *C. famata* for micafungin. Seventy-eight percent of the isolates were sensitive to the three antifungals. Amphotericin B was the antifungal with the highest number of susceptible isolates (49/50), followed by micafungin (48/50), and fluconazole (41/50). The only isolate resistant to amphotericin B was *C. lusitaniae*, resistance to micafungin was observed for *C. famata* (1) and *C. glabrata* (1). As for fluconazole, resistance was exhibited by the three isolates of *C. krusei* and by two isolates of the *C. parapsilosis* complex, of which three samples were also considered SDD. One *C. albicans* isolate was also SDD to fluconazole.



**Table 3** - MIC values presented by the candidate species from hands of health professionals from the NICU

Species (n)	Amphotericin B				Fluconazole				Micafungin			
	Variation range	MIC50	MIC90	Average	Variation range	MIC50	MIC90	Average	Variation range	MIC50	MIC90	Average
<i>C. parapsilosis</i> complex (23)	0.06-1	0.25	0.5	0.274	0.25-64	1	4	6.66	0.03-1	1	1	0.767
<i>C. albicans</i> (7)	0.125-0.5	0.25	0.25	0.232	0.25-4	0.25	0.5	0.857	0.03-0.5	0.06	0.06	0.11
<i>C. famata</i> (6)	0.125-0.5	0.125	0.5	0.291	1-4	2	2	2	0.03-8	1	1	1.88
<i>C. lusitaniae</i> (5)	0.125-2	0.5	1	0.75	0.25-1	0.5	0.5	0.5	0.03-2	0.5	2	1
Others species* (9)	0.03-1	0.125	0.5	0.30	0.5-8	0.5	2	2.25	0.015-1	0.03	0.06	0.185

**Note:** MIC50: concentration of antifungal that inhibits the growth of 50% of the isolates. MIC90: concentration of antifungal that inhibits the growth of 90% of the isolates.

\*Others species: *C. krusei* (3), *C. kefyr* (2), *C. tropicalis* (2), *C. glabrata* (1), *C. guilliermondii* (1).

Compared with amphotericin B (50S) and micafungin (50S), *C. parapsilosis* complex was significantly less susceptible to fluconazole (41S) compared to amphotericin B (50S) ( $P=0.005$ ). When comparing susceptibility among different species, isolates of *C. famata* showed MIC significantly higher for fluconazole than *C. lusitaniae* ( $P=0.0076$ ). Statistically significant MICs were also observed for micafungin among *C. parapsilosis* and *C. albicans* ( $P=0.0002$ ) and other isolates ( $P=0.039$ ) (Table 4).

Table 4 also shows the variability of MICs according to the species studied. Intraspecies variability observed for *C. parapsilosis* isolates was highlighted among other species (mean MIC 6.66  $\mu\text{g/mL}$  and standard deviation of  $\pm 17.7$ ).

**Table 4** -Comparison of the production of enzymes, biofilm, and susceptibility to antifungal among species isolated from the hands of health professionals of the NICU

	<i>Candida</i> complex <i>C.parapsilosis</i> (23)	<i>C. albicans</i> (7)	<i>C. famata</i> (6)	<i>C. lusitaniae</i> (5)	Others species* (9)	<i>P</i>
Haemolytic activity	0.715 ± 0.1	0.637 ± 0.04	0.625 ± 0.04	0.758 ± 0.1	0.735 ± 0.15	0.0197
Biofilm Production	0.377 ± 0.3	0.40 ± 0.2	0.319 ± 0.1	0.170 ± 0.1	0.507 ± 0.5	0.636
MIC Amphotericin B	0.274 ± 0.2	0.232 ± 0.1	0.291 ± 0.1	0.75 ± 0.7	0.301 ± 0.2	0.048
MIC Fluconazole	6.66 ± 17.7	0.857 ± 1.2	2 ± 1	0.5 ± 0.2	2.25 ± 2.6	0.767
MIC Micafungin	0.767 ± 0.5	0.11 ± 0.1	1.88 ± 2.7	1.0 ± 0.8	0.185 ± 0.2	0.052

\*Others species: *C. krusei* (3), *C. kefyr* (2), *C. tropicalis* (2), *C. glabrata* (1), *C. guilliermondii* (1).

## Discussion

It is a consensus in the literature that the absence of or inadequate application of hand hygiene for health professionals is one of the main forms of horizontal transmission of microorganisms responsible for the occurrence of invasive infections in critical patients, such as neonates. This emphasises the importance of studying the expression of virulence factors and the sensitivity of microorganisms present in the microbiota, including *Candida* spp., in order to predict the pathogenicity of microorganisms, add to the understanding of the parasite-host relationship, and the process of establishing disease.

There are several studies reporting the expression of phospholipase and proteinase enzymes by *Candida* species isolated from different anatomical sites [6,15]. However, research evaluating the production of haemolysin and DNase is still scarce. Only two reports, from the same group of studies, were found in the literature on the production of these enzymes by *Candida* spp. isolated from the hands [8,19].

All species included in the study presented haemolytic activity; however, with variation in the intensity of expression. Only two isolates of *C. parapsilosis* complex (*C. parapsilosis strito sensu* and *C. metapsilosis*), *C. lusitaniae* (one), *C. glabrata* (one), and *C. krusei* (one) did not present haemolytic activity. As for intensity, intense haemolytic activity was expressed by the majority of *C. albicans* and *C. famata* isolates. This percentage resembles that found in studies with yeast from oral and invasive infections of critically ill patients [6,20]. The *C. famata* strain with the highest haemolytic index (0.58) was not able to express any of the other virulence factors investigated. Haemolysins allow the pathogen to survive and persist in the host, as it allows iron to be supplied for cellular metabolism. The extent of haemolytic activity presented by different isolates is strain and species dependent, as already reported in the literature, despite the mechanism of gene expression as well as participation in metabolic pathways not being elucidated [21].

*C. famata* is a yeast with rare isolation in invasive infections as well as the microbiota of healthy individuals [22]. However, there have been reports of isolation from infections of very low birth weight infants hospitalized in the NICU [23]. Thus, the presence of this yeast in the skin microbiota of health professionals who daily care for critical neonates is serious, especially since these isolates were able to express high

intensity mechanisms that allow establishment of the disease and avoidance of host defenses.

The production of DNase is described for some species of bacteria such as *Staphylococcus*, but few studies have demonstrated the expression of this enzyme among fungi, even for *Candida* species, with few reports in the literature dealing with this subject [6,15]. In this study, a little more than 40% of the isolates presented DNase activity, and *C. famata* and the *C. parapsilosis* complex were mostly positive for the activity of the enzyme in question.

The isolates of *C. albicans*, on the other hand, were negative for DNase, although all had moderately or intensely expressed haemolytic activity and biofilm. An earlier study by our group showed that 20% of the isolates from invasive infections evaluated for DNase production had enzyme activity, most of them being *C. albicans* isolates [6]. Another study conducted with *C. albicans* alone, isolated from the oral cavity of HIV positive and negative individuals, observed the expression of the enzyme in 32% and 12.2% in the respective groups [15]. Isolated from different anatomical sites, and from the same sites, but from patients in different pathological conditions, they express virulence factors with varied intensities *in vitro*. Different studies show this condition, and it is observed that DNase activity is also variable according to the strain considered and between different species.

The presence of *C. parapsilosis* is more common in the skin microbiota, while *C. albicans* is found more frequently in the mucous membranes but can also be carried by the hands, along with other species. Contact between these isolates and immunocompromised individuals or medical devices may enable colonisation of the tissue or device. As the isolates are capable of adhesion, biofilm formation, and expression of hydrolytic enzymes, which in maintenance of the infectious process, and evasion of the host defense mechanisms, this information can contribute to the care of patients in the NICU.

In yeast, biofilm formation has been studied with greater attention in the last decade due to the increase in invasive fungal infections. This is important to understand its process of installation and how it influences the decreased antifungal susceptibility [24]. In this study, the intensity of biofilm formation by *Candida* species isolated from the hands of health professionals from a NICU was evaluated and the majority of

isolates (86%) were biofilm-forming, with 34% showing moderate or accentuated formation, facilitating the permanence of this microorganism in the unit. The species with the highest number of positive isolates were *C. parapsilosis* complex and *C. albicans*. Contrary to the literature, *C. albicans* was the species with the highest percentage of isolates with moderate biofilm production [25]. These results point to the site and isolation population, which is in daily contact with patients who do not yet have their immunological defenses fully formed and who are submitted daily to invasive procedures for the installation of devices suitable for colonisation and subsequent formation of this extracellular matrix, such as catheters and parenteral nutrition.

Reports on the susceptibility of *Candida* species to antifungals have contributed to knowledge about the situation and epidemiology, as well as surveillance regarding the emergence of resistance among the population of microorganisms that circulate in a given environment. *Candida* spp. is the fourth most frequent pathogen in invasive infections [2]. Reports of fluconazole resistant species, for example, are a worrying situation since this is generally the first choice antifungal in the treatment of invasive candidiasis in neonates. Most of the isolates studied were sensitive to the three antifungal agents tested, as has been observed in other studies evaluating the sensitivity of isolates of candidemia and superficial candidiasis in Brazil and the world [2,26].

The *C. parapsilosis* complex showed a dose-dependent sensitivity (n=3) as well as resistance (n=2) to fluconazole, in addition to having a significantly higher MIC value for micafungin compared to other species, this is the most common non-*albicans* species in invasive candidiasis in neonates [1]. Bonassolia, Bertolia, and Svidzinski [8], in a study with *C. parapsilosis* isolated from hands of health professionals found a smaller number (7.6%) of isolates with reduced sensitivity and lower MIC value (mean MIC 5.42 µg/mL) than observed in this study. This reduced sensitivity and resistance to fluconazole was also reported by other authors who studied *Candida* spp. isolated from invasive and environmental infections [27,28]. *In vitro* resistance to amphotericin B and micafungin was observed for *C. lusitaniae*, *C. famata*, and *C. glabrata*. The isolation, from health professionals' hands, of yeast resistant to the major classes of antifungal agents available for the treatment of invasive candidiasis draws attention not only because these professionals work with an audience with an immune system that is not fully formed, and who present several risk factors for the development of infections such as premature and very low birth weight infants, which can make the choice of

antifungal therapy more complicated. The reduced susceptibility presented by the isolates from this study may be related to the marked expression of biofilm, since resistant isolates were moderate or strong biofilm forming agents, whereas those SDD weakly expressed the biofilm. This condition is favorable because this extracellular matrix can confer protection and allow the spread of fungal cells [2].

In conclusion, a diversity of *Candida* species were obtained from the microbiota on the hands of health professionals, with a predominance of the *C. parapsilosis* complex. In addition, the study shows that isolates from colonisation of the hands of health professionals are virulent, since most of the isolates were able to express at least one of the three virulence factors evaluated, especially *C. famata*, an emerging species in hospital environment, which significantly expressed haemolytic activity, DNase, and biofilm. Isolates resistant to antifungal classes used in the treatment of invasive candidiasis in the NICU were also found, with fluconazole being the antifungal with the highest number of isolates with reduced susceptibility. These results draw attention to the need for greater rigor in the practice of hand hygiene to control infections and effective application of precautionary measures to prevent contact between these microorganisms present in the microbiota with critically ill patients.

### **Conflict of interest**

The authors declare that there is no conflict of interest.

### **Acknowledgments**

The authors thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the Scientific Initiation grants awarded to Felipe Flávio Silva and Sávia G. O. Melo. They also thank the Technical Course in Clinical Analyses (ESTES-UFU) for providing the necessary equipment and reagents to carry out all the tests. To Professor Regina Helena Pires of the Franca University for assigning the ATCC strains of the *C. parapsilosis* complex required to carry out the molecular differentiation of these isolates through the RFLP.

## References

- 1 - Izquierdo G, Santolaya ME. Invasive candidiasis in newborns: diagnosis, treatment and prophylaxis. *Rev Chilena Infectol.* 2014; 31(1): 73-83.  
<https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000100011>
- 2 - Seneviratne CJ, Rajan S, Wong SS, et al. Antifungal susceptibility in serum and virulence determinants of candida blood stream isolates from Hong Kong. *Front Microbiol.* 2016; 7: 216. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00216>
- 3 - Strollo S, Lionakis MS, Adjemian J, Steiner CA, Prevots DR. Epidemiology of hospitalizations associated with invasive candidiasis, United States, 2002-2012. *Emerg Infect Dis.* 2016; 23(1): 7-13. <https://doi.org/10.3201/eid2301.161198>
- 4 - Mandelblat M, Frenkel M, Abbey D, Ben Ami R, Berman J, Segal E. Phenotypic and genotypic characteristics of *Candida albicans* isolates from bloodstream and mucosal infections. *Mycoses.* 2017; 60(8): 534-545. <https://doi.org/10.1111/myc.12623>
- 5 - Favero D, Furlaneto-Maia L, França EJ, Góes HP, Furlaneto MC. Haemolytic factor production by clinical isolates of *Candida* species. *Current Microbiology.* 2011; 68(6): 161-166.
- 6 - Riceto EB, Menezes RP, Penatti MP, Pedroso RS. Enzymatic and hemolytic activity in different *Candida* species. *Rev Iberoam Micol.* 2015; 32(2): 79-82.  
<https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.11.003>
- 7 - Zhang X, Zhao S, Sun L, et al. Different virulence of *Candida albicans* is attributed to the ability of escape from neutrophil extracellular traps by secretion of DNase. *Am J Transl Res.* 2017; 9(1): 50-62.
- 8 - Bonassoli LA, Bertoli M, Svidzinski TI. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *J Hosp Infect.* 2005; 59(2): 159-162.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.06.033>
- 9 - Brühwasser C, Hinterberger G, Mutschlechner W, Kaltseis J, Lass-Flörl C, Mayr A. A point prevalence survey on hand hygiene, with a special focus on *Candida* species. *Am J Infect Control.* 2016; 44(1): 71-73.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.07.033>
- 10 - Orozco PA, Cortés JA, Parra CM. Colonization by yeasts in newborns and healthcare personnel in a neonatal intensive care unit at a university hospital in Bogotá, Colombia. *Rev Iberoam Micol.* 2009; 26(2): 108-111.  
[https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(09\)70020-8](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(09)70020-8)
- 11 - Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins Vaccari EM, Melo NT. *Tratado de Micologia Médica.* 2002, São Paulo: Sarvier.
- 12 - Estrada-Barraza D, Dávalos Martínez A, Flores-Padilla L, Mendoza-de Elias R, Sánchez-Vargas LO. Comparación entre métodos convencionales, chromAgar *Candida* y el método de la PCR para identificación de especies de *Candida* en aislamientos clínicos. *Rev Iberoam Micol.* 2011; 28: 36-42.  
<https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.11.003>
- 13 - Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR, Maiden MCJ, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(1): 284-292.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.284-292.2005>
- 14 - Sánchez M, Colom F. Extracellular DNase activity of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Rev Iberoam Micol.* 2010; 27(1): 10-13.  
<https://doi.org/10.1016/j.riam.2009.11.004>
- 15 - Menezes RP, Riceto EBM, Borges AS, Röder DVB, Pedroso RS. Evaluation of virulence factors of *Candida albicans* isolated from HIV positive individuals using



HAART. Arch Oral Biol. 2016; 66: 61-65.

<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.02.004>

16 - Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. Nat. Protoc. 2008; 3(9): 1494–1500.

<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.141>

17 - CLSI. Clinical and laboratory standards institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved standard-M27-A3-S3. Clinical and Laboratory Standards Institute 2008.

18 - CLSI. Clinical and laboratory standards institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement. Document M27-S4. Clinical and Laboratory Standards Institute 2012.

19 - Tamura NK, Negri MF, Bonassoli LA, Svidzinski TI. Virulence factors for *Candida* spp. recovered from intravascular catheters and hospital workers hands. Rev Soc Bras Med Trop. 2007; 40(1): 91-93.

<https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000100021>

20 - Gomes CC, Guimarães LS, Pinto LCC, Camargo GADCG, Valente MIB, Sarquis MIM. Investigations of the prevalence and virulence of *Candida albicans* in periodontal and endodontic lesions in diabetic and normoglycemic patients. J Appl Oral Sci. 2017; 25(3): 274-281.

<https://doi.org/10.1590/1678-7757-2016-0432>

21 - Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiol Rev. 2012; 36(2): 288-305.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x>

22 - Beyda ND, Chuang SH, Alam MJ, et al. Treatment of *Candida famata* bloodstream infections: case series and review of the literature. J Antimicrob Chemother. 2013; 68(2): 438-443. <https://doi.org/10.1093/jac/dks388>

23 - Raturi S, Chandran S, Viswanathan R. A case of *Candida famata* sepsis in a very low birth weight infant successfully treated with fluconazole following antifungal susceptibility testing. Med J Dr DY Patil Univ 2015; 8: 528-530.

<https://doi.org/10.4103/0975-2870.160828>

24 - Treviño-Rangel RJ, Rodríguez-Sánchez IP, Rosas-Taraco AG, Hernández-Bello R, González JG, González GM. Biofilm formation and genetic variability of BCR1 gene in the *Candida parapsilosis* complex. Rev Iberoam Micol. 2015; 32(3): 180-184.

<https://doi.org/10.1016/j.riam.2014.11.001>

25 - Alenzi FQ. Virulence factors of *Candida* species isolated from patients with urinary tract infection and obstructive uropathy. Pak J Med Sci. 2016; 32(1): 143-146.

26 - Razzaghi-Abyaneh M, Sadeghi G, Zeinali E, et al. Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from superficial candidiasis in outpatients in Iran. J Mycol Med. 2014; 24(2): e43-50.

<https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.01.004>

27 - Liao X, Qiu H, Li R, et al. Risk factors for fluconazole resistant invasive candidiasis in intensive care unit patients: an analysis from the China survey of candidiasis study. J Crit Care. 2015; 30(4): 862.

<https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2015.04.002>

28 - Savastano C, De Oliveira Silva E, Gonçalves LL, Nery JM, Silva NC, Dias AL. *Candida glabrata* among *Candida* spp. from environmental health practitioners of a

Brazilian Hospital. Braz J Microbiol. 2016; 47(2): 367-372.  
<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.05.001>