

# Fatores de risco associados à colonização por *Candida* spp em neonatos internados em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal brasileira

Risk factors associated with colonization by *Candida* spp in neonates hospitalized in a Neonatal Intensive Care Unit in Brazil

Raniery Martins Borges<sup>1</sup>, Leandro Rafael Soares<sup>1</sup>, Cristiane Silveira de Brito<sup>1</sup>, Denise Von Dolinger de Brito<sup>1</sup>, Vânia Olivetti Steffen Abdallah<sup>2</sup> e Paulo Pinto Gontijo Filho<sup>1</sup>

## RESUMO

Os objetivos desse estudo foram investigar a participação de *Candida albicans* e não-*albicans* como agente de colonização e sepse, bem como os fatores de risco associados aos neonatos internados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. Foi realizada vigilância epidemiológica pelo sistema *National Healthcare Safety Network* no período entre agosto de 2007 e abril de 2008. A taxa de incidência de sepse com critério microbiológico foi de 6,7/1.000 paciente/dia, constatando-se apenas um caso de candidemia. Aproximadamente, 19% dos neonatos estavam colonizados por *Candida*, identificadas como *Candida albicans* (50%) e *Candida* não-*albicans* (50%). Os fatores de risco significantes para colonização por *Candida* spp foram a idade gestacional entre 26 e 30 semanas, o uso prévio de antibiótico e o cateter vascular central umbilical. A mortalidade total foi de 11,8% nos neonatos internados durante o período de estudo com sepse, porém o recém-nascido com candidemia não evoluiu para óbito.

**Palavras-chaves:** Neonatos críticos. Colonização. *Candida* spp. Fator de risco.

## ABSTRACT

The objectives of this study were to investigate the participation of *Candida albicans* and non-*albicans* as colonization and sepsis agents, along with the risk factors associated with the neonates in the neonatal intensive care unit of the clinical hospital of the Federal University of Uberlândia. Epidemiological surveillance was implemented through the National Healthcare Safety Network between August 2007 and April 2008. The incidence rate for sepsis with microbiological criteria was 6.7/1,000 patients/day, which was shown as only one case of candidemia. Approximately 19% of the neonates were colonized by *Candida*, which was identified as *Candida albicans* (50%) and *Candida* not-*albicans* (50%). The significant risk factors for *Candida* spp colonization were gestational age of between 26 and 30 weeks, previous antibiotic use and umbilical central vascular catheter. The overall mortality among the neonates hospitalized with sepsis over the study period was 11.8%. However, the neonate with candidemia did not die.

**Key-words:** Critical neonates. Colonization. *Candida* spp. Risk factor.

A sepse fúngica está tornando-se cada vez mais frequente no período neonatal, especialmente nos neonatos de muito baixo peso, sendo usualmente uma condição grave que acomete preferencialmente os recém-nascidos submetidos a procedimentos invasivos e, está relacionada à elevada morbi-mortalidade<sup>12</sup>.

*Candida albicans* é a principal espécie capaz de provocar infecção hospitalar em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN), entretanto, outras espécies não-*albicans* tiveram aumento em suas frequências nos últimos anos incluindo a *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Candida glabrata*<sup>19</sup>.

Acredita-se que a maioria dos episódios de candidemia sejam adquiridos de origem endógena, pela translocação do patógeno através da mucosa do trato gastrointestinal, local onde a colonização por este fungo ocorre em até 70% da população normal<sup>13</sup>. Qualquer variável que provoque desequilíbrio da microbiota ou lesão da mucosa gastrointestinal pode ser um agente facilitador de translocação de *Candida* spp do lúmen intestinal para os capilares mesentéricos<sup>3</sup>.

Além da prematuridade, inúmeros fatores de risco contribuem para infecção e colonização por *Candida*, tais como: extremo e

1. Laboratório de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. 2. Hospital de Clínicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

**Endereço para Correspondência:** Dra. Denise Von Dolinger de Brito. Laboratório de Microbiologia/UFU. Campus Umuarama. Av. Amazonas s/n, Bloco 4C/2º andar, 38400-000 Uberlândia, MG.

Tel: 55 34 3218-2236

e-mail: denisebrito@terra.com.br

Recebido para publicação em 23/04/2009

Aceito em 11/08/2009

muito baixo peso, estrutura imatura da pele, idade gestacional, tempo de internação, o uso prolongado de antimicrobianos, inserção de cateter venoso central, nutrição parenteral, ventilação mecânica, uso de esteróides e colonização fúngica preexistente<sup>14 15 18</sup>.

Os objetivos desse estudo foram investigar a participação de *Candida albicans* e não-*albicans* como agente de colonização e sepse, bem como os fatores de risco associados à colonização em neonatos internados na UTIN do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU).

## MATERIAL E MÉTODOS

**Instituição.** O Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia é um hospital de ensino, assistência terciária, com 510 leitos. A UTIN compreende dez leitos e faz parte do Berçário de Alto Risco da instituição.

**Vigilância de infecção.** Foi realizada vigilância epidemiológica pelo sistema *National Healthcare Safety Network* (NHSN) para avaliação da ocorrência de candidemias em neonatos críticos, no período agosto de 2007 a abril de 2008. Os neonatos foram monitorados diariamente em busca de infecção de corrente sanguínea por esses microrganismos. Adicionalmente, foram realizadas coletas semanais de mucosas oral e perianal para avaliar a relação entre colonização prévia e infecção por representantes do gênero *Candida* spp de todos os pacientes internados no período do estudo.

**Técnicas microbiológicas. Coleta de matéria-pesquisa de colonização:** foram realizadas coletas semanais de mucosa oral e perianal, com o auxílio de swab estéril pré-umedecido com salina estéril e com Trypticase Soy Broth (TSB), respectivamente. Os espécimes das cavidades bucal e anal e as amostras provenientes de episódios de candidemia foram cultivadas em placas de CHROMagar™ *Candida* (DIFCO- USA) para caracterização presuntiva das colônias em *Candida albicans* (colônias com coloração verde), *Candida tropicalis* (colônias com coloração azul), *Candida krusei* (colônias com coloração rosa) e outras espécies (colônias com coloração branca). As placas foram incubadas à temperatura de 35°C, por 24 a 72hs.

**Hemoculturas:** os espécimes de sangue foram obtidos a partir de punção de veia periférica. As hemoculturas foram realizadas inoculando-se 5 a 10mL de sangue em um frasco do sistema comercial automatizado Bactec/Alert® (Vitek System) no laboratório de microbiologia do HC-UFU. Os espécimes positivos foram subcultivados em placa com agar sangue, incubada a 35°C, por 24 a 48 horas.

**Estocagem das amostras.** As amostras obtidas de infecção e colonização de mucosas oral e perianal foram estocadas em tubos contendo TSB acrescidos de glicerol 20% e mantidos no freezer a -20°C.

**Identificação das espécies de *Candida* spp.** Foram caracterizadas por meio de testes de fermentação dos seguintes carboidratos: glicose, galactose, trealose, maltose, celobiose, rafinose e lactose, utilizando-se o kit de identificação Candifast (I.M. - França, e as leituras foram realizadas após incubação a 35°C, por 48hs.

### Teste de suscetibilidade aos antifúngicos (*in vitro*).

Os inóculos foram obtidos a partir do subcultivo em caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth) à temperatura de 35°C, e incubação por 24hs. A suspensão resultante foi semeada em CHROMagar™ *Candida* (DIFCO- USA) e após incubação à 35°C, foram realizados testes de suscetibilidade aos seguintes antifúngicos: Anfotericina B, Fluconazol, Nistatina, Flucitosina, Econazol, Ketoconazol e Miconazol; utilizando-se o kit Candifast (I.M. - França).

**Análise estatística.** Foi realizada análise estatística para confirmação da significância dos principais fatores de risco para as infecções. Para isto, foram realizados o teste do  $\chi^2$  para comparação entre as variáveis qualitativas, o teste exato de Fisher para analisar as variáveis qualitativas com o *n* menor ou igual a 5 e o teste t de Student para analisar variáveis quantitativas. Estes dados serão analisados através do programa Epi Info Software versão 2000 (CDC, Atlanta).

**Ética do estudo.** Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia.

## RESULTADOS

No total, 114 neonatos foram incluídos no estudo realizado na UTIN do HC-UFU, no período de agosto de 2007 a abril de 2008, perfazendo um total de 2.532 pacientes/dia. Aproximadamente 40% (46/114) dos pacientes apresentaram sepse clínica e menos da metade (37%) foram ratificadas por critério microbiológico, incluindo 23,5% (4/17) com extremo baixo peso ( $\leq 1.000$ g). A taxa de incidência de sepse com critério microbiológico foi de 6,7/1.000 paciente/dia, constatando-se apenas um caso de candidemia, correspondendo a uma taxa de incidência de 0,4/1.000 paciente/dia. Os principais agentes de sepse foram bactérias do gênero *Staphylococcus* spp (82,3%) representados por *Staphylococcus coagulase negativa* (64,3%) e o *Staphylococcus aureus* (35,7%).

Apesar de ter sido detectado apenas um caso de candidemia (0,9%), 19,3% (22/114) dos neonatos estavam colonizados por *Candida*, correspondente a 45 amostras recuperadas de mucosa oral e perianal, sendo caracterizadas como *Candida albicans* (51,1% - 23/45), *Candida krusei* (22,2% - 10/45), *Candida glabrata* (15,6% - 7/45), *Candida parapsilosis* (8,9% - 4/45) e *Candida tropicalis* (2,2% - 1/45) (**Figura 1**). Esta colonização foi mais freqüente na região perianal (68,9%) do que na boca (31,1%).

Os fatores de risco relacionados significativamente à colonização por *Candida* spp foram: idade gestacional entre 26 e 30 semanas, uso prévio de antibiótico e o uso do cateter vascular central umbilical (**Tabela 1**).

Das 45 amostras isoladas de neonatos colonizados, 93,3% (42/45) foram resistentes aos seguintes antifúngicos: anfotericina B, fluconazol, nistatina, flucitosina, econazol, ketoconazol e miconazol, sendo 23 (51,1%) de *Candida albicans*, 10 (22,2%) de *Candida krusei*, 4 (8,9%) de *Candida parapsilosis*, 4 (8,9%) de *Candida glabrata* e, 1 (2,2%) de *Candida tropicalis*. No total, apenas 3 (6,7%) amostras foram sensíveis aos antifúngicos testados e, corresponderam a *Candida glabrata*.

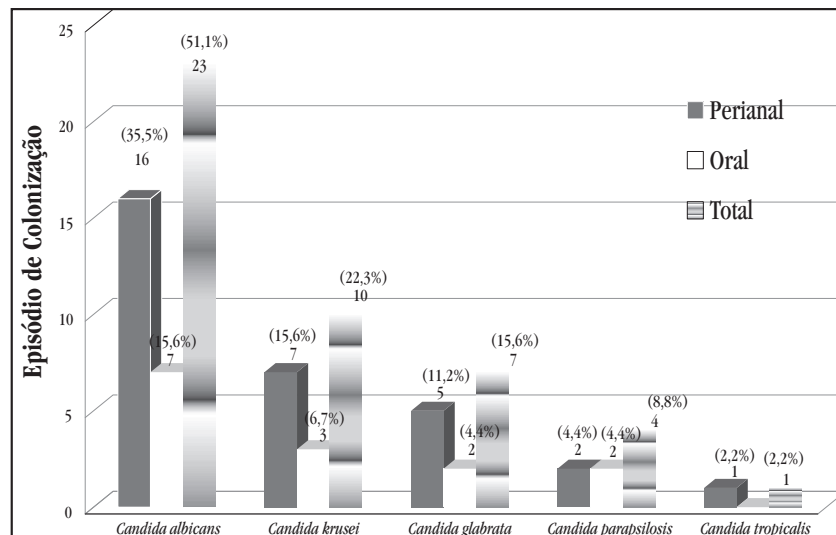


FIGURA 1

Distribuição dos episódios de colonização por *Candida* spp e sítio de coleta em neonatos internados no HC-UFU, no período de agosto de 2007 a abril de 2008

TABELA 1

Fatores de risco para colonização por *Candida* spp e mortalidade em neonatos internados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia no período de agosto de 2007 a abril de 2008.

Fatores de risco	Casos (n <sup>o</sup> =22)		Controle (n <sup>o</sup> =60)		P	OR	(IC <sub>95%</sub> )
	n <sup>o</sup>	%	n <sup>o</sup>	%			
Peso(g)							
≤1.000	3	13,7	3	5,0	0,33	3,00	(0,43-20,91)
1.001-1.500	7	31,8	22	36,7	0,88	0,81	(0,25-2,54)
1.505-2.500	5	22,7	19	31,7	0,60	0,63	(0,17-2,21)
>2.500	7	31,8	16	26,6	0,85	1,28	(0,39-4,18)
Idade gestacional (semanas)							
<26	0	0,0	2	3,3	1,00	0,00	(0,00-11,63)
26-30	8	36,4	8	13,3	0,02*	3,71	(1,03-13,58)
31-36	7	31,8	35	60,0	0,06	0,33	(0,10-1,04)
≥37	7	31,8	14	23,4	0,62	1,53	(0,46-5,10)
Tempo de hospitalização (dias)							
≤7	7	31,8	32	53,3	0,13	0,41	(0,13-1,27)
>8	15	68,2	28	46,7	0,13	2,45	(0,79-7,82)
SNAP-II							
0-9	9	40,9	17	28,3	0,41	1,75	(0,56-5,45)
10-19	7	31,8	28	46,7	0,69	0,70	(0,21-2,28)
≥20	6	27,3	15	25,0	0,93	1,13	(0,32-3,83)
SNAPPE-II							
0-9	8	36,4	17	28,3	0,66	1,45	(0,45-4,57)
10-19	6	27,2	21	35,0	0,69	0,70	(0,21-2,28)
≥20	8	36,4	22	36,7	0,81	0,99	(0,32-3,04)
Entubado	11	50,0	16	26,7	0,08	2,75	(0,89-8,57)
NPT	14	63,6	32	53,3	0,56	1,53	(0,50-4,72)
Uso prévio de antibiótico	20	90,9	24	40,0	<0,01*	15,00	(2,94-102,55)
Em uso de CVC							
intracath	3	15,8	1	2,6	0,09	7,13	(0,58-192,72)
flebotomia	6	31,6	7	17,9	0,31	2,11	(0,50-8,94)
PICC	10	52,6	23	59,0	0,86	0,77	(0,22-2,68)
Umbilical	0	0,0	8	20,5	0,04*	0,00	(0,00-1,26)
Mortalidade	4	18,2	3	5,0	0,07	4,22	(0,70-26,89)

P = ≤0,05, OR: odds ratio, IC: intervalo de confiança, SNAP-II: score for neonatal acute physiology II, SNAPPE-II: score for neonatal acute physiology perinatal extension, NPT: nutrição parenteral total, CVC: cateter vascular central, PICC: cateter central de inserção periférica

A mortalidade total foi de 11,8% nos neonatos internados durante o período de estudo com sepse, mas o recém-nascido com candidemia não evoluiu para óbito.

## DISCUSSÃO

Neste estudo, aproximadamente 40% (46/114) dos neonatos apresentaram sepse clínica e 36,9% (17/46) destes pacientes apresentaram sepse com diagnóstico microbiológico, observando-se uma incidência de 6,7/1.000 paciente/dia.

A maioria das infecções fúngicas neonatais é causada por *Candida*, particularmente *Candida albicans*. Entretanto, as espécies *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* estão se tornando frequentes nos últimos anos, inclusive em surtos de UTIN<sup>9,17</sup>. No período investigado, foi encontrado somente um caso de candidemia por *Candida albicans*.

A candidemia é causa significativa de morbidade e mortalidade em pacientes críticos e imunocomprometidos, e contribui para o aumento no tempo de hospitalização e nos custos médicos<sup>5</sup>. Neste trabalho, houve apenas um caso de candidemia detectado no HC-UFU; entretanto, a criança veio transferida de outro hospital.

Sastre e cols<sup>16</sup>, em estudo prospectivo multicêntrico incluindo 20.565 neonatos admitidos em 27 unidades neonatais na Espanha, relataram 6 casos de candidíase sistêmica. Linder e cols<sup>8</sup>, em Israel, registraram candidemia em 1,3% de 4.201 recém-nascidos admitidos em uma UTIN. A frequência de candidemia é maior nos estudos que incluem somente recém-nascidos de baixo peso, com variação de 2,2 a 12,9% nos recém nascidos com peso inferior a 1.500g e de 5,5% a 16,5% naqueles com menos de 1.000g<sup>18</sup>. Como foi evidenciado anteriormente, este estudo detectou a presença de apenas uma criança infectada por *Candida* (0,9%), dentre 114 neonatos críticos investigados, constatando uma taxa de incidência de 0,4/1.000 paciente/dia, sendo que o peso ao nascer deste recém-nascido foi 3.860g, diferentemente do encontrado na literatura acima citada.

A colonização por *Candida* tem sido mostrada em alguns estudos como um fator de risco independente para candidemia. Os sítios onde a colonização é mais frequente incluem as mucosas da boca e intestino<sup>6</sup> com a mucosa oral, variando de 20% a 55%<sup>10</sup> e mucosa do intestino (74%)<sup>4</sup>. Nas crianças incluídas nesta investigação, a colonização na região perianal foi alta (68,9%), sendo a *Candida albicans* a mais prevalente correspondendo a 51,6% das amostras de mucosa perianal. Os fatores de risco relacionados significativamente com a colonização foram: idade gestacional entre 26 e 30 semanas e o uso prévio de antibiótico ( $P \leq 0,05$ ), entretanto o extremo baixo peso e o uso de *intracath* apresentaram *Odds ratio* igual a 3 e 7,13, respectivamente.

As fontes de candidíase invasiva são usualmente endógenas a partir da colonização das mucosas, principalmente intestinal, do neonato. O recém-nascido crítico é colonizado muito cedo, cerca de 10% destes se tornam colonizados na primeira semana de vida, e mais de 64% estão colonizados após quatro semanas de hospitalização<sup>7</sup> embora haja evidências de correlação entre colonização fúngica e doença invasiva em neonatos de extremo

baixo peso<sup>1</sup>. Neste estudo não foi possível verificar se o neonato infectado estava previamente colonizado pelo fato de ter sido proveniente de outro hospital da região. Em relação ao grupo de pacientes colonizados, verificou-se que 19,3% (22/114) dos neonatos estavam colonizados por *Candida*, identificadas como *Candida albicans* (50%) e *Candida não-albicans* (50%), sendo que o extremo baixo peso não apresentou frequência estatisticamente significativa, representando 13,7% dos casos.

Há evidências que as amostras *Candida* spp isoladas de pacientes de UTIN apresentam susceptibilidade diminuída aos agentes antifúngicos, devido ao aumento expressivo no seu uso<sup>13</sup>. Em relação ao grupo dos azóis, a *Candida albicans* apresenta resistência ao fluconazol < 5%, enquanto a *Candida krusei* tem resistência intrínseca a este fármaco<sup>2</sup>. Neste trabalho, a maioria (93,3%) das amostras de espécies de *Candida* foi resistente aos antifúngicos testados.

A taxa de mortalidade total por infecções fúngicas é alta, podendo atingir 50% em recém-nascidos<sup>11</sup>. No presente estudo, a mortalidade total foi de 11,8% naqueles neonatos que apresentaram sepse e o caso de candidemia não evoluiu para óbito.

Embora fosse detectado apenas um caso de candidemia durante o período investigado, aproximadamente 20% dos neonatos estavam colonizados por *Candida*, particularmente quando em uso de antibióticos, idade gestacional entre 26 e 30 semanas e em uso de cateter vascular central umbilical. A colonização na mucosa intestinal foi mais expressiva do que na observada na boca (68,9% vs 31,1%).

## REFERÊNCIAS

1. Brencht M, Clerihew L, Mc Guire W. Prevention and treatment of invasive fungal infection in very low birthweight infants. Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition 94:65-69, 2009.
2. Charlier C, Hart E, Lefort A, Ribaud P, Dromer F, Denning DW, Lortholary O. Fluconazole for the management of invasive candidiasis: where do we stand after 15 years? The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 57:384-410, 2006.
3. Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 6:599-607, 2003.
4. Gagneur A, Sizun J, Vernotle E, Parscau T, Quino DAM, Flohic LE, Baron R. Low rate of *Candida parapsilosis* – related colonization and infection in hospitalized preterm infants: a one-year prospective study. The Journal of Hospital Infection 48:193-197, 2001.
5. Garland JS, Uhing MR. Strategies to prevent bacterial and fungal infection in the Neonatal Intensive Care Unit. Clinics in Perinatology 36:1-13, 2009.
6. Gill SS, Swoboda SM, Johnson EA, Merz WG, Pelz RK, Lipsett PA, Hendrix CW. The association between anatomic site of *Candida* colonization invasive candidiasis, and mortality in critically ill surgical patients. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 55:293-301, 2006.
7. Kuzucu C, Durmaz R, Otlu B, Aktas E, Gulcan H, Cizmeci Z. Species distribution, antifungal susceptibility and clonal relatedness of *Candida* isolates from patients in neonatal and pediatric intensive care units at a medical Center in Turkey. The New Microbiologica 31:401-408, 2008.
8. Linder N, Klinger G, Shalit I, Levy I, Ashkenazi S, Haski G, Levit O, Sirota L. Treatment of candidemia in premature infants: comparison of three amphotericin B preparations. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 52:663-667, 2003.

9. Lopez-Sastre JB, Gil D, Coto-Coballo MD, Fernandez B, Grupo de Hospitales Castrillo. Neonatal invasive candidiasis: a prospective multicenter study of 118 cases. *American Journal of Perinatology* 20:153-163, 2003.
10. Makhoul IR, Sujov P, Ardekian L, Kassis I, Smolkin T, Abu-Elnaa'j I, Tamir A, Laufer D. Factors influencing oral colonization in premature infants. *The Israel Medical Association Journal* 4:98-102, 2002.
11. Rao S, Ali U. Systemic fungal infections in neonates. *Journal of Postgraduate Medicine*, 51 (suppl):27-29, 2005.
12. Richtmann R, Takagi NB, Valcilotto E, Kusano E, Marques MRM, Baltieri SR, Arriero GD, Amaro ER. Candidemia em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal: onde Estamos? *Revista da Sociedade Paulista de Infectologia* 1:5-9, 2005.
13. Roilides E, Farmaki E, Evdoridou J, Dotis J, Hatzionnidis E, Tsivitanidou M, Bibashi E, Filoti I, Sofianou D, Gil-Lamaignere C, Mueller FM, Kremenopoulos G. Neonatal candidiasis: analysis of epidemiology, drug susceptibility, and molecular typing of causative isolates. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 23:745-750, 2004.
14. Saiman L, Ludington E, Dawson JD, Patterson JE, Rangel-Frausto S, Wiblin RT, Blumberg HM, Pfaller M, Rinaldi M, Edwards JE, Wenzel RP, Jarvis W. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 20:1119-1124, 2001.
15. Saiman L, Ludington E, Pfaller M, Rangel-Frausto S, Wiblin RT, Dawson J, Blumberg HM, Patterson JE, Rinaldi M, Edwards JE, Wenzel RP, Jarvis W. Risk factors for candidemia in neonatal intensive care unit patients. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 19:319-324, 2000.
16. Sastre JBL, Cotallo GDC, Colomer BF, Castrillo GH. Neonatal Invasive Candidiasis: a prospective multicenter study of 118 cases. *American Journal of Perinatology* 20:153-163, 2003.
17. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Lemons JA, Donovan EF, Stark AR, Tyson JE, Oh W, Bauer CR, Korones SB, Shankaran S, Laptook AR, Stevenson DK, Papile LA, Poole WK. Late-onset sepsis in very-low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 110:285-291, 2002.
18. Vendettuoli V, Tana M, Tirone C, Posteraro B, La Sorda M, Fadda G, Romagnoli C, Vento G. The role of *Candida* surveillance cultures for identification of a preterm subpopulation at highest risk for invasive. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 27:114-116, 2008.
19. Vendettuoli V, Vento G, Tirone C, Posteraro B, Romagnoli C. Antifungal prophylaxis: identification of preterm neonates at highest risk for invasive fungal infection. *Pediatrics* 123: 368-369, 2009.