

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

SIMONE SANTANA PEREIRA

Abordagem clínica e laboratorial sobre um caso de septicemia por *Candida parapsilosis* em um neonato com onfalocele.

Maringá
2016

SIMONE SANTANA PEREIRA

Abordagem clínica e laboratorial sobre um caso de septicemia por *Candida parapsilosis* em um neonato com onfalocele.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof^a Dr^a Terezinha Inez Estivalet Svidzinski

Maringá
2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

SIMONE SANTANA PEREIRA

Abordagem clínica e laboratorial sobre um caso de septicemia por *Candida parapsilosis* em um neonato com onfalocele.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a. Dr^a. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^a. Dr^a. Melyssa Negri
Instituto de Ciências Biomédicas USP

Prof^a. Dr^a. Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 31 de março de 2016

Local de defesa: Sala 01, Bloco 126, campus da Universidade Estadual de Maringá.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e a possibilidade de empreender esse caminho evolutivo, por propiciar tantas oportunidades de estudos e por colocar em meu caminho pessoas tão especiais.

Aos meus pais, João e Maria, pelo apoio incondicional, dedicação, carinho e incentivo durante toda minha vida.

À minha família, especialmente ao meu esposo Rhandall pela paciência, incentivo e força e aos meus filhos queridos, André Luíz e Ana Clara pela compreensão e carinho.

À minha querida orientadora Prof^ª. Dr^ª. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski pela oportunidade e ensinamento transmitido, por ser uma professora que inspira e a quem tenho grande admiração, carinho e respeito.

À professora Melyssa Negri, pela paciência, ajuda e apoio durante todo o processo do mestrado.

À minha amiga doutoranda Tânia Salci, pela ajuda nas práticas laboratoriais e colaboração prestada ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Micologia Médica pela ajuda e paciência em especial à prof^ª Dr^ª Patrícia Bonfim e Patrícia Andriatto.

Aos professores do programa de mestrado pelos ensinamentos e trocas de experiências que enriqueceram cada encontro.

Aos colegas de turma do Mestrado em Ciências da Saúde conquistados durante esta trajetória.

Ao programa de mestrado Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá.

Aos colegas de trabalho e direção de enfermagem do Hospital Universitário de Maringá por entenderem meus anseios durante este período.

Muito obrigada!

EPÍGRAFE

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Abordagem clínica e laboratorial sobre um caso de septicemia por *Candida parapsilosis* em um neonato com onfalocele

RESUMO

A onfalocele é uma malformação onde existe uma herniação do conteúdo abdominal no ponto de inserção do cordão umbilical. Um dos principais problemas associados a essa anomalia, é o fato do neonato sofrer procedimentos cirúrgicos logo nos primeiros dias de vida, o que acaba prolongando seu período de hospitalização e aumentando os riscos para infecção por microrganismos oportunistas. Neste contexto, infecções por *Candida spp* tem sido atribuída a fatores de risco, como a administração a longo prazo de antibióticos de amplo espectro, cirurgias abdominais e procedimentos invasivos, sendo a espécie *Candida parapsilosis* mais relacionada a casos de infecção neonatal, devido à sua capacidade de adesão e de formar biofilme. O objetivo deste estudo foi ampliar conhecimentos sobre a abordagem clínica e microbiológica da septicemia por *C. parapsilosis* em um caso de neonato com onfalocele. Foi realizado um estudo descritivo com abordagem retrospectiva de um neonato que sofreu intervenções cirúrgicas nos primeiros dias de vida devido a onfalocele. Este trabalho foi dividido em duas etapas: a primeira voltada para a descrição e desfecho do caso clínico; e a segunda relacionada aos fatores de virulência de *C. parapsilosis* isolada desse neonato. Para o desenvolvimento do trabalho foi realizado o levantamento de prontuário do neonato de acordo com o Comitê de Ética da Universidade Estadual de Maringá sob parecer de aprovação nº 615.643. As leveduras foram isoladas de sangue, urina e cateter venoso central e identificadas por método clássico e MALDI TOF-MS. Foram avaliados fatores como suscetibilidade aos antifúngicos, capacidade de adesão, formação de biofilme, influência dos antifúngicos ao biofilme e a similaridade genética entre os isolados clínicos durante o período de hospitalização frente a várias tentativas terapêutica. *C. parapsilosis* foi capaz de causar septicemia no neonato mesmo sob administração de antifungoterapia, o caso evoluiu com sepse a partir dos 28 dias de vida até o óbito aos 102 dias. Foram isolados um total de 16 amostras, 14 de sangue; um de ponta de cateter e um de urina. Os 16 isolados mostraram alta capacidade de adesão, tolerância à micafungina e independente do período coletado e da amostra tratou-se da mesma levedura, salientando a importância de infecção hematogênica por *C. parapsilosis* em neonatos expostos a múltiplos fatores de risco.

Palavras-chave: *Candida parapsilosis*. Onfalocele. Neonato. Sepse.

Clinical and laboratory approach on a case of septicemia *Candida parapsilosis* in a neonate with omphalocele

ABSTRACT

The omphalocele is a malformation where there is a herniation of abdominal contents in the cord insertion point. One of the main problems associated with this anomaly is that the neonate undergoing surgical procedures in the early days of life, which ends up prolonging his hospitalization and increasing the risk of infection by opportunistic microorganisms. In this context, infection by *Candida* species have been assigned the risk factors, such as long-term administration of broad-spectrum antibiotics, abdominal surgeries and diagnostic procedures, and the species *Candida parapsilosis* is more closely related to the cases of neonatal infection due to its ability of adhesion and form biofilms. The aim of this study was to increase knowledge of the clinical and microbiological approach to sepsis by *C. parapsilosis* in a case of a neonate. A descriptive study with retrospective approach of a neonate who underwent surgery in early life due to omphalocele was conducted. This work was divided into two stages: focused on the description and outcome of the case; and related to virulence factors of *C. parapsilosis* from neonate. For the development work was carried out the neonate records survey according to the Ethics Committee of the Universidade Estadual de Maringá approval No 615643. Yeasts were isolated from blood, urine, and central venous catheter and identified by classic and MALDI-TOF MS method. They evaluated factors such as susceptibility to antifungal agents, adhesiveness, biofilm formation, influence of the biofilm antifungal and genetic similarity among clinical isolates in the front hospitalization to various therapeutic attempts. *C. parapsilosis* was able to cause sepsis in the neonate even under antifungoterapia administration, the case evolved with sepsis from 28 days of life until death after 102 days. The total of 16 isolates showed high capacity of adherence, tolerance micafungin and independent of the collected period and sample treated in the same yeast, stressing the importance of bloodborne infection by *C. parapsilosis* in neonates exposed to multiple risk factor.

Keywords: *Candida parapsilosis*. Omphalocele. Neonate. Sepsis.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulos I e III) e das publicações científicas (Capítulo II): Journal of Pediatrics (artigo 1) disponível em: <http://www.jpeds.com/>;
(artigo 2) The Journal of Hospital Infection disponível em <http://www.journalofhospitalinfection.com/>

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO I	10
1.0 Malformações congênitas	10
1.1 Onfalocele	11
1.2 Infecções neonatais	12
1.3 Infecções fúngicas neonatais	13
1.4 Infecções fúngicas por <i>Candida parapsilosis</i>	14
1.5 Medicamentos disponíveis para tratamento da Candidemia	14
1.6 Justificativa	15
1.7 Objetivos	16
1.8 Referências	17
2 CAPÍTULO II	21
2.1 Artigo 1: Caso fatal de sepse por <i>Candida parapsilosis</i> strictu sensu em recém nato com onfalocele	23
2.2 Artigo 2: Perfil de virulência de <i>C. parapsilosis</i> isolados de paciente com sepse neonatal pós correção de onfalocele	38
3 CAPÍTULO III	54
3.1 Conclusões	54
3.2 Perspectivas Futuras	54
ANEXOS	56

CAPÍTULO I

MALFORMAÇÕES CONGÊNITAS

As malformações congênicas são denominadas como anomalias presentes no momento do nascimento, aparente ou não, incluindo toda anomalia funcional ou estrutural do desenvolvimento do feto decorrente de fatores que antecedem o nascimento (C.D.C. 2008). Devido a um erro na morfogênese, é um defeito estrutural primário que resulta na formação anormal das células na constituição dos tecidos (KLIEGMAN et al., 2009). Constituem a segunda causa de óbito no Brasil, contemplando 15,2% da mortalidade infantil (GEREMIAS et al., 2009). Alguns exemplos de malformações incluem defeitos no tubo neural, fendas orofaciais, defeitos da parede abdominal e cardiopatias congênicas (KUCIK et al., 2012).

As causas de malformações estão ligadas a eventos que precedem ao nascimento, que podem ser herdadas ou adquiridas. Os principais fatores etiológicos são representados pelas condições hereditárias (genéticas), exposição a substâncias (medicamentos, álcool e drogas ilícitas), infecções (citomegalovírus, rubéola e toxoplasmose) e radiações, porém, na maioria das vezes as razões são desconhecidas (CDC, 2015).

As malformações congênicas do aparelho digestivo podem resultar de lesões intra-abdominais ou de defeitos de fechamento da parede abdominal anterior (NAKAGAWA et al., 2013). Representam um grupo de patologias com importância significativa em uma unidade de cuidados intensivos neonatais (UTIn), não apenas pela elevada frequência, morbidade e mortalidade, mas também pela complexidade de alguns casos exigindo apoio multidisciplinar (NASR et al., 2012).

A conduta dos profissionais de saúde, diante do recém-nascido (RN) portador de malformação congênita, deve ser específica e de qualidade. Este tipo de dismorfologia, embora rara individualmente, no seu conjunto torna-se relativamente frequente e exige geralmente uma equipe multidisciplinar, incluindo neonatologista, cirurgião pediátrico, geneticista, radiologista, nutricionista, enfermeiro, dentre outros (OLIVEIRA et al., 2011)

ONFALOCELE

A onfalocele é uma malformação congênita que afeta 1:4.000 a 1:10.000 nascidos vivos onde observa-se um defeito na linha média da parede abdominal e os órgãos abdominais apresentam-se expostos e envoltos por uma membrana gelatinosa, constituída de peritônio, tecido conectivo e âmnio, geralmente localiza-se na base do cordão umbilical e este fica inserido em sua extremidade (KLEINROWELER et al., 2011; PERANTEAU et al., 2015).

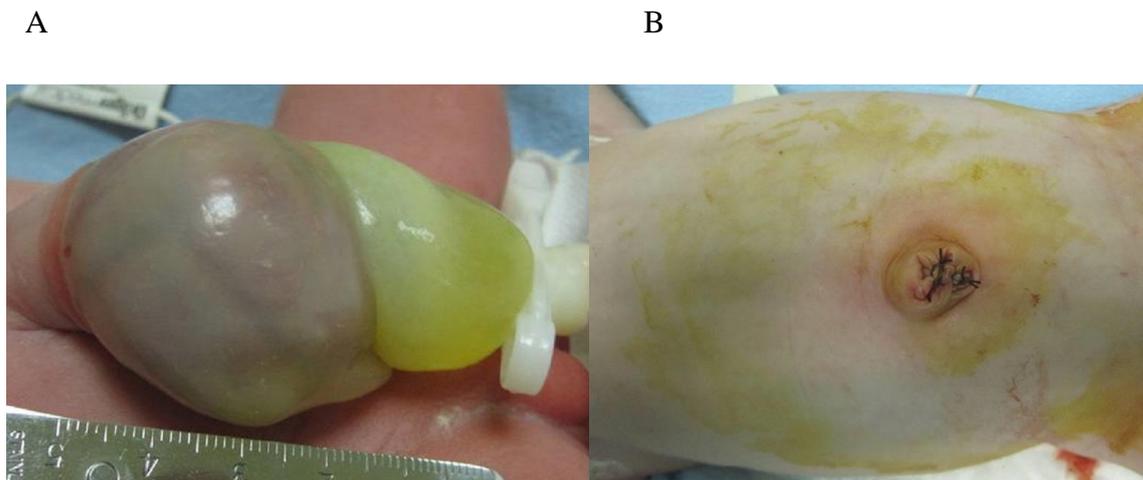


Figura 1: (A) Abdômen de neonato com Onfalocele ao nascimento; (B). Abdômen de neonato após correção de Onfalocele

Fonte: Bedside Repair of Omphalocele. *Journal Neonatal Surg.* 2012

Ao longo das últimas décadas, observa-se um aumento no número de casos de onfalocele (SPRINGETT et al., 2014). Também é possível observar uma melhor sobrevivência dos pacientes em países desenvolvidos, isso devido a vários fatores, entre eles; melhor qualidade na assistência pré-natal, diagnóstico, parto e principalmente a disponibilidade de novas tecnologias nos cuidados neonatais, destacando-se ventilação mecânica, nutrição parenteral prolongada e várias técnicas de reparo cirúrgico (LUKMAN et al., 2011).

A gênese da onfalocele ainda não está bem estabelecida, porém as que são classificadas como grandes ou gigantes onfalocele, apresentam o fígado dentro do saco herniário, parecendo ser resultado do desenvolvimento deficiente dos discos laterais do mesoderma embrionário resultando em falha no fechamento da parede abdominal (PATEL et al., 2009). Nos casos de onfalocele menores, o fígado não fica exteriorizado, apenas as alças intestinais apresentam-se

fora da cavidade abdominal e esse tipo de onfalocele denominadas como pequenas, tem sido atribuído à falha do fechamento dos discos laterais ou à falha no retorno do intestino para a cavidade abdominal no período de 12 semanas de gestação (HIDAKA et al., 2009).

Frequentemente a onfalocele está associada a outras anomalias fetais, tanto sindrômicas, estruturais, quanto cromossômicas (LAKASING et al., 2006; HENRICH et al., 2008; KUMAR et al., 2008). A sobrevivência de pacientes com onfalocele isolada, ou seja, sem outras anomalias associadas, é maior (92%) quando comparada a casos com múltiplas anomalias (81%) ou anomalias cromossômicas (27%) (SPRINGETT et al., 2014). A malformação mais comum associada a onfalocele é o defeito cardíaco, outras anomalias como alteração do sistema nervoso central, deformidades das extremidades, alterações geniturinário, espinha bífida, anomalias gastrointestinais e fendas faciais também são encontradas (HIDAKA et al., 2009).

O tratamento da onfalocele consiste no retorno dos órgãos herniados e reconstituição da parede abdominal (KRUIT et al., 2015). Quando isolada, a onfalocele costuma ter um bom prognóstico, apesar dos avanços no tratamento e técnicas cirúrgicas neonatais, este tipo de defeito na parede abdominal continua a ser uma fonte de morbidade e mortalidade (ISLAM et al., 2008; MANN et al., 2008).

Segundo Kaufman (2010), doenças gastrointestinais como a onfalocele, em que a criança não recebe dieta por via oral e/ou uso de antibióticos por mais de 7 dias, aumentam o risco de sepse fúngica. Apesar da melhora no prognóstico de neonatos com este diagnóstico, ainda existem problemas associados a essa anomalia, entre eles destaca-se os procedimentos cirúrgicos em trato gastrointestinal (TGI) logo nos primeiros dias de vida e o período de hospitalização prolongada, o que aumenta a possibilidade de colonização por micro-organismos potencialmente patogênicos existentes no ambiente hospitalar (FAWLEI et al., 2015; BIZARRO et al., 2005).

INFECCÕES NEONATAIS

Infecções neonatais continuam sendo responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. No Brasil, estima-se que 60% da mortalidade infantil ocorre no período neonatal e a sepse é uma das principais causas, de acordo com dados do sistema de informações de mortalidade (ANVISA, 2013).

Nos casos de infecção neonatal, além da imunodeficiência relativa à condição, o neonato é exposto a procedimentos invasivos e muitas vezes ao uso prolongado de antimicrobianos de amplo espectro aumentam as chances de uma infecção nesse período (CAMACHO et al., 2013; FAWLEY et al., 2015). A sepse é uma das principais causas de complicações pós-operatória (51,4%) (ABDUR et al., 2011).

Os principais patógenos envolvidos em infecções após cirurgias do TGI são os componentes da microbiota humana normal, como bactérias anaeróbias e fungos. Assim condutas de tratamento profilático com antimicrobianos são recomendados a fim de diminuir a carga microbiana no sítio cirúrgico (HOPE et al., 2012).

No diagnóstico de sepse neonatal, considera-se como padrão ouro o isolamento do patógeno em uma ou mais hemoculturas, além disso a clínica do paciente e outros achados laboratoriais também são importantes na confirmação do diagnóstico (CHIESA et al., 2004; OVALI et al., 2006). Outros preditores de sepse como a neutropenia podem indicar um mau prognóstico, a contagem de neutrófilos geralmente é mais baixa nesses casos, em comparação com outros pacientes sem sepse. Um outro marcador não específico, utilizado com frequência no diagnóstico de sepse neonatal é a Proteína C-Reativa (PCR), um componente de fase aguda que apresenta picos durante os períodos infecciosos e diminuição quando a infecção regride (ESMA et al., 2015).

INFECCÕES FÚNGICAS NEONATAIS

Infecções, de modo geral, representam uma complicação clínica grave e frequente entre os pacientes hospitalizados. No entanto, durante as últimas décadas devido aos avanços em intervenções diagnósticas e terapêuticas, os pacientes de UTIn, principalmente aqueles com cuidados intensivos cirúrgicos surgiram como uma população de alto risco para infecção, nesse contexto as infecções fúngicas, especialmente por leveduras do gênero *Candida* spp, têm aumentado consideravelmente no ambiente hospitalar (GUO-HAO et al., 2008).

A epidemiologia das espécies de *Candida* que causam infecções tem mudado nos últimos anos, embora *Candida albicans* continue sendo a principal espécie causadora de doença invasiva na maioria dos casos, *Candida* não *C. albicans* tem se destacado neste contexto. As várias espécies de *Candida* apresentam particularidades e diferenças na sua susceptibilidade

aos agentes antifúngicos, sendo cada vez mais importante valorizar a identificação dessas espécies em processos fúngicos desse tipo de infecção (SANGUINETTI et al., 2015).

Infecções por *Candida* podem resultar da proliferação ou alteração da microbiota normal humana, determinado por fatores de risco, como a administração a longo prazo de antibióticos de amplo espectro, cirurgias abdominais, transplantes, prematuridade e procedimentos invasivos (CHANG et al., 2008; KAUFMAN, 2010). A maior parte das candidemias é precedida pelo evento de colonização do próprio paciente pela mesma espécie de levedura responsável pela infecção, porém, infecções hematogênicas por *Candida* spp., podem ser adquiridas por via exógena, através do contato das mãos dos profissionais da saúde que é, uma das principais formas de contágio, principalmente em pacientes portadores de cateteres vasculares (MENEZES et al., 2012; SHAWN et al., 2008).

INFECCÕES FÚNGICAS POR *C. PARAPSILOSIS*

Embora *C. albicans* tem sido historicamente a espécie mais presente entre as espécies envolvidas nesse processo de infecção, e por conseguinte objeto da maior parte dos estudos, *C. parapsilosis* tem se destacado como um agente frequente nos casos de infecção (EIN et al., 2012). *C. parapsilosis* é a segunda espécie mais isolada em amostras de hemocultura na Europa, e tem aumentado drasticamente na última década, particularmente na América Latina. É responsável por uma grande variedade de manifestações clínicas, principalmente em indivíduos imunocomprometidos e pacientes neonatos (MENEZES et al., 2012; SHWAN et al., 2008).

Surtos hospitalares causados por esse agente tem sido descrito com frequência e a principal fonte de infecção encontradas, foram as mãos dos profissionais de saúde. Um agravante é que *C. parapsilosis* produz enzimas extracelulares e é capaz de proliferar na presença de concentrações elevadas de glicose e lipídios, o que está presente em várias dietas de nutrição parenteral comumente administradas em pacientes críticos. Em parte, isso se explica pelos fatores de virulência já descritos como sua considerável capacidade de formar biofilme em cateteres e, portanto, alta afinidade com dispositivos intravasculares (MENEZES et al., 2012; TROFA et al., 2008; RENK et al., 2015).

MEDICAMENTOS DISPONÍVEIS PARA TRATAMENTO DA CANDIDEMIA

Por serem eucarionte, os fungos compartilham várias vias do metabolismo celular básico com os seres humanos. Este fato, contribui de maneira bastante significativa para limitar a disponibilidade de drogas antifúngicas que apresentam toxicidade seletiva. Em consequência, muitas vezes o tratamento não é eficiente (SANGLARD, 2002).

Atualmente, quatro grupos de antifúngicos estão disponíveis para esse tipo de infecção; 1- Polienos (ex: anfotericina-B) que atuam na membrana citoplasmática, ligando ao ergosterol fúngico e criando poros na membrana celular; 2- Triazóis (ex: fluconazol e voriconazol), agem por inibição da enzima demetilase, participante da síntese do ergosterol; 3- Análogos de Nucleosídeos (ex: flucitosina), é um análogo fluorado da citosina que se converte em fluorouracil no organismo que por sua vez inibe a timidilato sintase, alterando a síntese de DNA e a síntese protéica do fungo; 4- Equinocandinas (ex: caspofungina e micafungina) que atuam na inibição da síntese de 1,3 beta-glucano o que bloqueia a biossíntese da parede celular fúngica (MOREIRA, 2005; KAUFMAN, 2014).

O tratamento antifúngico com a utilização dos azoles de forma generalizada, tem influenciado parcialmente nas mudanças para um aumento de espécies *Candida* não *C. albicans*, e podem também, propiciar o desenvolvimento de resistência (JORDAN et al., 2014). Um outro agravante é o desconhecimento de informações básicas sobre este tipo de infecção e a falta de protocolos de tratamento nos serviços de saúde. Por essa razão, é importante a identificação do agente etiológico e a descrição de dados laboratoriais sobre a sua suscetibilidade, para direcionamento da clínica, selecionando o antifúngico apropriado para terapia (SALCI et al., 2014).

Especificamente em *C. parapsilosis*, as mutações responsáveis pelo ganho de resistência têm sido especialmente atribuídas ao uso dos mais novos antifúngicos, as equinocandinas, por favorecem substituições de aminoácidos nos genes *FKS1* e *FKS2* (GUILHERMO, 2008) com motivos contra a indicação dessa droga para infecções por essa espécie.

Portanto candidemias por *C. parapsilosis* em neonatos, conta com duas opções mais prósperas disponíveis: fluconazol ou anfotericina B que tem sido o antifúngico sugerido para o tratamento de pacientes neonatos devido a sua ação fungicida, apesar de extremamente tóxica, é bem tolerada em neonatos (KAUFAMN, 2014).

JUSTIFICATIVA

Com o aumento de infecções fúngicas em pacientes neonatos, percebe-se a necessidade de ampliar conhecimentos sobre o perfil dessa infecção na neonatologia. Aparentemente, *Candida parapsilosis* é uma espécie emergente em várias partes do mundo e, esse aumento pode estar relacionado ao potencial de virulência englobando características celulares e moleculares que propiciam a infecção.

A hospitalização prolongada nos casos de neonatos nascidos com malformações como a onfalocele, acabam expondo esse paciente a vários fatores de risco e as infecções fúngicas vem sendo importante causa de desfechos desfavoráveis nesse contexto.

Entre outras espécies destaca-se principalmente as relacionadas à aderência e propriedades hidrofóbicas e, a importante capacidade de formar biofilmes. Muitos estudos epidemiológicos destacam a resistência aos antifúngicos, porém, pouco tem sido comprovado sobre o potencial de virulência desses micro-organismos e talvez essa seja uma das principais causas do envolvimento desta espécie em infecção hospitalar.

Neste sentido, para melhor compreender o processo de infecção fúngica em neonatos especificamente com malformações como onfalocele, que passa por intervenções cirúrgicas nos primeiros dias de vida, este estudo teve a finalidade de analisar o perfil de virulência de *Candida parapsilosis* isolada de neonato com essa malformação, avaliando a suscetibilidade aos antifúngicos comerciais, capacidade de adesão e formação de biofilme. Além disso, através do método *Random amplified polymorphic DNA* (RAPD), verificar a permanência de uma mesma cepa frente a várias tentativas terapêutica durante todo o período de internação.

OBJETIVOS

GERAL

Ampliar conhecimentos sobre a abordagem clínica e laboratorial da septicemia por *Candida parapsilosis* isoladas de um paciente neonato que sofreu intervenções cirúrgicas nos primeiros dias de vida devido a onfalocele.

ESPECÍFICOS

Analisar e descrever um caso clínico de septicemia por *Candida parapsilosis* em neonato nascido com onfalocele internado em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital Universitário de Maringá-Pr.

Isolar e identificar leveduras do gênero *Candida* que desenvolveram em culturas de sangue, urina e cateter venoso deste paciente

Verificar a similaridade genética das amostras de *C. parapsilosis* isoladas dos sítios no decorrer da infecção.

Verificar a susceptibilidade dos isolados clínicos de *C. parapsilosis* aos antifúngicos comerciais mais utilizados na prática clínica.

Avaliar a capacidade de adesão e formação de biofilme de *C. parapsilosis* isoladas no decorrer da infecção.

REFERÊNCIAS

ABDUR-RAHMAN, L.O.; ABDULRASHEED, N. A.; ADENIRAN, J. O. **Challenges and outcomes of management of anterior abdominal wall defects in a Nigerian tertiary hospital.** Paediatric Surgery Unit, Department of Surgery, University of Ilorin and University of Ilorin Teaching Hospital, Ilorin, Nigeria, vol. 8, Issue : 2, p.159-163, 2011.

ATALAY, M.A. et al. Investigation of possible virulence factors in *Candida* strains isolated from blood cultures. **Niger J Clin Pract.** Jan-Feb; 18(1):52-5, 2015.

BIZARRO, M.J. et al. Seventy five years of neonatal sepsis at Yale: 1928-2003. **Pediatrics**, 115:595-602, 2005.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Gerência de Vigilância e Monitoramento em Serviços de Saúde, Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde. **Critérios nacionais de infecções relacionadas à assistência à saúde: neonatologia.** Brasília; 2013.

CAMACHO, G. A., SPEARMEN, P.W., STOLL, B.J. Neonatal Infectious Diseases: evaluation of neonatal sepsis. **Pediatr Clin North Am.** Apr; Epub, 60(2):367-89, 2013.

CHANG, M.R. et al. *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop.** S. Paulo, 50(5): 265-268, 2008.

CHIESA, C. Diagnosis of neonatal sepsis: a clinical and laboratory challenge. **Clin Chem**; 50:279–87, 2004. <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2003.025171>

EIN, S.H.; LANGER, J.C. Delayed management of giant omphalocele using silver sulfadiazine cream: An 18-year experience. **J Pediatr Surg**;47:494-500, 2012.

ESMA, E. T.; TUĞBA, G.; FAHRI, O. Factors which affect mortality in neonatal sepsis. **Turk Pediatri Ars.** 50(3): 170–175, 2015.

FAWLEY, J.A. et al. Can omphalocele ratio predict postnatal outcomes? **J Pediatr Surg.** Oct 22, 2015.

GARCIA-EFFRON, G. et al. A Naturally Occurring Proline-to-Alanine Amino Acid Change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* Accounts for Reduced Echinocandin Susceptibility. **Antimicrob Agents Chemother.**; 52(7): 2305–2312, 2008.

GEREMIAS, A.L.; ALMEIDA, M.F.; FLORES, L.P.O. Avaliação das declarações de nascido vivo como fonte de informação sobre defeitos congênitos. **Rev Bras Epidemiol**, 12(1):60-68, 2009.

GUO-HAO, X. et al. Impact of invasive fungal infection on outcomes of severe sepsis: a multicenter matched cohort study in critically ill surgical patients. **Crit Care**. 12(1), 2008.

HENRICH, K. et al. Gastroschisis and omphalocele: treatments and long-term outcomes. **Pediatr Surg Int.**; 24(2):167-73, 2008.

HIDAKA, N. et al. Characteristics and perinatal course of prenatally diagnosed fetal abdominal wall maneged in a tertiary center in japan. **J. Obstret Gynaecol Res.**; 35(1): 40-7, 2009.

HOPE, E. C. et al. Guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: prevention and management of invasive infections in neonates and children caused by *Candida* spp. **Guideline European Society of Clinical Microbiology and infectious diseases (ESCMID)**, 2012.

ISLAM, S. Clinical care outcomes in abdominal wall defects. **Curr Opin Pediatr.**; 20:305-10, 2008.

JORDAN, I. et al. *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* invasive infections in the PICU: clinical features, prognosis and mortality. **Revista Espanola de Quimioterapia.**; 27(1):56–62, 2014.

KAUFMAN, D.A. Challenging issues in neonatal candidiasis. **Curr Med Res Opin**. 26(7):1769-78, 2010.

KAUFMAN A. D.Fungal Infections in Preterm Inf. **Medscape**, 2014, <http://emedicine.medscape.com/article/980487>

KLEINROUWELER, C.E. et al. Characteristics and outcome and the omphalocele circumference/abdominal circumference ratio in prenatally diagnosed fetal omphalocele. **Fetal Diagn Ther.**; 30(1):60-9, 2011.

KLIEGMAN, R.M. et al. **Treaty of pediatrics**, Elsevier; 2009.

KRUIT A. et al. Multilayerede Fkao Technique: A Method For Delayede Closure of Giant Omphalocele.**Ann Plast Surg.**; jul, 23, 2015.

KUCIK, J.E. et al. Racial/ethnic variations in the prevalence of selected major birth defects, metropolitan Atlanta, 1994–2005. **Public Health Rep**. 127:52–61, 2012.

KUMAR, H.R.; JESTER, A.L.; LADD, A.P. Impact of omphalocele size on associated conditions. **J Pediatric Surg.**; (12):2216-9, 2008.

- LAKASING, L. et al. Current outcome of antenatally diagnosed exomphalos: an 11 year review. **J Pediatr Surg.**; 41(8):1403-6, 2006.
- MANN, S.; BLINMAN, T.A.; WILSON, D.R. Prenatal and postnatal management of omphalocele. **Prenat Diagn.**; 28:626–632, 2008.
- MENEZES, E. A. et al. Molecular identificaion and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis* isolates in Ceará, Brazil. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v. 48, nº 6, dec., 2012.
- MOREIRA, M.E. Controversies about the management of invasive fungal infections in very low birth weight infants. **J Pediatr.**; 81(1 Suppl):S52-8, 2005.
- NAKAGAWA, M.; HARA, M.; SHIBAMOTO, Y. MRI findings in fetuses with an abdominal wall defect: gastroschisis, omphalocele, and cloacal exstrophy. **Jpn J Radiol.**;31:153–159, 2013.
- NASR, A.; LANGER, J.C. Influence of location of delivery on outcome in neonates with gastroschisis. **J Pediatr Surg.**; 47:2022–2025, 2012.
- OLIVEIRA, V.J.; MADEIRA, A.M.F. Interagindo com a equipe multiprofissional: as interfaces da assistência na gestação de alto risco. **Esc Anna Nery.**; 15(1): 103-109, 2011.
- OVALI, F. İçinde: Ovalı F. Yenidoğan enfeksiyonları. İstanbul: İstanbul medikal yayıncılık. **Bakteriyel enfeksiyonlar**; pp. 109–249, 2006.
- PATEL, G. et al. Neonatal survival of prenatally diagnosed exomphalos. **Pediatr Surg int.** 2009; 25 (5): 413-6, 2009.
- PERANTEAU, W.H. et al. Systemic hypertension in giant omphalocele: An underappreciated association. **J Pediatr Surg.**; pii: S0022-3468(15)00131-1, 2015.
- RENK, H. et al. Enterococcus faecium Mediastinitis Complicated by Disseminated *Candida parapsilosis* Infection after Congenital Heart Surgery in a 4-Week-Old Baby. **Case Rep Infect Dis.**;2015:543685, 2015.
- RYNN, L; CRAGAN, J, MD, Um Correa, MD,CDC. Update on overall prevalence of major birth. Georgia, 1978–2005. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**; 57:1–5, 2008.
- SALCI, T.P.; BATILANA, A.P.; PIETROBON, R. Caparroz-Assef SM.Problems related to antifungal prescription: a qualitative study of the views of intensivists. **Journal of evaluation in clinical practice**; 20(4):460-6, 2014.
- SANGLARD, D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. **Enferm Infecc Microbiol Clin.**; pp.462-470, 2002.
- SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLORI, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. Mycoses Special Issue: **Advances in the Management of Fungal Infections** . v. 58, Issue Supplement S2, pp. 2–13, 2015.

SHAWN, R. L. et al. Geographic Distribution and Antifungal Susceptibility of the Newly Described Species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in Comparison to the Closely Related Species *Candida parapsilosis*, **J. of Clinical Microbiology**, v. 46, n°8, p. 2659-2664, 2008.

SILVA-DIAS, A. et al. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. **Front Microbiol.**; 6:205, 2015.

SIMEONE, R.M. et al. Grand Rounds: Understanding the Causes of Major Birth Defects — Steps to Prevention. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, 64(39); 1104-7, 2015.

SPRINGETT, A. et al. Birth prevalence and survival of omphalos in England and Wales: 2005 to 2011. **Clinical and Molecular Teratology.**; 100 (9) 721-725, 2014.

TROFA, D.; GACSER, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. **Clin Microbiol Rev**, v. 21, n. 4, p. 606-25, 2008.

CAPÍTULO II

Artigo 1: “CASO FATAL DE SEPSE POR *Candida parapsilosis* strictu sensu EM RECÉM NATO COM ONFALOCELE”.

Revista: The Journal of Pediatrics: www.jpeds.com

**CASO FATAL DE SEPSE POR *Candida parapsilosis strictu sensu* EM RECÉM NATO
COM ONFALOCELE**

S. Santana¹, T. Salci², P. M. Andriato², P. Bonfim-Mendonça², Caparroz-Assef S.M.³, M. Negri², T. I. E. Svidzinski^{1,2}

¹Section of Medical Mycology, Graduate Program in Health Sciences, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brazil.

²Section of Medical Mycology, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brazil.

* Corresponding author: Terezinha Inez Estivalet Svidzinski

Division of Medical Mycology, Teaching and Research Laboratory in Clinical Analysis –
Department of Clinical Analysis of State University of Maringá – Paraná – Brazil

Av. Colombo, 5790

CEP: 87020-900

Maringá, PR., Brazil

Phone: +5544 3011-4809

Fax: +5544 3011-4860

E-mail: tiesvidzinski@uem.br

CASO FATAL DE SEPSE POR *Candida parapsilosis strictu sensu* EM RECÉM NATO COM ONFALOCELE

RESUMO

Neonato com onfalocele, sem outra anomalia adicional, após correção e fechamento de parede abdominal foi diagnosticado com sepse por *Candida parapsilosis* no primeiro mês de vida. Apesar de ter apresentado um bom prognóstico, foi um caso de difícil tratamento, devido a complicações e exposição do paciente a múltiplos fatores de risco para candidemia.

Palavras chave: *Candida parapsilosis*, Onfalocele, Neonato, Sepse.

INTRODUÇÃO

A onfalocele é uma má formação na parede abdominal, ao nível do anel umbilical, sem fechamento completo dos músculos abdominais, com herniação dos órgãos dessa cavidade, que ficam recobertos por uma membrana protetora constituída de âmnio e peritônio. Afeta 1 em 4.000 a 10.000 nascidos vivos e tem maior incidência de 1 em 3.000-4.000, se forem considerados os casos de aborto e natimorto^{1,2}.

A onfalocele geralmente está associada a outras malformações, no entanto, a sobrevivência de pacientes com essa má formação isolada, é maior (92%) quando comparada a casos com múltiplas anomalias (81%) ou anomalias cromossômicas (24%)³.

O tratamento da onfalocele consiste no retorno dos órgãos herniados e correção cirúrgica da parede abdominal de acordo com a avaliação do cirurgião que leva em conta o tamanho do defeito, anomalias associadas e condições clínicas da criança⁴. Além de intervenções cirúrgicas para correção da onfalocele, dificuldade de alimentação, insuficiência respiratória e período de hospitalização prolongada frequentemente são observados nestes casos⁵.

Altas taxas de morbidade e mortalidade são frequentemente associadas a infecções neonatais⁶. Além da imunodeficiência relativa, o paciente é exposto a procedimentos invasivos e ao uso prolongado de antibióticos de amplo espectro, o que aumenta ainda mais o risco de infecção fúngica⁷.

Candida parapsilosis tem se destacado como agente de sepse neonatal, o que tem sido atribuído à sua capacidade de adesão e de formar biofilme em cateter⁸, mas ainda não foi descrito em casos de onfalocele. Relatamos aqui o primeiro caso fatal de candidemia neonatal persistente por *C. parapsilosis* pós cirurgia de correção de onfalocele, mesmo com tratamento antifúngico.

RELATO DE CASO

Aos 27 dias de vida, neonato do sexo masculino foi admitido com quadro séptico pós correção de onfalocele, em uma unidade de terapia intensiva neonatal (UTIn) de um hospital universitário no sul do Brasil, referência para neonatologia. Documentação encaminhada atesta gestação em boas condições, nascimento de parto cesárea as 39 semanas, com peso de 2.800 g, apresentando onfalocele rota, evisceração de alças intestinais que foram reduzidas na origem, além de realizado o fechamento completo da parede abdominal poucas horas após seu nascimento. Nenhuma outra anormalidade foi identificada em exames anatômicos ou laboratoriais.

O histórico do paciente mostra que foi utilizado como profilaxia pós cirúrgicos o antibiótico ceftriaxona em dose única e esquema de antibioticoterapia com oxacilina (06 dias), amicacina (05 dias) e metronidazol (26 dias). No 5º dia de vida foi iniciado nutrição parenteral total (NPT). Os primeiros exames de hemocultura realizados quando o neonato tinha apenas 11 dias de vida, revelaram a presença de *Staphylococcus aureus*.

Um dia após sua admissão, no hospital em que esse estudo foi realizado, ou seja, aos 28 dias de vida, apresentou piora no estado geral, sendo necessário usar ventilação mecânica e infusão de drogas vasoativas. Devido ao isolamento de leveduras na urina, mesmo antes da identificação da espécie, foi iniciado tratamento antifúngico com anfotericina B (19 dias) como terapia empírica acompanhada de troca do antibiótico (Tazocim 12 dias). Os exames de culturas

de vigilância foram negativas para KPC, VRE e MRSA, e alguns dias depois, a confirmação de sepse fúngica por *C. parapsilosis*.

Uma relaparotomia foi necessária quando o paciente tinha 31 dias, nessa cirurgia foi identificado estenose e má rotação intestinal. Apesar de boa cicatrização em incisão cirúrgica, o paciente teve piora de seu estado que se estendeu por vários dias. Houve nova troca de antibióticos (meropenem 30 dias + linezolida 22 dias), porém, hemocultura aos 46 dias de vida acusou *Staphylococcus epidermidis* e *C. parapsilosis* sendo a levedura também foi identificada em ponta de cateter.

Na ocasião houve troca do antifúngico anfotericina B por fluconazol (11 dias) e posteriormente foi adicionado micafungina (14 dias). Diante da dificuldade no tratamento, novos exames de imagem, investigação oftalmológica e cardíaca foram realizadas. Nenhum achado foi encontrado, porém uma piora na distensão abdominal e desconforto respiratório o fizeram retornar ao centro cirúrgico para uma nova laparotomia e ileostomia devido a uma estenose de íleo.

O caso segue o curso, com vários procedimentos invasivos, trocas de antimicrobianos cujos principais fatos estão apresentados na (figura 1) assim como exames (leucócitos e PCR). Aos 91 dias de vida, novamente em uso de micafungina (05 dias), apresentou melhora de seu estado geral e aos 96 dias de vida iniciou-se uma dieta, via oral com boa aceitação, em seguida teve alta da UTI para a enfermaria pediátrica. Apesar da aparente melhora, tanto uroculturas quanto as hemoculturas continuaram mostrando persistência de *C. parapsilosis*.

Aos 101 dias apresenta piora do estado geral e sem melhora do quadro infeccioso, em uso de amicacina, anfotericina B e polimixina B, retorna para UTI em estado grave devido a sepse. Após dois dias (103 dias de vida) evolui a óbito por embolia séptica.

ESTUDO MICROBIOLÓGICO

Foram isoladas um total de 16 leveduras identificadas como *C. parapsilosis* (14 de sangue, 01 ponta de cateter e 01 de urina). Os isolados foram armazenados na micoteca do Laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá. Todas as amostras foram identificadas pelo método clássico⁹. A confirmação das espécies foi realizada pela metodologia *matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectroscopy* (MALDI TOF-MS). Para este ensaio as leveduras foram preparadas de acordo com Spanu et al¹⁰ e a interpretação foi realizada de acordo com Pascon et al¹¹, utilizando *Microflex LT mass spectrometer* (Bruker Daltonics) e *FlexControl software* (version 3.0, Bruker Daltonics). Todos os isolados foram confirmados como *C. parapsilosis strictu sensu*.

Foi realizado o teste de sensibilidade aos antifúngicos fluconazol, voriconazol, anfotericina B e micafungina de acordo com o documento do M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Todos os isolados clínicos de *C. parapsilosis* foram sensíveis aos antifúngicos fluconazol, voriconazol, anfotericina B. Sensibilidade dose dependente e resistência foi observada em todos os isoados clínicos para o antifúngico micafungina.

Similaridade genética entre os 16 isolados clínicos de *C. parapsilosis*, foi determinada segundo a técnica *Random amplified polymorphic DNA* (RAPD), com dois iniciadores diferentes: P4 (5'-AAGAGCCCGT-3') e OPA-18 (5'-AGCTGACCGT-3'). Para este ensaio as amostras foram preparadas de acordo com Bonfim-Mendonça et al¹² e, a interpretação dos géis foi realizada de acordo com o número de bandas e seus respectivos pesos moleculares. A análise de RAPD mostrou o mesmo perfil de bandas entre as amostras de *C. parapsilosis*, independentemente do sítio de isolamento (figura 2) indicando tratar-se de mesma levedura isolada em todas as culturas. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Maringá sob parecer de aprovação nº 615.643.

DISCUSSÃO

Descrevemos um caso de um paciente com onfalocele, sem nenhuma outra anomalia, com condições clínicas iniciais aparentemente favoráveis, com complicações devido a um quadro de sepse por *C. parapsilosis* durante toda sua evolução pós-operatória. Destaca-se que, apesar da onfalocele ser isolada, o paciente ficou internado por um período prolongado, 103 dias, passando por dois hospitais diferentes e óbito atribuído a complicações por sepse fúngica, mesmo sendo considerada com bom prognóstico por ser uma onfalocele isolada³.

Sepse neonatal é uma importante causa de morbidade e mortalidade especialmente em bebês prematuros e com baixo peso ao nascer⁶. Neste relato, o neonato teve um parto programado, termo, nasceu com 2.800g o que indicaria aparentemente, condições favoráveis a um desenvolvimento adequado, apesar da onfalocele. Entretanto, desde o nascimento, sofreu várias intervenções cirúrgicas e foi exposto a múltiplos fatores de risco: uso prévio de antimicrobianos, de cateter venoso central (CVC) e nutrição parenteral total (NPT); ventilação mecânica por mais de sete dias; sondas, bloqueador de H2 e cirurgia do trato gastro intestinal (TGI).

Cirurgias neste sítio representam um fator de risco adicional ao qual o paciente foi exposto pois favorecem o risco de infecções por micro-organismos oportunistas, principalmente aqueles que fazem parte da microbiota normal como bactérias anaeróbias e fungos e podem facilitar a translocação de micro-organismos para os capilares mesentéricos, instituindo uma infecção hematogênia¹³.

Para pacientes submetidos a cirurgia do TGI, o *guideline European Society of Clinical Microbiology and infectious diseases (ESCMID)*, recomenda a profilaxia com fluconazol. Os principais patógenos envolvidos em infecções após cirurgias do TGI são os componentes da microbiota humana normal, portanto, condutas de tratamento profilático com antimicrobianos são recomendados a fim de diminuir a carga microbiana no sítio cirúrgico¹⁴.

Apesar do paciente ter sido tratado profilaticamente com antibacteriano ceftriaxona, as primeiras culturas revelaram *S. aureus*. Uma vez confirmada a infecção bacteriana, foram introduzidos metronidazol e cefepime, ambos com indicação para casos de infecções abdominais e de pele incluindo tecido subcutâneo¹⁵. Apesar da boa resposta frente a esse tipo de infecção por *S. aureus*, seu uso prolongado pode favorecer a infecção fúngica¹⁶⁻¹⁷.

Aos 46 dias de vida, o CVC foi trocado, devido à suspeita de estar colonizado por *C. parapsilosis*. Segundo Pappas et al. (2009) é recomendado a remoção do cateter na candidemia documentada, essa colonização de fato foi confirmada por cultura. Entretanto, mesmo com a remoção do CVC as hemoculturas continuaram positivas para *C. parapsilosis*, indicando a persistência da infecção e sugerindo uma resistência clínica aos tratamentos antifúngicos adotados.

Avanços nas técnicas cirúrgicas neonatais e cuidados perioperatórios têm contribuído significativamente nos resultados de correção de onfalocele. Na ausência de outras malformações associadas, ou anomalias cromossômicas, as taxas de mortalidade são baixas, porém o curso clínico deste tipo de paciente ainda é de difícil previsão. É importante salientar que este neonato foi exposto a vários fatores de risco para infecção fúngica; administração, em longo prazo, de antibióticos de amplo espectro, CVC, NPT, ventilação mecânica por mais de 7 dias, cirurgias em TGI, sondagens vesicais entre outros.

Uma breve análise sobre a antifungoterapia adotada neste paciente, mostra que Anfotericina B desoxicolato (AMBd) foi introduzido imediatamente após o crescimento de *C. parapsilosis* na urina e, foi utilizada por 19 dias. AMBd tem sido o antifúngico sugerido para o tratamento de pacientes neonatos devido à sua ação fungicida e, maior tolerância aos efeitos adversos que os adultos. A dose prescrita (1mg/kg/dia) é a habitual recomendada¹⁸. Entretanto, apesar da suscetibilidade dos isolados clínicos *in vitro*, clinicamente a resposta não foi

satisfatória, de fato tem sido relatado falhas terapêuticas com esse antifúngico¹⁹. Importante destacar que existe um número limitado de antifúngicos disponíveis para combater infecções por leveduras, além disso, esses poucos são vulneráveis a fatores que justificariam falhas²⁰.

Fluconazol foi introduzido 47 dias após o início da candidemia, lamentavelmente esse tempo foi tardio, poderia ter sido introduzido no início da infecção, pois a farmacocinética deste antifúngico garante *clearance* elevado em pacientes pediátricos²¹ justificando a adoção de doses mais altas para o tratamento da candidemia nesses pacientes²². Além disso, a dose de fluconazol inicial (14 mg/kg/dia) e manutenção com 7mg/kg/dia, também foram menores que a proposta para garantir nível terapêutico rapidamente neste tipo de paciente, a dose de ataque recomendada é de 25 mg/kg seguido de 12 mg/kg/dia²³.

Micafungina droga antifúngica mais recente disponível no serviço foi introduzida tardiamente e, já com confirmação da persistência de *C. parapsilosis* (figura1) sem resultado positivo. Importante destacar que *C. parapsilosis* apresenta polimorfismo no gene *Fks1*, o que torna essa espécie naturalmente menos suscetível às equinocandinas, especialmente à micafungina²⁴. Essa tendência foi confirmada, em laboratório pelo alto valor de CIM *in vitro* à micafungina, possivelmente justificando a ineficiência da adição desta droga na resolução da infecção.

Segundo Salci et al. (2014), a abordagem terapêutica das infecções de origem fúngica ainda é um problema a ser resolvido pois observa-se desconhecimento de informações básicas e falta de protocolos padronizados. Esses fatores devem ser adicionados entre os preditores para o desfecho negativo da candidemia, pois mesmo em casos de baixa complexidade, contando com suporte laboratorial capaz de indicar a direção para uma abordagem correta, houve a evolução para o óbito, casos como esse, aumentam as taxas de mortalidade observadas na candidemia.

Elevação da PCR tem sido um marcador útil para sepse em muitos estudos e tem sido utilizado na clínica para compor o diagnóstico de sepse neonatal já que o nível sérico de PCR aumenta rapidamente no início de uma sepse²⁶. O paciente apresentou um aumento de PCR (Proteína C-reativa) 13,8mg/L no início do quadro infeccioso, coincidindo com o período em que teve o primeiro diagnóstico de leveduras na urina, com pico de 28,5mg/L aos 59 dias de vida assim como uma diminuição de neutrófilo neste mesmo período (figura 1), de acordo ANVISA, (2010) os valores de PCR normal, seria < 1mg/dl.

Nos últimos anos tem sido identificado aumento nos casos de candidemia e uma tendência para o aumento de *C. parapsilosis* em casos de infecção neonatal²⁷. Portanto é de extrema importância chamar a atenção para a possibilidade de candidemia em neonatos com onfalocele. Cirurgias no TGI é fator predisponente a doenças invasivas, especialmente se associados a outros fatores de risco como extremos de idade. Assim o manejo clínico de pacientes cirúrgicos deve ser repensado e conduzido com cautela, pois a infecção fúngica por *C. parapsilosis*, muitas vezes não é valorizada por ser originalmente parte da microbiota da pele humana.

Avaliou-se a similaridade genética de todas as amostras de *C. parapsilosis* estudadas (figura 2; A e B) e os resultados descartam a possibilidade de reinfecção, considerando a origem comum sugerida por RAPD. Métodos moleculares como o RAPD são importantes quando se pretende avaliar a origem ou similaridade da levedura isolada de pacientes hospitalizados¹². A amplificação do fragmento do gene foi realizada utilizando o DNA genômico dos isolados (figura 2, linhas 1 a 17). Observamos por meio deste método que *C. parapsilosis* isolada do sangue, urina e ponta de cateter tinham o mesmo perfil de bandas, indicando além de origem comum, que os diversos isolamentos dessa levedura corresponderiam ao mesmo processo infeccioso e não à reinfecção.

Finalmente, ressaltamos a relevância dos hospitais estabelecerem protocolos atualizados para uma abordagem terapêutica da candidemia. A falta destes protocolos é a principal responsável pela supervalorização das infecções bacterianas e subestima da infecção fúngica. Além disso, este caso atesta que achados laboratoriais se bem interpretados, fornecem informações importantes que contribuem para o adequado manejo de pacientes críticos que estão expostos a múltiplos fatores de risco.

REFERÊNCIAS

01. E.R. Christison-Lagay, C. Kelleher, J.C. Langer Neonatal abdominal wall defects Semin Fetal Neonatal Med, 16 (2011), p. 164–172
02. K.B. Kelly, T.A. Ponsky Pediatric abdominal wall defects Surg Clin North Am, 93 (2013), p. 1255–1267.
03. Springett A, Draper ES, Rankin J, Rounding C, Tucker D, Storianova S, et al. Birth prevalence and survival of exomphalos in england and wales: 2005 to 2011. Clinical and Molecular Teratology 2014; 100(9):721-725.
04. William H. Peranteau¹, Sasha J. Tharakan¹, Emily Partridge, Lisa Herkert, Natalie E. Rintoul, Alan W. Flake, N. Scott Adzick, Holly L. Hedrick Systemic hypertension in giant omphalocele: An underappreciated association Journal of Pediatric Surgery v. 50, Issue 9, September 2015, Pages 1477–1480.
05. Fawley JA, Peterson EL, Christensen MA, Rein L, Wagner AJ. Can omphalocele ratio predict postnatal outcomes? Journal of Pediatr Surg 2015; 22.
06. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BR), Gerência de Vigilância e Monitoramento em Serviços de Saúde, Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde. Critérios nacionais de infecções relacionadas à assistência à saúde: neonatologia. Brasília; 2013.
07. Guo-Hao Xie, Xiang-Ming Fang, Qiang Fang, Xin-Min Wu, Yu-Hong Jin, Jun-Lu Wang, et al, Impact of invasive fungal infection on outcomes of severe sepsis: a multicenter matched cohort study in critically ill surgical patients. Crit Care. 2008; 12(1)
08. Atalay MA, Koc AN, Demir G, Sav H. Investigation of possible virulence factors in *Candida* strains isolated from blood cultures. Niger J Clin Pract 2015 Jan-Feb; 18(1):52-5.

09. Larone DH, Press ASM, Washington DC. Medically Important Fungi: A Guide to Identification. American Society for Microbiology, Fifth Edition 2011; 485.
10. Spanu T, Posteraro B, Fiori B, D'Inzeo T, Campoli S, et al., Direct maldiit of mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification. Journal of Clinical Microbiolgy 2012; 50(1):176-179.
11. Pascon RC, Bergamo RF, Spinelli RX, de Souza ED, Assis DM, Luliano L, Vallim MA. Amylolytic microorganism from sao paulo zoo composting: isolation, identification, and amylase production. Enzyme Research 2011; 679:624
12. Bonfim PS, Fiorini A, Shinobu HMCS, Baeza LC, Fernandes MA, Sviszinski TIE. Molecular typing of *Candida albicans* isolates from hospitalized patients. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 2013; 55(6):385-91.
13. Colombo AL, Guimarães T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida spp.* Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine 2003; 599-607.
14. Hope E, Castagnola AH, Groll E, Roilides M, Akova MC, Arendrup S, et al. Ullmann Guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: prevention and management of invasive infections in neonates and children caused by *Candida spp.* Guideline European Society of Clinical Microbiology and infectious diseases (ESCMID) 2012
15. Drugdex-Micromedex 2.0. Ann Arbor (MI): Truven Health Analytics Inc. Infection due to *Staphylococcus aureus*; Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection 2015.
16. Kuppala VS, Meinzen-Derr J, Morrow AL, et al. Prolonged initial empirical antibiotic treatment is associated with adverse outcomes in premature infants. Journal of Pediatric 2011; 720–5.
17. Clark RH, Bloom BT, Spitzer AR, et al. Empiric use of ampicillin and cefotaxime, compared with ampicillin and gentamicin, for neonates at risk for sepsis is associated with an increased risk of neonatal death. Pediatrics 2006; 67–74.
18. Pappas PGCA, Kauffman D, Andes DK, Benjamin Jr TF, Calandra JE, Edwards Jr SG et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. Clinical Infectious Diseases 2009; 503–535.
19. Park BJ, Arthington-Skaggs BA, Hajjeh RA, Iqbal N, Ciblak MA, Yang WL, et al. Evaluation of Amphotericin B Interpretive Breakpoints for *Candida* Bloodstream Isolates by Correlation with Therapeutic Outcome. Antimicrobial Agents And Chemotherapy 2006; 1287–1292

20. Antachopoulos C., Walsh T. J. New agents for invasive mycoses in children. *Current Opinion in Pediatrics* 2005; 17(1):78–87.
21. Nucci M, Perfect Jr When primary antifungal therapy fails. *Clin Infect Dis*; 2008; (14): 26-33.
22. Piper L, Smith PB, Hornik CP, Cheifetz IM, Barrett JS, Morthy G, et al. Fluconazole loading dose pharmacokinetics and safety in infants. *Pediatric Infectious Diseases Journal* 2011; 375-378.
23. Turner K, Manzoni P, Benjamin DK, Cohen-Wolkowicz M, Smith PB, Laughon MM. Fluconazole pharmacokinetics and safety in premature infants. *Current medicinal chemistry* 2012; 4617-4620.
24. Garcia-Effron G, Katiyar SK, Park S, Edlind TD, Perlin DS. A Naturally Occurring Proline-to-Alanine Amino Acid Change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* Accounts for Reduced Echinocandin Susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(7):2305–2312.
25. Salci TP, Batilana AP, Pietrobon R, Caparroz-Assef SM. Problems related to antifungal prescription: a qualitative study of the views of intensivists. *Journal of evaluation in clinical practice* 2014; 20(4):460-6.
26. Mishra UK, Jacobs SE, Doyle LW, Garland SM. Newer approaches to the diagnosis of early onset neonatal sepsis. *Archives of Diseases in Childhood - Fetal Neonatal Edition* 2006; 91(3):208–212.
27. Martí-Carrizosa, Sánchez-Reus F, March F, Coll P. Fungemia in a Spanish hospital: the role of *Candida parapsilosis* over a 15 year period. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases Epub* 2014; 46(6):454-61.

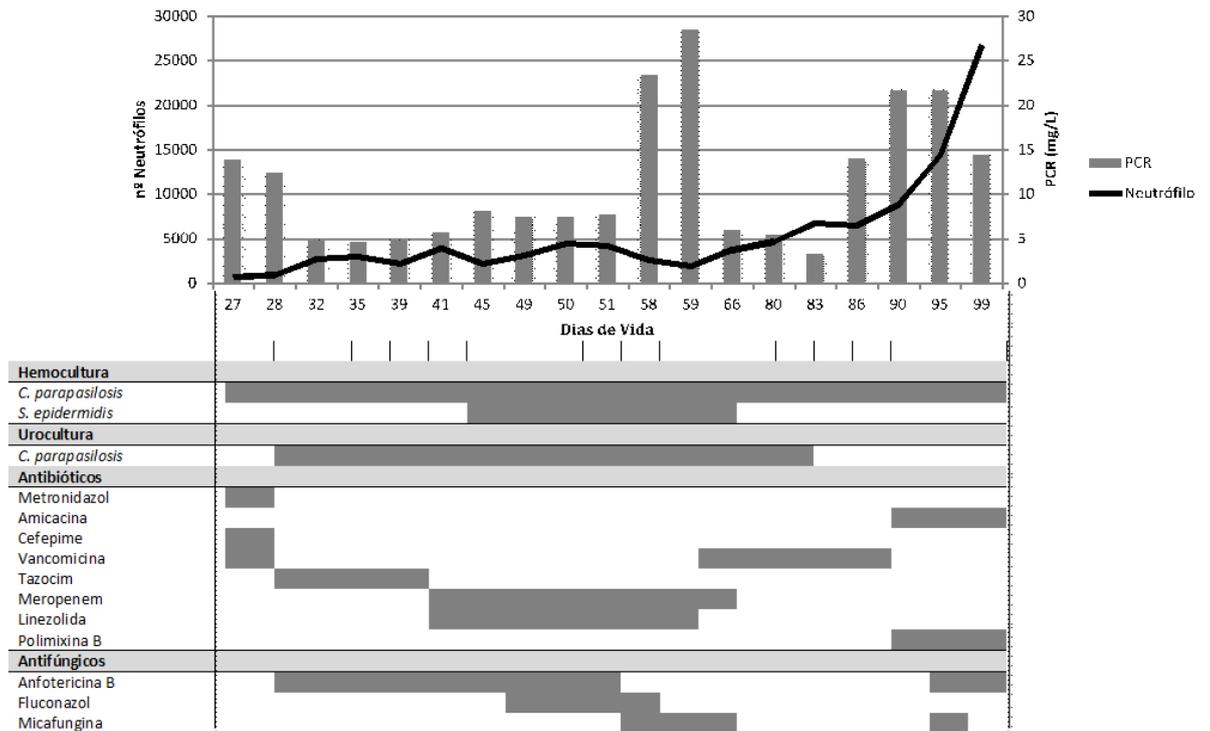


Figura 1. Representação gráfica dos principais eventos ocorridos durante a evolução do caso ao longo do tempo. A partir do 27º dia de vida todas as hemoculturas foram positivas para a levedura identificada como *Candida parapsilosis strictu sensu*. Anterior a esse período o paciente havia recebido os seguintes antimicrobianos; Ceftriaxona (01 dia); Metronidazol (26 dias); Oxacilina (06 dias); Amicacina (05 dias); Cefepime (21 dias) e Vancomicina (21 dias).

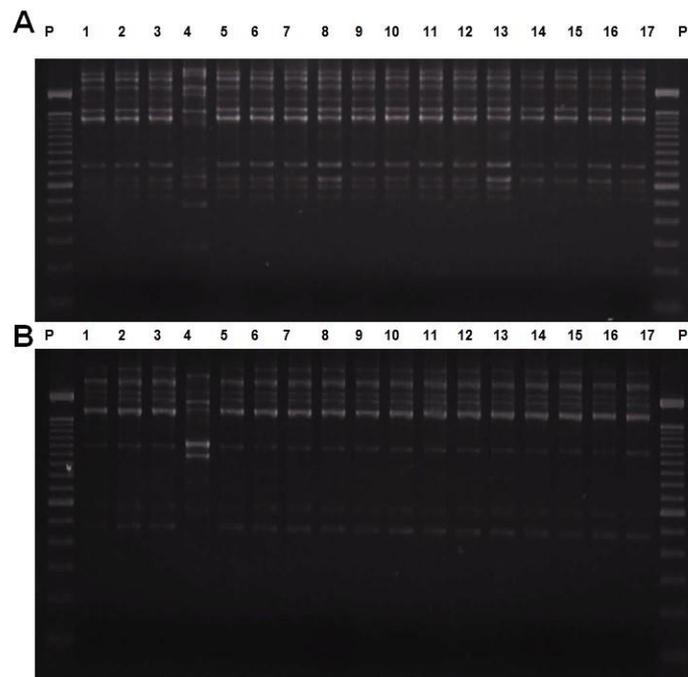


Figura 2. Similaridade genética entre isolados clínicos de *Candida parapsilosis* isolada em diferentes culturas do paciente em estudo. Metodologia RAPD com os iniciadores P4 (A) e OPA-18 (B). Padrão de Peso Molecular 100pb (P) (Invitrogen). Linhas 1,2,6-17: *C. parapsilosis* isoladas repetidas vezes de hemoculturas; linha 3 *C. parapsilosis* isoladas de urina, linha 5: *C. parapsilosis* isolada de cateter todas essas do mesmo paciente.

CAPÍTULO II

Artigo 2: “PERFIL DE VIRULÊNCIA DE *Candida parapsilosis strictu sensu* ISOLADOS DE PACIENTE COM SEPSE NEONATAL PÓS CORREÇÃO DE ONFALOCELE”

Revista: The Journal of Hospital Infection

**PERFIL DE VIRULÊNCIA DE *Candida parapsilosis strictu sensu* ISOLADOS DE
PACIENTE COM SEPSE NEONATAL PÓS CORREÇÃO DE ONFALOCELE**

S. Santana¹, T. Salci², P. Bonfim-Mendonça², M. Negri², T. I. E. Svidzinski^{1,2}

¹Section of Medical Mycology, Graduate Program in Health Sciences, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brazil.

²Section of Medical Mycology, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brazil.

*** Corresponding author: Terezinha Inez EstivaletSvidzinski**

**Division of Medical Mycology, Teaching and Research Laboratory in Clinical Analysis – Department of
Clinical Analysis of State University of Maringá – Paraná – Brazil**

Av. Colombo, 5790

CEP: 87020-900

Maringá, PR., Brazil

Phone: +5544 3011-4809

Fax: +5544 3011-4860

E-mail: tiesvidzinski@uem.br

PERFIL DE VIRULÊNCIA DE *Candida parapsilosis strictu sensu* ISOLADOS DE PACIENTE COM SEPSE NEONATAL PÓS CORREÇÃO DE ONFALOCELE

RESUMO

Um dos principais problemas associados a onfalocele é o fato de que o neonato sofre procedimentos cirúrgicos para correção dessa anomalia logo nos primeiros dias de vida, o que acaba expondo-o a vários fatores de riscos para infecção, como por *Candida parapsilosis*, que comumente coloniza a pele através da transmissão horizontal devido a frequente manipulação e procedimentos invasivos. **Objetivo:** Este estudo teve a finalidade de avaliar o perfil de virulência de *C. parapsilosis* isolada de diferentes amostras clínicas de um mesmo neonato com onfalocele. **Método:** As leveduras foram isoladas de sangue, urina e cateter venoso central e identificadas por método clássico e MALDI TOF-MS. Foram avaliados fatores como suscetibilidade aos antifúngicos, capacidade de adesão, formação de biofilme, influência dos antifúngicos ao biofilme e a similaridade genética entre os isolados clínicos durante o período de hospitalização frente a várias tentativas terapêutica. **Resultados:** Todos os isolados de *C. parapsilosis* apresentaram-se sensíveis para voriconazol, fluconazol e anfotericina B e intermediária a resistente para micafungina. Os isolados apresentaram alta capacidade de adesão em silicone. O antifúngico fluconazol mostrou-se mais eficiente para a redução do biofilme. A análise da similaridade genética mostrou o mesmo perfil de bandas entre as amostras de *C. parapsilosis*. **Conclusão:** *C. parapsilosis* foi capaz de causar septicemia no neonato mesmo sob administração de antifungoterapia. Os isolados mostraram alta capacidade de adesão, tolerância à micafungina e independente do período coletado e do sítio de isolamento tratou-se de mesma levedura, salientando a importância de infecção hematogênica por *C. parapsilosis* em neonatos expostos a múltiplos fatores de risco.

Palavras-chave: *Candida parapsilosis*, Onfalocele, Neonato, Sepsis.

INTRODUÇÃO

Algumas doenças em neonatos aumentam o risco de sepse fúngica, entres elas a onfalocele destaca-se por ser uma doença de trato gastrointestinal grave, onde a criança sofre intervenção cirúrgica nos primeiros dias de vida e é exposta a vários outros fatores de risco por conta dessa malformação^{1,2}. O neonato com esse tipo de malformação geralmente tem um período de internação prolongada e cirurgias nesse sítio acabam aumentando a possibilidade de infecção por micro-organismos potencialmente patogênicos³.

Entre os casos de sepse por fungos em pacientes recém-nascidos, *C. parapsilosis* é a principal espécie isolada⁴. Em parte, isso se explica pela sua considerável capacidade de formar biofilme em cateteres e, portanto, alta afinidade com dispositivos intravasculares. Frequentemente é isolada das mãos de profissionais de saúde e tem sido responsável por causar surtos de infecção particularmente em recém-nascidos⁵. Outro agravante, é que essa espécie é capaz de proliferar na presença de elevadas concentrações de glicose e lipídios, o que está presente na maior parte das dietas de nutrição parenteral, comumente administradas em pacientes críticos neonatais⁴.

Estudos têm abordado a ocorrência de complicações em pacientes neonatais com esse tipo de malformação que apesar de ter um bom prognóstico pós correção, tem apresentado sepses como uma das complicações frequentes nas últimas décadas¹. Até onde se tem conhecimento, esse é o primeiro artigo que avalia o perfil de virulência de *C. parapsilosis* responsável por septicemia em neonato com onfalocele, observando fatores como suscetibilidade aos antifúngicos, capacidade de adesão, formação de biofilme e verificar se houve polimorfismo nesses isolados durante o período de hospitalização frente a várias tentativas terapêutica.

MÉTODOS

Característica do paciente

Neonato do sexo masculino, de parto cesárea as 39 semanas, com peso de 2.800 kg, com onfalocele rota (evisceração de alças intestinais reduzidas na origem) e sem nenhuma outra anormalidade, internado em Unidade de Terapia Intensiva neonatal (UTIn) de um Hospital Universitário do sul do Brasil. Poucas horas após seu nascimento foi realizado um procedimento cirúrgico para o fechamento da parede abdominal. No primeiro mês de vida iniciou-se nutrição

parenteral total (NPT), ventilação mecânica e infusão de drogas vasoativas. Aos 28 dias foi observado leveduras na urina e aos 32 dias foi diagnosticado com sepse por *Candida parapsilosis* presente na urina, sangue e ponta de cateter venoso central (CVC). E aos 103 dias o paciente foi a óbito atribuído a septicemia por *C. parapsilosis*.

Isolamento e identificação de *C. parapsilosis*

Para o isolamento da levedura em hemocultura, um volume de sangue foi inoculado em garrafinha myco F Lytic e incubado no sistema automatizado BACTEC (Becton-Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD). A urina foi cultivada usando-se uma alça calibrada (10 uL) em placas de ágar com meio CLED (Difco) e incubou-se a 37 °C durante 48 h. Para o isolamento de leveduras de ponta de cateter, este foi rolado sobre placas de ágar sangue (Difco) e incubado a 35° C durante 72 h⁶. Depois do crescimento de leveduras nas amostras biológicas, a identificação foi realizada pelo método clássico morfológico e bioquímico, de acordo com Larone. *et al*, (2011).

A confirmação das espécies foi realizada por *matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI TOF-MS). Para este ensaio as leveduras foram preparadas de acordo com Spanu *et al* 2012, utilizando *Microflex LT mass spectrometer* (BrukerDaltonics) e *FlexControl software* (version 3.0, BrukerDaltonics). As leveduras foram armazenadas na Micoteca do Laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá a -80°C. Todos os isolados foram reativados em *Sabouraud dextrose broth* (SDB; Difco, Sparks, MD, EUA), repicados para *Sabouraud dextrose ágar* (SDA; Difco, Sparks, MD, EUA) e mantidos a 37°C por 24 horas antes do início de cada ensaio.

Teste de suscetibilidade aos antifúngicos

Todos os isolados foram testados contra anfotericina B (Bristol-Myers Squibb, Bedford, OH, EUA), voriconazol (Pfizer Ireland Pharmaceuticas Dun Laoghaire, Co Dublin, Irlanda), fluconazol (Pfizer, Ireland Pharmaceuticas Dun Laoghaire, Co Dublin, Irlanda) e micafungina (Astellas, Takaokacity, Toyama, Japão), conforme o teste de microdiluição em caldo proposto pelo protocolo M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e interpretado de acordo com o suplemento M27-A3. S, suscetível; I, intermediário; SDD, sensível dose dependente; R, resistente. Micafungina: $\leq 2 \mu\text{g/ml}$, S; $4 \mu\text{g/ml}$, I; $\geq 8 \mu\text{g/ml}$, R (17), voriconazol: $\leq 0.125 \mu\text{g/ml}$, S; $0.25-0.5 \mu\text{g/ml}$, I; $\geq 1 \mu\text{g/ml}$, R (16), fluconazol: $\leq 2 \mu\text{g/ml}$, S; $4 \mu\text{g/ml}$, SDD; $\geq 8 \mu\text{g/ml}$, R (15), anfotericina: $\geq 2 \mu\text{g/ml}$, R (14).

Capacidade de adesão e formação de biofilme em silicone

As células de levedura foram cultivadas a 37 °C, 120 rpm durante 18 h em SDB; após esse período foram centrifugadas e lavadas em solução salina tampão de fosfato (PBS). O material foi suspenso em RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) a uma concentração final de $1,0 \times 10^7$ células/mL. Em cada poço de uma placa de 24 poços (TPP, Trasadingen, Suíça) contendo silicone (Neves & Neves, Lisboa, Portugal) de $1 \times 1 \text{ cm}^2$ previamente esterilizados, foi adicionado 1 mL dessa solução. Após duas e 24 horas de incubação (130 rpm, a 37 °C) verificou-se a adesão e a formação de biofilme, respectivamente. Os poços foram lavados duas vezes com PBS para remover leveduras planctônicas. As células remanescentes foram quantificadas utilizando-se o método de coloração com cristal violeta 1% (CV)⁹. Em seguida a coloração foi removida com água destilada e deixado secar ao ar livre. O corante foi resolubilizado, adicionando 1000 µL de ácido acético 33% (v/v), 200 µL de cada poço foi transferido para uma placa de 96 poços e a leitura foi realizada a 570 nm em leitora de Elisa. O procedimento foi realizado em triplicata e repetido em três ensaios independentes.

Efeito de agentes antifúngicos sobre biofilme de *Candida parapsilosis*

Para avaliar o efeito dos antifúngicos foram selecionados aleatoriamente 4 isolados (3, 8, 10 e 16). Após a formação de biofilme desses isolados sobre o silicone em placas de 24 poços durante 24 h (conforme descrito anteriormente), o meio de cultura foi aspirado e lavado cuidadosamente três vezes com PBS, para remover as células não aderentes. Subsequente, os antifúngicos anfotericina B e fluconazol foram adicionados nas concentrações de 1,0 µg/ml e 0,5 µg/ml, respectivamente. As placas foram incubadas durante 48 h a 37 °C. O biofilme foi quantificado utilizando-se o método de coloração com cristal violeta 1% (CV)⁹. A redução de crescimento foi comparada ao controle (biofilme sem tratamento), que corresponde a 100% de crescimento.

Análise de RAPD

Para avaliar a similaridade genética entre as 16 isolados de *C. parapsilosis*, realizou-se a metodologia *Random amplified polymorphic DNA* (RAPD), com dois iniciadores diferentes: P4 (5'-AAGAGCCCGT-3') e OPA-18 (5'-AGCTGACCGT-3'). Para este ensaio as amostras foram preparadas de acordo com Bonfim-Mendonça *et al.* 2013 e os perfis de RAPD foram analisados pelo software Bionumerics versão 4.6 (Applied Maths). A similaridade foi verificada pelo coeficiente de similaridade S_{AB} e a partir da matriz de similaridade as unidades foram

agrupadas pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*). A interpretação dos valores de S_{AB} foi realizada de acordo com Chang *et al*, 2003.

RESULTADOS

Em um período de 103 dias de vida do recém nato, foi isolado um total de 16 leveduras identificados como *C. parapsilosis*, sendo 14 de sangue, 01 de ponta de cateter e 01 de urina (Tabela 1). Das 16 leveduras, identificados como *C. parapsilosis strictu sensu*, todas foram confirmadas por dois métodos: o clássico e por MALD TOF-MS.

Foi possível observar que este paciente foi exposto a vários fatores de risco, procedimentos invasivos como; CVC; SOG; NPT; ventilação mecânica; cirurgia do TGI, uso de bloqueadores H2 e administrado antibioticoterapia por todo período em que foi isolado *C. parapsilosis* (Tabela 1 e 2). Em relação a antifungoterapia, iniciou-se com anfotericina B, seguida de fluconazol e micafungina, ficando um período sem tratamento de aproximadamente 10 dias, sendo isolado *C. parapsilosis* durante todo o tratamento (Tabela 2).

Em relação ao perfil de suscetibilidade *in vitro* de *C. parapsilosis* aos antifúngicos, os valores das CIM para micafungina foram os mais elevados, variando de intermediário a resistente (4 a 8 µg/ml). Para os demais antifúngicos os isolados foram sensíveis, apresentando para o voriconazol uma CIM de 0.03 a 0.125 µg/ml; para fluconazol 0.25 a 0.50; e para anfotericina B, 0.25 a 1,0 (Tabela 3).

Nos ensaios de adesão e formação de biofilme de *C. parapsilosis* sobre silicone (Figura 1), foi possível observar que todos os isolados são capazes de aderir e formar biofilme. Entretanto, *C. parapsilosis* tiveram a capacidade de aderir significativamente mais do que a capacidade de formar biofilme em silicone (Figura 1).

Após o tratamento do biofilme com fluconazol e anfotericina B houve redução do biofilme, variando de 86,21% a 32,96% para fluconazol e de 69,4% a 1,58% para anfotericina B. De forma geral, o antifúngico fluconazol apresentou ser mais eficiente na redução do biofilme de *C. parapsilosis* em relação a anfotericina B, exceto para o isolado 10 (Figura 2).

A similaridade genética foi avaliada pela técnica de RAPD (Amplificação Randômica de DNA Polimórfico) (figura 3), com duas sequências randômicas diferentes, especificadas

pelos primers P4 o OPA18. A figura 3-A mostra que a análise com o primer P4 evidenciou a formação de 3 perfis de similaridade com valor de S_{AB} 98.68 ± 2.40 . O grupamento I, mostrou que 87.5% (14/16) das amostras apresentaram identidade clonal (100% de similaridade). A análise com o primer OPA18, mostrou a formação de apenas 1 grupamento entre todas as amostras estudadas, com valor de S_{AB} 100.00 ± 0.0 , evidenciando identidade clonal entre todas as amostras, figura 3-B.

DISCUSSÃO

Entre os vários fatores de risco para infecção neonatal já explorados em estudos anteriores, as cirurgias em TGI, como os casos de onfalocele, no qual a criança não recebe dieta via oral por alguns dias e faz uso de antibióticos por mais de 7 dias, aumentam os riscos para uma infecção fúngica ^{1,2,3}. No presente estudo isolou-se *C. parapsilosis* de um neonato nascido com onfalocele, hospitalizado em UTIn, que teve sepse por esse agente durante toda sua evolução pós correção cirúrgica até seu óbito, aos 103 dias de vida.

É possível observar que o paciente foi exposto à vários fatores de risco durante sua hospitalização. Uma variedade de fatores de risco tem sido atribuída para o aumento de *C. parapsilosis* em infecções fúngicas, incluindo capacidade de crescer em dietas hiperproteicas, capacidade de colonizar dispositivos intravasculares e materiais médicos hospitalares, uso prolongado de cateter central ¹¹. Contudo, os recém-nascidos são mais propensos à doença, devido a integridade da pele muitas vezes comprometida, necessidade de terapia com cateteres venosos centrais, suscetibilidade à infecção do trato gastrointestinal, intubação endotraqueal entre outros fatores. Inclui-se também ao grupo de risco, paciente cirúrgicos, particularmente aqueles com cirurgia o trato gastrointestinal ⁴, conforme o paciente deste estudo.

C. parapsilosis está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade por infecções sistêmicas, e as infecções por este agente tem sido considerada tão relevantes quanto as causadas por *C. albicans* ¹², principalmente em recém-nascidos. É uma espécie encontrada principalmente em recém-nascidos, causando mais de 33% da candidíase invasiva neste grupo de paciente ¹³. Além das mãos dos profissionais de saúde serem os principais vetores na aquisição exógena de *C. parapsilosis*, a colonização da pele ou do trato gastrointestinal está frequentemente relacionado a infecção por esse agente ¹⁴.

A identificação da espécie, além da realização do perfil de suscetibilidade das leveduras pode contribuir para uma melhor evolução no tratamento dos casos de infecção, afim de nortear o manejo clínico para um diagnóstico e tratamento adequado ¹⁵. Entretanto nem todos os hospitais tem a disponibilidade de realizar o teste de suscetibilidade aos antifúngicos, como o caso deste hospital em que foi realizado o estudo.

Ao longo dos últimos 15 anos, é possível observar que cada vez mais os antifúngicos fazem parte das prescrições médicas, no entanto, o arsenal antifúngico utilizado é ainda pobre ¹⁶. Os testes de suscetibilidade antifúngica fornecem uma estimativa de potência *in vitro* de um agente contra um patógeno de interesse, a fim de um resultado para uma provável terapia ¹⁷.

Com exceção a micafungina, observou-se uma suscetibilidade *in vitro* a todos dos os antifúngicos utilizados no tratamento deste paciente, ou seja; anfotericina B; CIM 0.50µg/ml; fluconazol; CIM 0.25 µg/ml e a voriconazol; CIM 0.03 µg/ml. Clinicamente foi possível observar que *C. parapsilosis* foi persistente no decorrer da infecção, se manteve em vários sítios, culminando com a causa do óbito, mesmo em vigência de tratamento antifúngico. Alguns estudos sugerem que a exposição aos antifúngicos podem favorecer a seleção de resistência entre os isolados ^{18, 19}. A resistência molecular para as equinocandinas é mediada principalmente por mutações nos genes *FKS* e estão associadas com falhas terapêuticas de pacientes que receberam tratamento com essa classe de antifúngico e que conferem uma resistência cruzada a todas equinocandinas ²⁰.

Os isolados tiveram maior capacidade de adesão em relação a formação de biofilme em silicone, conforme figura 2. Aderência aos tecidos epiteliais facilita a colonização de biomateriais e início de formação de biofilme, que podem ser importantes determinantes de virulência ^{21, 22}. Apesar de não estar claro essa predileção de *C. parapsilosis* por infecção em recém-nascidos, a adesão a pele e biomaterias que levam à formação de biofilme, podem ser importantes determinantes para a gravidade desse tipo de infecção.

É importante destacar que o biofilme *in vitro* de *C. parapsilosis* tratado com antifúngico apresentou redução, mas não foi eliminado por completo, sendo o antifúngico fluconazol o mais eficiente, salientando que o neonato foi tratado por mais tempo com anfotericina B (36 dias) do que com fluconazol (11 dias). De acordo com a literatura, biofilmes são foco de infecção e de difícil tratamento, principalmente relacionados a CVC. E ainda, infecções por *C. parapsilosis* são especialmente associados com soluções de hiperalimentação e cateteres centrais ^{4, 21, 22}.

Indicando, neste caso, que a permanência da levedura possivelmente possa estar relacionada a capacidade desses isolados em aderir e formar biofilme em cateter.

De acordo com a análise de RAPD alta similaridade entre as amostras de *C. parapsilosis* foi observada independentemente do sítio e o período de isolamento indicando tratar-se de mesma levedura em todas as culturas. Apesar das amostras se mostrarem idênticas conforme o dendograma, ou seja, uma mesma cepa desde o início da infecção, a terapia com todas as classes de antifúngico não foram eficientes sugerindo que a virulência desse patógeno neste tipo de paciente, deve ser avaliada de forma detalhada.

REFERENCIAS

- 1- Abdur-Rahman LO, Abdulasheed NA, Adeniran JO . Challenges and outcomes of management of anterior abdominal wall defects in a Nigerian tertiary hospital. Paediatric Surgery Unit, Department of Surgery, University of Ilorin and University of Ilorin Teaching Hospital, Ilorin, Nigeria. 2011, **8**: 159-163.
- 2-Feja KN, Wu F, Roberts K, et al. Risk factors for candidemia in critically ill infants: a matched case-control study. *J Pediatr*. 2005 Aug. 147(2):156-61
- 3-Fawley JA, Peterson EL, Christensen MA, Rein L, Wagner AJ. Can omphalocele ratio predict postnatal outcomes? *J Pediatr Surg*. 2015 Oct 22
- 4-Trofa D, Gacser A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 2008, 4 (**21**), 606-25.
- 5-Van Asbeck EC, Huang YC, Markham AN, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. *Mycopathologia*, 2007, **164**: 287–293.
- 6- Negri M1, Martins M, Henriques M, Svidzinski TI, Azeredo J, Oliveira R. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. *Mycopathologia*. 2010 Mar; 169(3):175-82. doi: 10.1007/s11046-009-9246-0. Epub 2009 Oct
- 7-Larone DH, ASM Press, Washington, DC. Medically Important Fungi: A Guide to Identification, Fifth Edition, 2011. p 485.

- 8-Spanu T, Posteraro B, Fiori B, D’Inzeo T, Campoli S, et al., Direct malditof mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of , *J ClinMicrobiol.* 2012 Jan; 50 (1): 176-179.
- 9- Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. *Candida* species adhesion to oral epithelium: factors involved and experimental methodology used. *Crit Rev Microbiol.* 2006, **32**:217–26. doi:10.1080/10408410601023524.
- 10-Bonfim PS, Fiorini A, Shinobu HMCS, Baeza LC, Fernandes MA, Sviszinski TIE. Molecular typing of *Candida albicans* isolates from hospitalized patients. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 55(6): 385-91, 2013.
- 11-Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candidatropicalis*: biologia, epidemiologia, patogenicidade e resistência antifúngica. *FEMS MicrobiologyReviews*, 2012, **36**: 288-305. doi: 10,1111 /j.1574-6976.2011.00278.x
- 12-Estrada-Mata E1, Navarro-Arias MJ1, Pérez-García LA1, et al. Members of the *Candida parapsilosis* Complex and *Candida albicans* are Differentially Recognized by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Front Microbiol.* 2016 Jan 13; **6**:1527.
- 13-Pammi M, Holland L, Butler G, Gacser A, Bliss JM. *Candida parapsilosis* is a significant neonatal pathogen: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2013, **32**: 206–e216. 10.1097/INF.0b013e3182863a1c
- 14- Miranda LN, Rodrigues ECA, Costa SF, et al. *C.parapsilosis* candidaemia in a neonatal unit over 7 years: a case series study. *Infectious diseases. BMJ Open* 2012; **2**:000992 doi:10.1136/bmjopen-2012-000992
- 15-Deorukhkar SC1, Saini S. Echinocandin susceptibility profile of fluconazole resistant *Candida* species isolated from blood stream infections. *Infect Disord Drug Targets.* 2015 Dec 9. **6**: 1 – 7.
- 16-Bailly S1, Maubon D2, Fournier P3, et al. Impact of antifungal prescription on relative distribution and susceptibility of *Candida* spp. - Trends over 10 years. *J Infect.* 2016 Jan; **72**(1):103-11.
- 17-Salci TP, Batilana AP, Pietrobon R, Caparroz-Assef SM. Problems related to antifungal prescription: a qualitative study of the views of intensivists. *Journal of evaluation in clinical practice*, 2014 Aug; **20**(4):460-6
- 18-Leon C, Ostrosky-Zeichner L, Schuster M. What's new in the clinical and diagnostic management of invasive candidiasis in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2014 Jun; **40**: 808–819 (PubMed PMID: [24718642](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24718642/). Epub 2014/04/11. eng)

19-Fournier P, Schwebel C, Maubon D, et al. Antifungal use influences *Candida* species distribution and susceptibility in the intensive care unit. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Dec; **66**: 2880–2886 (PubMed PMID: [21980066](#). Epub 2011/10/08. eng)

20-Maubon D, Garnaud C, Calandra T, Sanglard D, Cornet M. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? *Intensive Care Med*. 2014 Sep; **40**: 1241–1255(PubMed PMID: [25091787](#). Epub 2014/08/06. eng)

21-Silva S, Henriques M, Martins A, et al. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *MedMycol* 2009, **47**: 681–689.

22-Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Aderência e formação de biofilme de não- *Candida albicans* *Candida* espécies Tendências Microbiol 2011, **19**: 241-247

Tabela 1: *Candida parapsilosis* proveniente de diferentes materiais biológicos/fômites e terapia antimicrobiana empregada, relacionada aos dias de vida de um neonato com onfalocele internado em UTIn de um Hospital Universitário do sul do Brasil.

	Dias de Vida																
	28	32	37	42	46	54	60	62	65	75	80	84	96	101	102	103	
Hemocultura																	
<i>C. parapsilosis</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
Urocultura																	
Leveduras	x																
<i>C. parapsilosis</i>						x											
CVC																	
<i>C. parapsilosis</i>				x													
Antibioticoterapia	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Antifungicoterapia																	
Anfotericina B	x	x	x	x	x	x	x							x	x	x	x
Fluconazol						x	x	x									
Micafungina							x	x	x	x				x	x		

X: Referente aos dias de vida em que ocorreu o isolamento / tratamento e procedimentos invasivos.

Antibioticoterapia: Metronidazol; ampicilina; cefepime; vancomicina; tazocim; meropenem; linezolida; polimixina-B.

Tabela 2: Fatores e procedimentos de risco observados durante a internação de um neonato nascido com onfalocele internado em UTIn de um Hospital Universitário do sul do Brasil.

Procedimentos/Fatores de Risco para Colonização por <i>Candida</i> sp. em Neonatos		
Fatores de risco	Procedimentos observados	Tempo de exposição (dias)
Idade gestacional <28 semanas	39 semanas	n/a
Baixo peso a nascer <1000g	2.800gr	n/a
Uso prévio de antimicrobianos de amplo espectro	Sim	27
Uso de bloqueadores H2 (ranitidina)	Sim	26
Uso de CVC	Sim	50
Uso de SOG	Sim	51
Uso de NPT	Sim	44
Ventilação mecânica >7 dias	Sim	31
Cirurgia do TGI	Sim	5

n/a: Não aplicável

CVC: Catéter venoso central

SOG: Sonda orogástrica

NPT: Nutrição parenteral prolongada

TGI: Trato gastrointestinal

Tabela 3: Sítios de isolamentos e perfil de suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos de *Candida parapsilosis* isolado de diferentes amostras clínicas de um paciente nascido com onfalocele internado em UTIn de um Hospital Universitário do sul do Brasil.

Nº isolado	Material biológico (Dias de vida que foi isolado)	Antifúngicos*			
		CIM em µg/ml (ponto corte) **			
		MCF	VRC	FLC	AMB
1	Sangue (28)	4,00 (I)	0,03 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)
2	Sangue (32)	4,00 (I)	0,03 (S)	0,5 (S)	0,50 (S)
3	Sangue (37)	4,00 (I)	0,03 (S)	0,5 (S)	0,50 (S)
4	Sangue (42)	8,00 (R)	0,03 (S)	0,25 (S)	0,50 (S)
5	Sangue (46)	4,00 (I)	0,03 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)
6	Sangue (54)	4,00 (I)	0,125 (S)	0,25 (S)	1,00 (S)
7	Sangue (60)	4,00 (I)	0,125 (S)	0,25 (S)	0,50 (S)
8	Sangue (62)	4,00 (I)	0,25 (I)	0,50 (S)	0,50 (S)
9	Sangue (65)	8,00 (R)	0,125 (S)	0,50 (S)	0,25 (S)
10	Sangue (75)	4,00 (I)	0,125 (S)	0,50 (S)	0,25 (S)
11	Sangue (80)	4,00 (I)	0,125 (S)	0,25 (S)	0,50 (S)
12	Sangue (84)	4,00 (I)	0,125 (S)	0,25 (S)	0,50 (S)
13	Sangue (96)	4,00 (I)	0,125 (S)	0,25 (S)	0,50 (S)
14	Sangue (101)	4,00 (I)	0,06 (S)	0,50 (S)	0,25 (S)
15	Urina (54)	4,00 (I)	0,03 (S)	0,25 (S)	1,00 (S)
16	Ponta de cateter (42)	4,00 (I)	0,03 (S)	0,25 (S)	0,50 (S)
CIM ₅₀ /CIM ₉₀ ***		4,00/4,00	0,06/0,125	0,25/0,50	0,50/0,50

*MCF: micafungina; VRC: voricoazol; FLC: fluconazol; AMB: anfotericina B.

** MCF: ≤2 µg/ml, (S); 4 µg/ml, (I); ≥8 µg/ml, (R).; VRC: ≤0.125µg/ml, (S); 0.25–0.5µg/ml, intermediário (I); ≥1µg/ml, (R); FLC: ≤2 µg/ml, sensível (S); = 4µg/ml, sensível dose dependente (SDD); ≥8 µg/ml, (R); AFB: ≥2µg/ml, resistente (R).

*** CIM₅₀: Concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% das cepas analisadas

***CIM₉₀: Concentração inibitória mínima capaz de inibir 90% das cepas analisadas

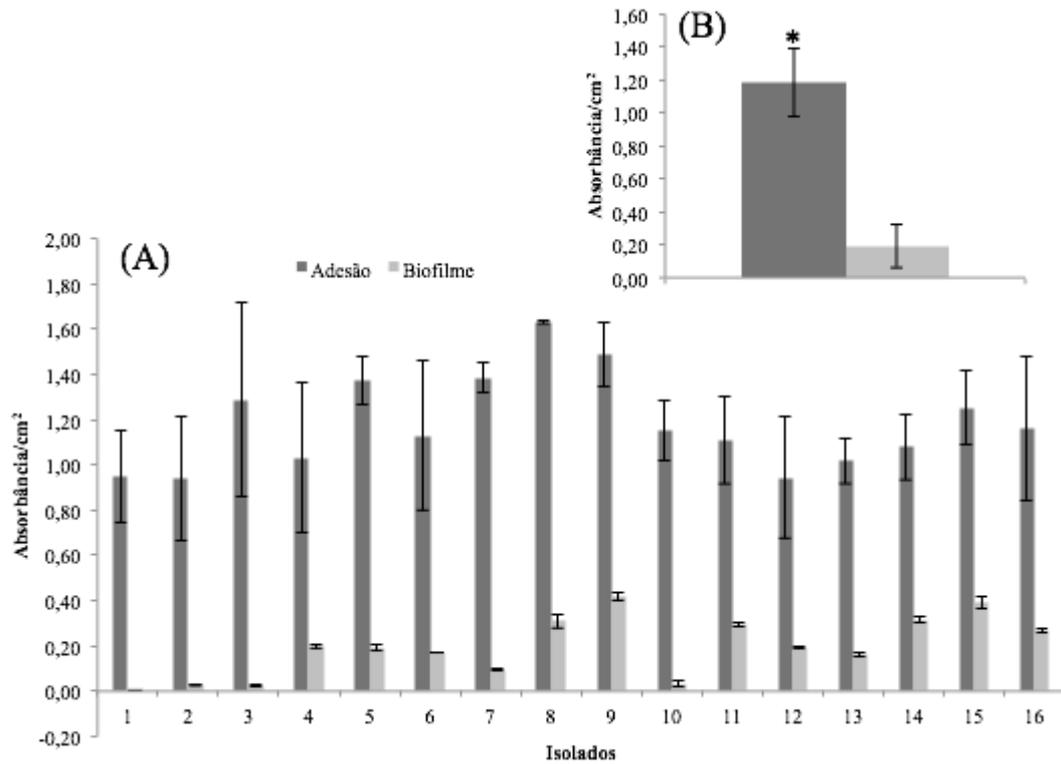


Figura 1: Capacidade de aderir e formar biofilme de *Candida parapsilosis* isolados de hemocultura, urocultura e cateter venoso central de um neonato nascido com onfalocele internado em UTIn de um Hospital Universitário do sul do Brasil. (A) Capacidade de aderir e formar biofilme de cada um dos 16 isolados. (B) Comparação entre adesão e biofilme. * $p < 0,05$.

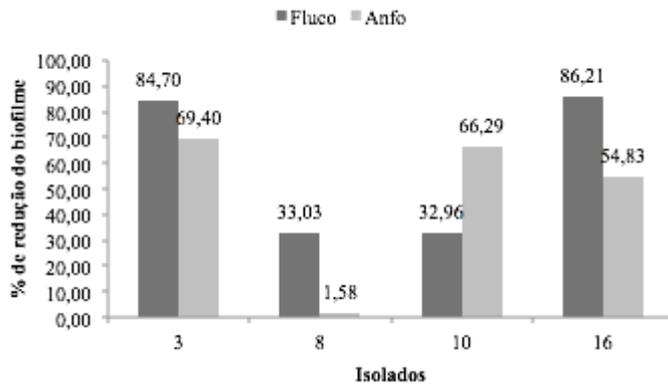


Figura 2: Biofilme de *C. parapsilosis* tratado com fluconazol e anfotericina B isolados clínicos obtidos de hemocultura e cateter venoso central de um neonato nascido com onfalocele internado em UTIn de um Hospital Universitário do sul do Brasil.

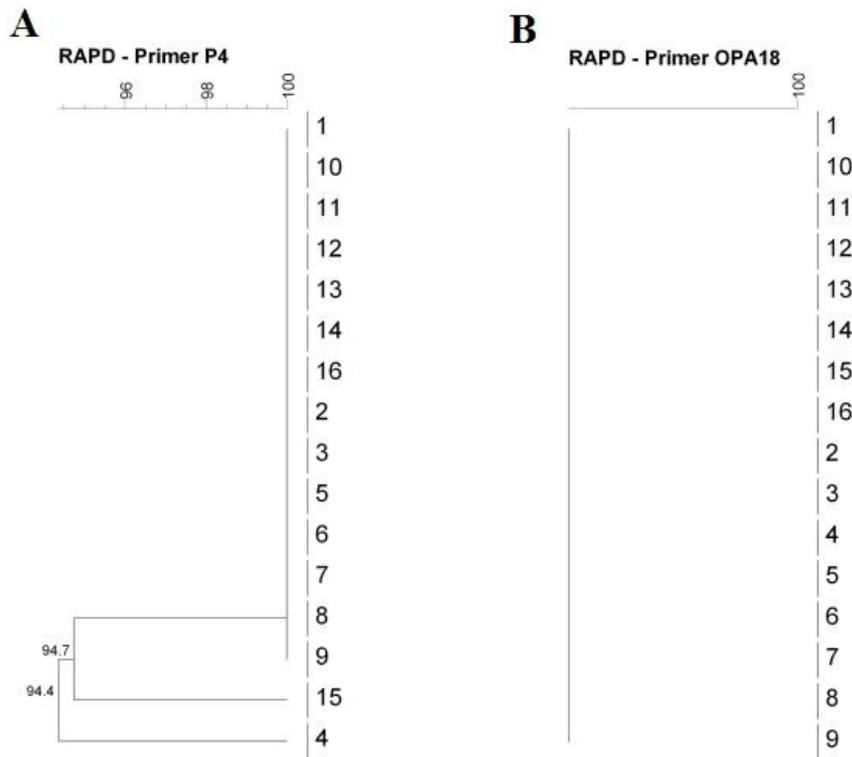


Figura 3: Dendogramas gerados pelo agrupamento UPGMA a partir da amplificação dos Primers P4 (A) e Primer OPA18 (B). O índice de similaridade (S_{AB}) foi calculado através do coeficiente de Dice, para 16 isolados de *Candida parapsilosis*.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

Neste estudo evidenciou-se que as infecções fúngicas pode ser uma problemática nos serviços de UTIn devido a vários fatores de risco que o neonato é exposto. As cirurgias em TGI, como as correções de malformações abdominais, correspondem a fator de risco à infecção fúngica. Constatamos que este caso de onfalocele, sem outras anomalias, com fechamento total da cavidade e parede abdominal logo no primeiro dia de vida, e que supostamente poderia ter uma boa resolução, acabou indo a óbito por sepse fúngica.

Candida parapsilosis tem se destacado como agente de infecção hospitalar especialmente em UTIn e, esse fato pode ser atribuído ao seu potencial de aderir e produzir biofilme. Além disso, é importante observar que apesar da susceptibilidade *in vitro* à maioria dos antifúngicos, *C. parapsilosis* foi persistente no decorrer da infecção, se manteve em vários sítios, culminando com a causa do óbito, mesmo em vigência de tratamento antifúngico.

Consideramos de relevância os serviços de saúde pensar na possibilidade de candidemia em neonatos com onfalocele, o que ainda não havia sido relatado. Importante chamar a atenção para a improvável origem da espécie de *Candida* em questão: considerando a cirurgia para correção da onfalocele, como o principal fator de risco para a candidemia, o agente esperado seria *Candida albicans*, cuja origem é o intestino. *C. parapsilosis* por outro lado é conhecida como colonizante da pele humana, portanto, apesar de difícil comprovação, essa sepse deve ter sido atribuída à transmissão horizontal.

Finalmente cabe uma séria reflexão sobre o manejo clínico da sepse fúngica, especialmente em UTIn, em nossa opinião, deveria ser repensado e conduzido com cautela, considerando que essa levedura muitas vezes não é valorizada nos serviços hospitalares. Sobretudo, salientamos as limitações em relação à falta de protocolos validados para o tratamento de casos pouco típicos como esse, estamos certos de que essa carência contribuiu para o desfecho negativo desse caso.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Após as reflexões viabilizadas com essa dissertação algumas ações são de grande relevância e, precisam ser executadas, entre outras:

Ações de educação em saúde, aos profissionais diretamente envolvidos e que precisam ser capacitados quanto às novas tendências em relação a infecções oportunistas como a septicemia por fungos.

Caberia ainda novas pesquisas, como estudos qualitativos reforçando a importância do tema, entre os profissionais da saúde, uma vez que novas tecnologias surgem a cada momento e a população neonatal encontra-se cada vez mais exposta a vários fatores de risco nas UTIs.

Outra perspectiva real é a busca por novas opções antifúngicas, importantes para dar cobertura às infecções menos usuais, como a sepse por *C. parapsilosis* após cirurgia em TGI. Novas drogas antifúngicas deverão ser investigadas em paralelo à padronização de protocolos para uso racional dos antifúngicos disponíveis atualmente.

Os resultados desta pesquisa auxiliarão na reflexão da necessidade de se criar protocolos para o tratamento de infecções fúngicas em UTIs, tendo como meta uma assistência de maior qualidade nos serviços de saúde. Dessa forma contribuindo também para uma análise do perfil de infecção que um neonato com malformação abdominal pode apresentar.

ANEXOS

ANEXO I

ARCHIVES OF JOURNAL OF PEDIATRICS

Editorial Policies

General Information

The Journal of Pediatrics publishes the following peer-reviewed (single-blind) material: Original Research Articles, Clinical and Laboratory Observations (case reports), reviews of Medical Progress in pediatrics and related fields, Grand Rounds (clinicopathologic conferences [CPC] or didactic discussions), Commentaries, Association of Medical School Pediatric Department Chairs, Inc. (AMSPDC) commentaries, brief novel case reports (Rediscovering the Physical Exam and Insights and Images), Letters to the Editor, Workshop/Symposium Summaries and Supplements. *The Journal* does not publish animal studies or basic science articles without direct clinical relevance.

Ethical Approval of Studies, Informed Consent, and Identifying Details

Studies on patients or volunteers require ethics committee and/or independent review board (IRB) approval, which should be documented in the Methods section of the paper. If this study was not approved by the appropriate ethics committee or IRB, include a statement as to why it was exempt.

Manuscripts describing research involving human subjects should indicate that written informed consent was obtained from the parents or guardians of the children who served as subjects of the investigation and, when appropriate, assent from the subjects themselves. In the event that either the Editors or the reviewers question the propriety of the human investigation with respect to the risk to the subjects or to the means by which informed consent was obtained, *The Journal of Pediatrics* may request more detailed information about the safeguards employed and the procedures used to obtain informed consent. Copies of the minutes of the committees that reviewed and approved the research also may be requested. Authors should verify compliance with the Health Insurance Portability & Accountability Act of 1996 (HIPAA) prior to submission.

Additionally, manuscripts describing research involving human subjects should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans (<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>); Uniform Requirements for manuscripts submitted to biomedical journals (<http://www.icmje.org>).

Patients have a right to privacy. Therefore identifying information, including patients' images, names, initials, or hospital numbers, should not be included in videos, recordings, written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific

purposes and you have obtained written informed consent for publication in print and electronic form from the patient (or parent, guardian, or next of kin where applicable). If such consent is made subject to any conditions, Elsevier must be made aware of all such conditions. Written consents must be provided to Elsevier on request.

Even where consent has been given, identifying details should be omitted if they are not essential. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic pedigrees, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning and editors should so note. If such consent has not been obtained, personal details of patients included in any part of the paper and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Preparation of Manuscripts

General Information

Manuscripts are to be submitted via the Elsevier Editorial System (EES), the electronic submission website at <http://ees.elsevier.com/jpedis>. Aside from the required Medical Progress, Commentaries, Grand Rounds, and Workshop/Symposium Summary pre-submission proposals, the Editors will not assess proposals of other article types prior to submission. Authors should review carefully the Authors' Tutorial for the system at http://ees.elsevier.com/eeshelp/EES_Author_Tutorial.html.

Manuscripts must adhere to the American Medical Association's (AMA) Manual of Style, as well as additional layout and length guidelines, outlined below, using the default settings in Word (or other word processing software) for font size and margins (e.g., 12 point font, 1" margins). All text should conform to standard American English style and usage. Authors for whom English is not their native language are strongly encouraged to seek the aid of a professional English language medical editing service. Although *The Journal of Pediatrics* does not endorse any particular English language editing services, many are available online to edit your manuscript for a fee.

After submission, the corresponding author can log onto EES to view the status of the manuscript. All accepted manuscripts are subject to editorial revision and shortening. Authors should avoid redundancy between sections of text and between illustrations and text. Due to page limitations, the Editors may decide that figures, appendices, tables, acknowledgments, and other material be published in the online version of *The Journal* and referenced in the print edition; however, important methods and results should not be separated and should be included in the body of the text.

Abbreviations and Acronyms

A list of abbreviations and acronyms that appear >3 times should be included in the manuscript, along with the expansion of each. All abbreviations and acronyms should be expanded, followed by the abbreviation or acronym in parentheses, upon first use in the abstract, as well

as in the first use in the body of the manuscript. All subsequent uses, including tables and figures, should use the abbreviation or acronym. Because abbreviations and acronyms are designed to assist readers, they should be limited to those defined in the AMA Manual of Style, those that are commonly used by general pediatricians, and those that shorten the names of study groups.

Drugs, Devices, and Other Products

Use nonproprietary names of drugs, devices, and other products, unless the specific trade name is essential to the discussion. The trade name may appear once in the Abstract and once in the Introduction or Methods section, followed by the nonproprietary name, manufacturer, and manufacturer location in parentheses; all other mention of the product must use the generic name. Trade names of drugs and other products must not appear in the article title.

Laboratory Values

Laboratory values should be described in metric mass units. The International System of Units (SI units) should be provided in parentheses immediately after metric units. Conversion tables are available (see JAMA 1986; 255:2329-39 or Ann Intern Med 1987; 106:114-29).

Database Linking

Beginning November 1, 2015, authors are encouraged (but not required) to connect manuscripts with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your initial manuscript submission: (DATABASE: <<>>; URL). For example, (TAIR: AT1G01020; <https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=137159&type=locus>). For more information and a full list of supported databases, please go to <http://www.elsevier.com/databaselinking>.

References

References must be numbered according to order of appearance in the text and use superscript or parenthesized numbers in the text. For reference style, follow the Vancouver format set forth in "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (<http://www.icmje.org/>), with journal abbreviations according to Cumulated Index Medicus. If the reference is to an abstract, letter, or editorial, place the appropriate term in brackets after the title. Citations should refer to primary analyses (ie, original content), instead of literature reviews and secondary analyses.

Examples of references (if 6 or fewer authors or editors, list all; if 7 or more, list first 6 and add et al): *For journal articles*

Kramarz P, DeStefano F, Gargiullo PM, Chen RT, Lieu TA, Davis RL, et al. Does influenza

vaccination prevent asthma exacerbations in children? *J Pediatr* 2001; 138:306-10.

Cozzi F, Morini F. Possible mechanisms of pacifier protection against SIDS [letter]. *J Pediatr* 2001;138:783.

For Articles in Press (online)

Hellems MA, Gurka KK, Hayden GF. A review of *The Journal of Pediatrics*: The first 75 years. *J Pediatr* (2008). doi:10.1016/j.jpeds.2008.08.049.

For books

Rosenstein BJ, Fosarelli PD. *Pediatric pearls: the handbook of practical pediatrics*. 3rd ed. St Louis: Mosby; 1997.

Virginia Law Foundation. *The medical and legal implications of AIDS*. Charlottesville (VA): The Foundation; 1987.

For chapters in books

Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited diseases*. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 3421-52.

For websites

American Medical Association [homepage on the Internet]. Chicago: The Association; c1995-2002 [updated 2001 Aug 23; cited 2002 Aug 12]. AMA Office of Group Practice Liaison; [about 2 screens]. Available from: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>

Reference Management Software

The reference template for *The Journal of Pediatrics* is available in many of the most popular reference management software products, including products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, please select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. Please be sure to double-space the Reference section.

Tables

Tables are to be uploaded into EES as separate documents, formatted in .doc or .xls. A concise

title should be supplied for each. Tables should be self-explanatory and should supplement, not duplicate the text. If a table or any data therein have been previously published, a footnote must give full credit to the original source. (See [Permissions](#)).

All Tables should be numbered according to their sequence in the text of the manuscript. Online only Tables, if any, should be submitted "as usual" through EES. Indicate what should be published online only in EES (type "Table x; online only" in the file description field when you upload the files) and in the manuscript text (add "online" behind the reference to the table going online only). Do not renumber online only Tables or label them as "supplemental."

Figure Legends and Keys

A concise legend for each Figure must be included in the manuscript file, not in the Figure files. If a Figure has been previously published or has been adapted from a prior publication, the legend must give full credit to the original source. (See [Permissions](#)).

If a Figure key is included, it must be in a font size that is easy to read and proportionate to the Figure and added to blank space inside or under graphs. If patterns or symbols are included in the Figure key, they must be large enough to decipher. If the same Figure key is used for a multipanel Figure, only one centrally located Figure key is needed.

Figures

Black and white Figures will be reproduced at no cost to the authors, but authors are expected to pay the extra cost associated with reproduction of color illustrations in the print version of *The Journal of Pediatrics* (currently \$450 for the first color figure and \$100 each for additional figures in the same manuscript). The Editors retain the right to edit, delete, or move online Figures and Tables as they deem appropriate. (See [Article Type](#)). Figure legends must be separate from the figures, and included in the manuscript file. (See [Figure Legends](#)) Each figure must be uploaded into EES as a separate file.

All Figures should be numbered according to their sequence in the text of the manuscript. Online only Figures, if any, should be submitted "as usual" through EES. Indicate what should be published online only in EES (type "Figure x; online only" in the file description field when you upload the files) and in the manuscript text (add "online" behind the reference to the figure or table going online only). Do not renumber online only Figures or label them as "supplemental."

Article Types

Articles Clinical and Laboratory Observations

Clinical and Laboratory Observations (CLOs) are either: (1) "case reports" that provide novel insight into pathophysiology, diagnosis, or treatment of an entity that does not represent a coincidental association; (2) small series of diagnostic or therapeutic interventions; or (3) brief,

focused studies related to a topic of interest to pediatricians. Please note that CLOs are not designed to present information that is generally available in textbooks, even if the reported entity is novel. CLOs are designed to provide readers with new information and stimulate new approaches to diagnosis, clinical management, or research. CLOs should be approximately 9 double-spaced, numbered manuscript pages, including the title page, references, and figures and tables (combined total of 2 is recommended), with a brief, unstructured abstract of less than 50 words.

Insights and Images

Submissions to the Insights and Images section of *The Journal of Pediatrics* should succinctly illustrate clinical problems or solutions of interest to readers and must fit on one published page. At least one publishable figure is required; however, captioned photographs, brief anecdotes or analyses, cartoons, short movie, animation, audio files, and supplemental figures (see Illustrations) are welcome. All material must be original, and a fresh, useful insight must be offered. Text must be less than 300 words and is subject to shortening if the text and figure(s) do not fit on one published page. All references will be published in the online version of *The Journal*. Additional figure(s) may be placed in the online version of *The Journal* if the piece exceeds one published page. Original, signed, written permission from the patient, or parent or guardian of a minor child, is required for publication of recognizable images in all forms and media. (See Permissions) Authors will be required to sign a standard copyright transfer agreement; therefore, all submissions must have a title. Submissions will undergo review by the Editors, and their decision to accept or reject will be final.

ANEXO II

ANEXO II

THE JOURNAL OF HOSPITAL INFECTION (JHI)

About the Journal

The *Journal of Hospital Infection* (JHI) is the editorially independent scientific publication of the Healthcare Infection Society (HIS). The aim of the Journal is to publish high quality research and information relating to infection prevention and control that is relevant to an international audience.

Scope of the Journal

JHI welcomes submissions that relate to all aspects of infection prevention and control in healthcare settings. This includes submissions that:

- provide new insight into the epidemiology, surveillance, or prevention and control of healthcare-associated infections and antimicrobial resistance in healthcare settings;
- provide new insight into cleaning, disinfection and decontamination;
- provide new insight into the design of healthcare premises;
- describe novel aspects of outbreaks of infection;
- throw light on techniques for effective antimicrobial stewardship;
- describe novel techniques (laboratory-based or point of care) for the detection of infection or antimicrobial resistance in the healthcare setting, particularly if these can be used to facilitate infection prevention and control;
- improve understanding of the motivations of safe healthcare behaviour, or describe techniques for achieving behavioural and cultural change;
- improve understanding of the use of IT systems in infection surveillance and prevention and control.

We also welcome submissions that relate to national policies or guidelines, especially where the subject matter is of international relevance.

Although our readership is predominantly clinical, we are also pleased to receive basic science submissions that have clinical relevance.

Article types

The Journal invites articles of the following types:

Full length, original research articles

This is the usual format for publishing original research. The word limit is 4000 words of text, which includes the structured summary of up to 250 words, text, acknowledgements and references. Each figure and/or table counts as 200 words towards the total. JHI accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research.

Short reports

This format is ideal for reporting smaller original research studies. The format is the same as for a full length, original research article, except that the summary of up to 100 words should be unstructured. The word limit is 2000 words of text, with no more than two figures or tables and a maximum of ten references.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<https://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article

becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

The language of the JHI is **British** English.

Please adjust your spell checker if necessary. British spellings include diarrhoea, *Haemophilus*, haematology, paediatrics, leucocyte, leukaemia, bacteraemia, sulphonamides, aetiology. Please note the journal uses UK 'z' spelling (e.g., colonizes) and meticillin not methicillin.

Always write in **plain English** - many of our readers will not be native English speakers. Please be careful to use terminologies that will be understandable internationally, for example when describing the organisation of your hospital or healthcare system. Please be careful not to use jargon which will not be internationally understood.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author and copies of the consents or evidence that such consents have been obtained must be provided to Elsevier on request. For more information, please review the *Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals*, <https://www.elsevier.com/patient-consent-policy>. Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Article structure

It is the author's responsibility to put the manuscript into the required format before submission. Papers submitted that do not comply with these instructions will be returned to the author and not considered for publication until they have been resubmitted.

Text

Depending on the article type the following headings must be used. You may also use subheadings to break up the text, but footnotes should be avoided. All pages of your manuscript should be numbered consecutively in the following order: title page, text, references, tables, figures, legends.

Introduction

Include a brief statement outlining the purpose and context of your paper but leave discussion for the Discussion section.

Methods

You can include preliminary results in the Methods section if necessary.

Results

This should be a statement of Results, without discussion of their significance or relationship to those of others. You can present this information in text or in figures or tables, but not both.

Discussion

Include any weaknesses or limitations of your study here but do not introduce any new results.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

You should show the article title, names of all authors (but not their degrees) and the name of the institution or department where the work was done, as well as the name, address, telephone and email address of the author to whom the proofs and correspondence should be sent if accepted. A running title not exceeding 40 characters and spaces should also be provided on the title page.

Structured summary

The summary should explain briefly what was done, what was observed and what was concluded. Please note that this is arguably the most important part of the entire paper and will be the first, and perhaps the only, part of your paper that is read. Summaries should be structured, with the following sub-headings: Background, Aim, Methods, Findings and Conclusion. Summaries must not exceed 250 words. MEDLINE/PubMed has a maximum limit of 250 words

for published summaries; anything past 250 words is truncated resulting in the loss of the concluding portion of your summary.

Keywords

Please provide up to 6 keywords from your summary and list them immediately after the summary. You should use British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.**Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

You should acknowledge any help received in carrying out the work, including supply of bacterial strains, permission to study patients, phage or biotyping of strains, language or writing help. Acknowledgements should appear in a separate section before the references.

Numbers and measurements

Write out numbers one to nine unless they are measurements (e.g. 5 mL). Spell out numbers greater than 9 if they begin a sentence, or when clarity requires it. Numbers above and including 10 000 have a space, not a comma. A decimal point is preceded by a number or cypher, e.g. '0.5'. Decimal points in columns should be aligned vertically. Measurements may be expressed in SI or non-metric units. Use 10 mL/h rather than -1 or per. When referring to microbial concentrations use expressions such as '10x', not 'x log₁₀'. When referring to changes in microbial concentration, use expressions such as 'reduced by a factor of 10x', not 'reduced by x log₁₀'; 'a log₁₀ reduction factor of x' may also be used.

Bacterial nomenclature

Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and written in italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not 'Staph. aureus'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear spell out the names of microbes in full. When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case roman not underlined, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'acinetobacter infection'. If the genus is specifically referred to, use italics, e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use

lower case roman e.g. 'salmonellae'; plurals may be anglicized e.g.'salmonellas'. For trivial names, use lower case roman e.g. 'meningococcus'.

Statistics

Include *P* values and confidence intervals where appropriate. The name and version of any statistical computer package should be written out in full.

Drugs

These should be referred to by their approved generic names. Do not use the proprietary name, as this may vary between countries.

Date format

Dates should be written in full with superscript "th", e.g. 20th September 2001. Otherwise, use European Date Format, i.e. 20/9/2001, not 9/20/2001.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figures

Illustrations should be in finished form suitable for reproduction. Photographs should have strong contrast and be trimmed to exclude unnecessary background. Figure details should be easily discriminated at the final size. Colour photographs will be considered only if essential.

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

All illustrations are to be numbered with arabic numerals as Figures 1, 2, 3 etc. without abbreviation, in the order of their first mention in the text.

A short explicit legend must be provided for each figure. All such legends should be listed together in the final section of the manuscript.

Tables

Tables should be numbered in Roman numerals (e.g. Table III). Each table should be on a separate sheet after the references and should include a title which makes the meaning clear without reference to the text. Use '-' for 'no observation', or 'not measured'.

References

In the text, consecutively number your references in the order in which they are first mentioned, and identify them by superscript arabic numerals after punctuation, e.g. 'as noted by Smith.⁴' References are better placed at the end of sentences so that they don't break up the flow.

Quoted references should be listed in numerical (not alphabetical) order at the end of the article. References cited in tables or in figure legends should be numbered sequentially according to the first mention in the text of the particular table or illustration. Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa).

Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Journal references

These should be arranged with the Vancouver style. For a full explanation, see the Br Med J 1988; 296: 401-405. Lists of up to six authors or fewer should be fully listed. For seven or more authors list the first three and add *et al.*

The journal title (not the article title) should be italic font and the volume number should be shown in bold font.

Example:

Casey AL, Elliott TSJ, Adams D, *et al.* Role of copper in reducing hospital environment contamination *J Hosp Infect* 2010; **74**: 72-77

Krcmery V, Barnes AJ. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect* 2002; **50**: 243-260
Titles of journals should be abbreviated in accordance with *Index Medicus*.

Article in press

Please include the digital object identifier (DOI) as in the following example:

1. Russell AD, McDonnell G. Concentration: a major factor in studying biocidal action. *J Hosp Infect* 2000; **44**: 1-3. doi:10.1053/jhin.1999.0654.

Books and chapters

These should be set out as below:

Fraiese A, Bradley C, editors. *Ayliffe's control of healthcare-associated infection: a practical handbook*. 5th ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2009.

Pittet D, Harbath S. The intensive care unit. In: Bennett JV, Brachman PS, editors. *Hospital infections*. 4th ed. Boston, MA: Little, Brown and Company; 1998. p. 381-402.

Please note that it is the responsibility of the authors to ensure that references are listed accurately.