



IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS DE *CANDIDA* SPP. PRESENTES NA MICROBIOTA DE PREMATUROS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF MS

IDENTIFICATION OF STRAINS OF CANDIDA SPP. PRESENT IN THE MICROBIOTA OF PRETERM INFANTS BY MALDI-TOF MS MASS SPECTROMETRY

(Viviane dos Santos Melo, Davi Porfirio da Silva, Rodrigo José Nunes Calumby, Rossana Teotonio de Farias Moreira, Márcia de Souza Carvalho Melhem, Fernanda Cristina de Albuquerque Maranhão)

Resumo: A colonização prévia da microbiota de prematuros é um fator predisponente para a ocorrência de infecção fúngica, condição recorrente no período neonatal. Nesse contexto, esse estudo objetivou identificar espécies de *Candida spp* de prematuros, não identificadas em meio cromogênico, pela técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF MS. Trata-se de estudo experimental realizado em hospital escola da cidade de Maceió - Alagoas. As amostras foram coletadas por meio de *swab* nas primeiras 12, 48 e 96 horas pós-nascimento e, a partir de então, uma vez por semana até o momento da alta do setor ou óbito do prematuro. As amostras foram semeadas e cultivadas em meio Ágar Saboraud Dextrose com Cloranfenicol e incubadas em estufa a 35°C por 48 horas. As colônias foram identificadas macro e microscopicamente e, após purificação, foram semeadas em meio cromogênico e, aquelas identificadas como *Candida spp.*, identificadas por espectrometria de massas através da técnica de MALDI-TOF MS. Entre dezembro de 2019 a março de 2020, 19 prematuros compuseram a amostra, desses seis apresentaram-se colonizados (31%), originando 16 isolados do gênero *Candida*. Desses, 7 (36,8%) originaram-se da microbiota oral e 9 (56,2%) da retal. O primeiro sítio colonizado foi a cavidade bucal (6,2%), ainda nas primeiras 48 horas de vida. A identificação da espécie pelo meio cromogênico, evidenciou sete espécies (43,7%) de *C. albicans* e nove de *Candida spp* (56,25%), as quais foram identificadas pela técnica de MALDI TOF em: *C. parapsilosis* (5/55,5%), *C. albicans* (3/33,3%) e *C. lusitaniae* (1/11,1%). A identificação fenotípica, baseada apenas em meio cromogênico, não é suficiente para a identificação de espécies, cada vez mais necessária para a orientação de medidas profiláticas e terapêuticas para o controle de infecções relacionadas à assistência à saúde.

Palavras-Chave: *Candida*; Unidade de Terapia Intensiva Neonatal; Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde.

Abstract: Previous colonization of the microbiota of premature infants is a predisposing factor for the occurrence of fungal infection, a recurrent condition in the neonatal period. In this context, this study aimed to identify *Candida spp* species of premature infants, not identifiable in a chromogenic environment, using the MALDI-TOF MS mass spectrometry technique. This is an experimental study conducted at a teaching hospital in the city of Maceió - Alagoas. The samples were collected by swab in the first 12, 48 and 96 hours after birth and, from then on, once a week until the moment of discharge from the sector or death of the premature infant. As constituents, they were sown and grown on Saboraud Dextrose Agar with Chloramphenicol and incubated in an oven at 35°C for 48 hours. The colonies were identified macro and microscopically and, after purification, were sown in a chromogenic medium and, identified as *Candida spp.*, Identified by mass spectrometry using the MALDI-TOF MS technique. Between December 2019 and March 2020, 19 premature infants made up the sample, these six generations were colonized (31%), giving rise to 16 faculty of the genus *Candida*. Of these, 7 (36.8%) originated from the oral microbiota and 9 (56.2%) from the rectal. The first colonized site was the oral cavity (6.2%), still in the first 48 hours of life. The species identification by means of chromogen, showed seven species (43.7%) of *C. albicans* and nine of *Candida spp* (56.25%), as identified by the MALDI TOF technique in: *C. parapsilosis* (5/55 , 5%), *C. albicans* (3 / 33.3%)

and *C. lusitaniae* (1 / 11.1%). Phenotypic identification, based only on a chromogenic medium, is not sufficient for the identification of species, which is increasingly necessary to guide prophylactic and therapeutic measures to control changes related to health care.

Keywords: Candida; Neonatal Intensive Care Unit; Health Care Related Infections.

INTRODUÇÃO

A infecção fúngica consiste em uma condição recorrente no período neonatal, afetando principalmente neonatos de Muito Baixo Peso e Extremo Baixo Peso hospitalizados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN). A candidemia, cujo agente etiológico são leveduras oportunistas do gênero *Candida*, é o segundo tipo de infecção hospitalar que mais apresenta complicações clínicas ao neonato pré-termo, frequentemente associada à morbidade significativa e alcançando o índice de até 59% de mortalidade (CABRERA *et al.*, 2016).

As espécies *C. albicans* e *C. parapsilosis* são as mais frequentes nos episódios infecciosos, sendo a primeira responsável por 75% das infecções. Essas espécies se desenvolvem bem em ambientes aquecidos e úmidos, com capacidade de causar infecções invasivas e resistência aos principais grupos de antifúngicos (CABRERA *et al.*, 2016).

Em relação aos fatores de risco para infecção fúngica tem-se a prematuridade, procedimentos invasivos, uso prolongado de antibióticos de amplo espectro, nutrição parenteral parcial ou total e tempo de internação prolongado, no entanto, um fator que vem recebendo destaque é a colonização prévia por espécies de *Candida spp.* (ALHUSSAINI, 2016), que ocorre em 10% dos Recém-Nascidos (RN) críticos na primeira semana de internação (PINHAT *et al.*, 2012).

Além desses fatores de risco, a suscetibilidade desses indivíduos também está associada à imaturidade do seu organismo (YAPAR, 2015). O uso crescente de antifúngicos, de forma empírica ou profilática, também vem sendo considerado fator importante na alteração na epidemiologia das espécies de *Candida* em hospitais, a exemplo de antigo estudo realizado por Wingard (1994) que já se preocupava com o uso indiscriminado de fluconazol em países mais desenvolvidos, como possível fator determinante de seleção de cepas de *C. glabrata* (WINGARD, 1994).

Neste sentido, torna-se necessário adotar a estratégia de se monitorar a colonização fúngica de prematuros de muito baixo e extremo baixo peso, hospitalizados em UTIN visto que a colonização é considerada fator determinante para o estabelecimento de infecção, onde espécies

presentes na microbiota, como as da cavidade oral podem corresponder às mesmas isoladas do sangue dos neonatos que desenvolvem candidemia (BATISTA *et al.*, 2014).

Dessa forma, esse estudo teve por objetivo identificar espécies de *Candida spp.* da microbiota de prematuros, não definidas em meio cromogênico, a partir da técnica de *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-ofFlight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS).

DESENVOLVIMENTO

Procedimentos metodológicos

Trata-se de estudo experimental realizado em hospital escola da cidade de Maceió - Alagoas. Foram incluídos no estudo neonatos prematuros com peso menor ou igual a 1500 gramas hospitalizados em UTIN e nascidos no próprio hospital em estudo, nascidos de parto vaginal ou cesáreo. As coletas foram realizadas com *swab* estéril na cavidade oral e retal, nas primeiras 12 horas, 48 horas e 96 horas de vida, seguindo-se de coletas semanais até alta do setor.

As amostras foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol e posteriormente incubadas em estufa a 35°C. Para a identificação fenotípica, colônias com aspectos leveduriformes foram avaliadas microscopicamente, em objetiva de 1000 X, através da Coloração de Gram. Após a microscopia as colônias foram purificadas e cultivadas em meio cromogênico *Chromagar Candida*® para identificação presuntiva das principais espécies de importância clínica, seguida de incubação a 35°C por até 48h, de acordo com o fabricante.

Em sequência, as cepas não identificadas em meio cromogênico, definidas como *Candida spp* foram submetidas à técnica de espectrometria de massa: *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS), onde uma pequena amostra de colônia purificada foi inserida em uma placa com a matriz polimérica, a fim de receber irradiação de laser e ionização, onde moléculas derivadas são aspiradas num tubo de vácuo e levadas a um detector, obtendo-se um gráfico específico. Para esse teste foram considerados resultados com escores acima de 2,00.

Os resultados foram analisados segundo os preceitos da estatística básica, considerando frequências relativas e absolutas. A pesquisa foi submetida e aprovada pelo o Comitê de Ética em Pesquisa sob o número 69147617.0.0000.5013.

Resultados e discussão

Entre dezembro de 2019 e março de 2020, 19 prematuros foram acompanhados quanto à composição da sua microbiota. Seis prematuros colonizados para a levedura compuseram a amostra final, sendo 3 (50%) do sexo feminino e 3 (50%) do sexo masculino, com idades gestacional variando de 28 e 32 semanas, registrando-se 4 (66,67%) partos cirúrgicos e 2 (33,33%) vaginais, e peso médio ao nascer de 1141g, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização dos participantes da pesquisa colonizados por *Candida spp.*, Maceió, Alagoas, Brasil, 2020.

Variáveis	Frequência absoluta	Frequência relativa
Sexo		
Feminino	3	50%
Masculino	3	50%
Peso		
Muito baixo peso	4	66,67%
Extremo baixo peso	2	33,33%
Tipo de parto		
Cesáreo	4	66,67%
Vaginal	2	33,33%
Idade gestacional		
<30 semanas	4	66,67%
> 30 semanas	2	33,33%

Fonte: pesquisa, 2020.

Estudo conduzido na região sul do país, ao traçar o perfil de internação de RN em UTIN, corrobora com os achados supracitados. Nesse estudo, a prematuridade representou a principal causa de internação. Outras características mais frequentes foram o baixo peso ao nascer e a idade gestacional inferior a 34 semanas (SOUZA; SHIMODA; DUARTE, 2018).

A maior frequência de RN do sexo masculino, entre aqueles que carecem de hospitalização em UTIN, é relatada amplamente na literatura publicada (LIMA *et al.*, 2015; DAMIAN; WATERKEMPER; PALUDO, 2016; SOUZA; SCHIMODA; DUARTE, 2018; RODRIGUES; BELHAN, 2017). Nesse estudo, o sexo feminino foi maior que o masculino. Entretanto, Souza e colaboradores (2013) afirmam que o sexo masculino apresenta o processo de maturidade pulmonar mais lento, contribuindo para o nascimento prematuro, sendo o sexo feminino considerado um fator protetor para o amadurecimento mais rápido do pulmão.

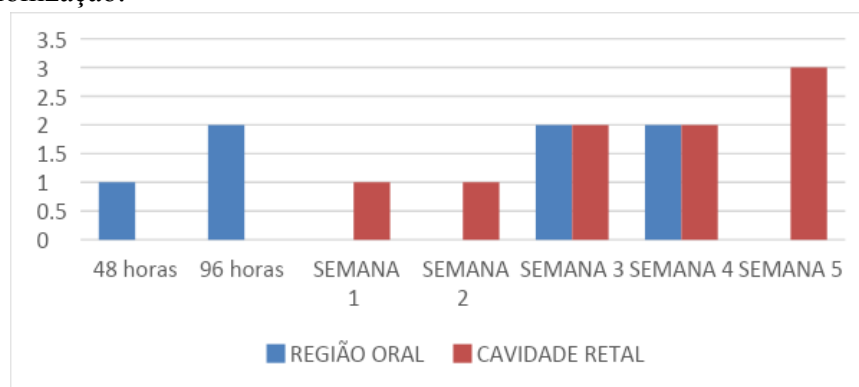
GEPNEWS, Maceió, v.5, n.1, p.359-366, jan./mar. 2021

As condições de parto são um fator importante para colonização e, conseqüentemente, para as taxas de infecção. O parto vaginal é uma importante fonte de colonização do RN, pois estes entram em contato com microrganismos que constituirão sua microbiota mais rápido do que crianças com parto cirúrgico. Além disso, no parto cesáreo observa-se um retardado no estabelecimento da microbiota fisiológica do RN (PAIXÃO; CASTRO, 2016). Os RN de parto cirúrgico ainda podem apresentar colonização gastrointestinal distinta daqueles nascidos de parto vaginal até os sete anos de idade (SINGH; MITTAL, 2019).

Os seis prematuros originaram 16 isolados do gênero *Candida*, identificados por avaliação macroscópica da colônia que apresenta aspecto mucoso, e por microscopia óptica, pela coloração de Gram (Figura 1), onde se observa células ovais ou arredondadas com ou sem brotamento.

Em relação à detecção dos isolados da colonização, os primeiros isolados foram obtidos ainda nas primeiras 48 horas de vida. O maior número, no entanto, foi obtido na terceira semana de vida, e em relação ao sítio, um número maior de isolados foi obtido a partir da cavidade retal, como pode ser observado no gráfico 1.

Gráfico 1 - Caracterização da colonização dos recém-nascidos prematuros quanto ao sítio e momento de colonização.



Fonte: dados da pesquisa, 2020.

Na literatura, não são muito os estudos dedicados à investigação do início da colonização de prematuros em UTIN, sendo esses escassos. Entretanto, alguns estudos apontaram um pico de colonização entre o 14º e 28º dia de vida em recém-nascidos de muito baixo peso admitidos na UTIN (MANZONI *et al.*, 2012). Esses relatos se assemelham aos nossos achados que mostraram um maior número de isolados de sítios colonizados na terceira semana de vida.

Durante o monitoramento dos RN, foi observada maior prevalência de colonização na mucosa retal, o que pode estar relacionado à preferência dessa levedura por ser uma região úmida, *GEPNEWS, Maceió, v.5, n.1, p.359-366, jan./mar. 2021*

escura e fechada, ocorrendo principalmente a partir da primeira semana após o nascimento. Entretanto, foi a cavidade oral a primeira a ser colonizada ainda nas primeiras 48 horas de vida e a cavidade retal a que teve mais prevalência.

A identificação presuntiva dessas cepas por técnica fenotípica utilizando-se meio de cultivo cromogênico resultou em sete espécies de *C. albicans* e nove *Candida spp.* Essas nove espécies sem identificação específica foram submetidas à identificação por meio da técnica de MALDI-TOF MS, que consiste em espectrometria de massa, permitindo a identificação das nove cepas de *Candida spp.* em: *C. parapsilosis* (5/55,5%), *C. albicans* (3/33,3%) e *C. lusitaniae* (1/11,1%).

A utilização de MALDI-TOF, que nesse estudo propiciou a identificação de espécies cuja aplicação de técnicas fenotípicas não foi capaz, é considerada revolucionária na identificação de microorganismos. O tempo de análise da amostra após o crescimento em placa é de cerca de 30 segundos, enquanto que em outras metodologias esse tempo pode ser de horas e até dias (ASSIS; JULIANO, A.; JULIANO, M., 2011).

O uso do MALDI-TOF MS é um grande avanço para a microbiologia, além da vantagem da economia de tempo proporcionada, possui um custo-benefício viável e de alto desempenho, que associada identificação molecular, torna a identificação das espécies de *Candida* mais precisas, favorecendo o conhecimento dessas quanto ao seu perfil patogênico e de susceptibilidade antifúngica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O monitoramento da colonização e dos fatores de risco associados, ante o risco de infecção, é uma medida importante para orientar à Prevenção de Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde (IRAS) e melhorar a qualidade da assistência ao pré-termo admitido na UTIN.

Dessa forma, os resultados desse estudo apontam que a colonização do recém-nascido prematuro abaixo de 1500g, por leveduras do gênero *Candida*, hospitalizados em Unidade de Terapia Intensiva, inicia-se ainda nas primeiras 48 horas de vida, sendo mais frequente entre os bebês a partir da primeira semana em 81,25%, nesse caso, o sítio que apresentou colonização mais prevalência foi o retal, compondo 77,77% das amostras. A espécie *C. albicans* foi a única

identificada por cultivo em meio cromogênico, enquanto a espectrometria de massa identificou *C. parapsilosis*, *C. albicans* e *C. lusitaniae*.

As técnicas fenotípicas de identificação de fungos, como o uso de meios cromogênicos, são acessíveis e de baixo custo, entretanto oferecem limitações quanto à especificidade para determinadas espécies. O uso de tecnologias, como a espectrometria de massa por meio da técnica MALDI-TOF MS, agrega rapidez e especificidade aos testes de identificação, oferecendo segurança para vigilância de infecções e tratamento de infecções. Nesse sentido, entende-se que a identificação fenotípica baseada apenas em meio cromogênico não é mais suficiente, necessitando associação a outros métodos de identificação.

REFERÊNCIAS

- ALHUSSAINI, M. S. Incidência de colonização de espécies de *Candida* em unidade de terapia intensiva neonatal no Hospital de Riyadh, Arábia Saudita. **Revista Médica da Indonésia**, [s.l.], v.25, n.3, p.171-81, 2016. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/309155102_Incidence_of_Candida_species_colonization_in_neonatal_intensive_care_unit_at_Riyadh_Hospital_Saudi_Arabia. Acesso em: 17 out. 2020.
- ARIFF, S. *et al.* Clinical spectrum and outcomes of neonatal candidiasis in a tertiary care hospital in Karachi, Pakistan. **J. Infect. Dev. Ctries.**, [s.l.], v.5, n.3, p.216-23, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21444991/>. Acesso em: 17 out. 2020.
- ASSIS, D. M.; JULIANO, A.; JULIANO, M. A. A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de microorganismos. **Rev. Univ. Vale Rio Verde**, Três Corações, v.9, n.2, p.344-355, 2011. Disponível em: <http://www.periodicos.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/view/232>. Acesso em: 17 out. 2020.
- BATISTA, G.C.M. *et al.* Oral colonization: a possible source for candidemia in low-weight neonates. **Journal de Mycologie Médicale**, [s.l.], v.24, p.81-86, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24440610/>. Acesso em: 17 out. 2020.
- CABRERA, C. A. *et al.* Uso profilático de fluconazol em pré-termos extremos colonizados por *Candida* spp. **Resid. Pediatr.**, v.6, n.2, p.80-86. 2016. Disponível em: <http://www.residenciapediatrica.com.br/detalhes/220/uso-profilatico-de-fluconazol-em-pre-termos-extremos-colonizados-por-candida-spp>. Acesso em: 17 out. 2020.
- DAMIAN, A.; WATERKEMPER, R.; PALUDO, C.A. Perfil de neonatos internados em unidade de tratamento intensivo neonatal: estudo transversal. **Arq. Ciênc. Saúd.**, São José do Ribeião Preto, v.23, n.2, p.100-105, 2016. Disponível em: <http://www.cienciasdasaude.famerp.br/index.php/racs/article/view/308>. Acesso em: 09 dez. 2019.
- DINIZ, L. M. O.; FIGUEIREDO, B. C. G. O sistema imunológico do recém-nascido. **Revista Médica de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v.24, n.2, p.233-240. 2014. Disponível em: <http://rmmg.org/artigo/detalhes/1604>. Acesso em: 17 out. 2020.



- GUPTA, P. *et al.* Skin Colonization by *Malassezia* spp. in hospitalized neonates and infants in a tertiary care centre in North India. **Mycopathologia**, [s.l.], v.178, n.3, p.267-272, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25037485/>. Acesso em: 17 out. 2020.
- LIMA, S.S. *et al.* Aspectos clínicos de recém-nascidos admitidos em Unidade de Terapia Intensiva de hospital de referência da Região Norte do Brasil. **ABCS Health Sci.**, Santo André, p.40, n.2, p.62-68, 2015. Disponível em: <https://www.portalnepas.org.br/abcshs/article/view/732>. Acesso em: 09 dez. 2019.
- OLIVEIRA M. L. A.; VERONESI, C. L.; GOULARD, L. S. Caracterização de recém-nascidos com hemoculturas positivas internados em unidade de terapia intensiva neonatal. **Rev. Eletr. Gestão Saude**, Brasília, v.3, n.2, p.717-29, 2012. Disponível em: <https://periodicos.unb.br/index.php/rgs/article/view/115>. Acesso em: 17 out. 2020.
- PAIXÃO, L. A.; CASTRO, F. F. S. Colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro. **Universitas: Ciênc. Saúd.**, Brasília, v.14, n.1, p.85-96, 2016. Disponível em: <https://www.publicacoesacademicas.uniceub.br/cienciasaude/article/view/3629>. Acesso em: 09 dez. 2019.
- PINHAT, E. C. *et al.* Fungal colonization in newborn babies of very low birth weight: a cohort study. **J. pediatr.**, Rio de Janeiro, v.88, n.3, p.211-216, maio 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/jped/v88n3/v88n03a05.pdf>. Acesso em: 17 out. 2020.
- RODRIGUES, F. A.; BERTOLDI, A. D. Perfil da utilização de antimicrobianos em um hospital privado. **Ciênc. Saúd. Colet.**, Rio de Janeiro, v.15, n.1, p.1239-1247, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.org/pdf/csc/2010.v15suppl1/1239-1247/pt>. Acesso em: 30 out. 2019.
- SINGH, A.; MITTAL, M. Neonatal microbiome - a brief review. **J. Matern. Fetal Neonatal med.**, Londres, v.5, p.1-8, 2019. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14767058.2019.1583738?journalCode=ijmf20>. Acesso em: 09 dez. 2019.
- SOUZA, K. C. L.; CAMPOS, N. G.; SANTOS JUNIOR F. F. U. Perfil dos recém-nascidos submetidos à estimulação precoce de uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal. **Rev. Bras. Promoc. Saude**, Fortaleza, v.26, n.4, 2013. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=40831096010>. Acesso em: 17 out. 2020.
- SOUZA, M. N.; SHIMODA, E.; DUARTE, S. C. Perfil epidemiológico de pacientes internados em uma unidade de terapia intensiva neonatal. **Rev. Cient. Facul. Med. Campos**, Campos dos Goytacazes, v.13, n.1, p.15-23, 2018. Disponível em: <http://www.fmc.br/ojs/index.php/RCFMC/article/view/214>. Acesso em: 09 dez. 2019.
- SPILIOPOULOU, A. *et al.* Neonatal intensive care unit candidemia: epidemiology, risk factors, outcome, and critical review of published case series. **Mycopathologia**, [s.l.], v.173, n.4, p.219-228, abr. 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/51792184_Neonatal_Intensive_Care_Unit_Candidemia_Epidemiology_Risk_Factors_Outcome_and_Critical_Review_of_Published_Case_Series. Acesso em: 17 out. 2020.
- WINGARD, J. R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. **Clin. Infect. Dis.**, [s.l.], v.20, p.115-125, 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7727637/>. Acesso em: 17 out. 2020.