



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

**FATORES DE RISCO E DIAGNÓSTICO DE CANDIDEMIA POR
HEMOCULTURA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)
MULTIPLEX EM RECÉM-NASCIDOS INTERNADOS EM UNIDADE
DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL EM RECIFE, PERNAMBUCO**

MOACIR BATISTA JUCÁ

RECIFE/PE

2011

MOACIR BATISTA JUCÁ

**FATORES DE RISCO E DIAGNÓSTICO DE CANDIDEMIA POR
HEMOCULTURA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)
MULTIPLEX EM RECÉM-NASCIDOS INTERNADOS EM UNIDADE
DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL EM RECIFE, PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de mestre em Medicina Tropical.

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

**RECIFE
2011**

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

J91f

Jucá, Moacir Batista.

Fatores de risco e diagnóstico de candidemia por hemocultura e reação em cadeia da polimerase (PCR) *multiplex* em recém-nascidos internados em unidade de terapia intensiva neonatal em Recife, Pernambuco / Moacir Batista Jucá. – 2011.

79 f. : il.; tab.; quad.; 30 cm.

Orientadora: Heloísa Ramos Lacerda de Melo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2011.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Candidemia. 2. Fatores de risco. 3. Sepses. 4. UTI neonatal. 5. Reação em cadeia da polimerase. I. Melo, Heloísa Ramos Lacerda de (Orientadora). II. Título.

618.9883

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2016-094)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DO MESTRANDO

MOACIR BATISTA JUCÁ

No dia 02 de agosto de 2011, às 09h00, na Sala de Aula do PPGMEDTROP do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE), os Professores: a **Profª. Dra. Vera Magalhães da Silveira** (Presidente da Banca - UFPE), a **Profª. Dra. Rejane Pereira Neves** (UFPE), e a **Profª. Dra. Maria Júlia Gonçalves de Mello** (IMIP), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram o mestrando **MOACIR BATISTA JUCÁ** sobre a sua Dissertação intitulada “**FATORES DE RISCO E DIAGNÓSTICO DE CANDIDEMIA POR HEMOCULTURA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE MULTIPLEX (MT-PCR) EM RECÉM-NASCIDOS INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL EM RECIFE, PERNAMBUCO**”, o qual foi orientado pela **Profª. Dra. Heloísa Ramos Lacerda de Melo** (UFPE). Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta do mestrando, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Profª. Drª. Vera Magalhães da Silveira

Profª. Drª. Rejane Pereira Neves

Profª. Drª. Maria Júlia Gonçalves de Mello

Aprovado
2 aprovados
Aprovado -

Profª. Drª. Vera Magalhães da Silveira

Profª. Drª. Rejane Pereira Neves

Profª. Drª. Maria Júlia Gonçalves de Mello

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. José Tadeu Pinheiro

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Prof^a. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Prof^a. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

CORPO DOCENTE

Prof^a. Ana Lúcia Coutinho Domingues

Prof^a. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Prof. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Prof^a. Elizabeth Malagueño de Santana

Prof. Fábio André Brayner dos Santos

Prof^a. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Prof^a. Maria Amélia Vieira Maciel

Prof^a. Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Prof^a. Maria do Amparo Andrade

Prof^a. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Prof^a. Marli Tenório Cordeiro

Prof. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Prof^a. Valdênia Maria Oliveira de Souza

Prof^a. Vera Magalhães da Silveira

Dedico esta dissertação de mestrado:
À minha amada esposa Tarcísia, pelo companheirismo
e compreensão em todos os momentos.
A meu filho João Pedro motivo de felicidade na minha vida.
À meus pais Glória e Petrócio por tudo que fizeram por mim até hoje.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Heloisa Ramos, por sua paciência, amizade e confiança que foram muito importantes no desenvolvimento desse trabalho.

A toda equipe da UTI Neonatal do Hospital Agamenon Magalhães, em especial às Dras. Alessandra Maia, Maria Clara, Edilene, Angélica, Marlise e à toda equipe de enfermagem que foram muito importantes durante todo o tempo de desenvolvimento dessa pesquisa.

A toda equipe do laboratório de biologia molecular do serviço de oncologia do instituto materno-infantil prof. Fernando Figueira, em especial, à prof. Dra. Norma Lucena por todo o suporte e ao colega Jurandy Magalhães pela realização das técnicas moleculares utilizadas no estudo.

A equipe do laboratório de Micologia Médica da UFPE, em especial a Prof^a Rejane Neves e a Carolina Silva pela identificação das espécies de *Candida spp.* e realização dos testes de susceptibilidade.

Aos estudantes Arnaldo Assunção e Amanda pela contribuição na coleta de dados.

Aos professores do departamento de Medicina Tropical por todos os ensinamentos.

Aos amigos que tive o prazer de conviver na pós-graduação.

A todos os funcionários da pós-graduação em especial Walter Leite Galdino pelo apoio.

À minha família pela força de todos os dias.

Aos amigos em especial a Tomaz Albuquerque, por sua amizade e apoio incondicional.

A Dra. Maria do Carmo Duarte pela disponibilidade, pelas orientações e sugestões.

Aos meus colegas de CCIH que compartilham comigo a prazerosa e árdua tarefa de controlar infecções.

Aos recém-nascidos e pais que permitiram que este trabalho fosse realizado.

*“Se eu puder aliviar a aflição de uma vida,
Ou aplacar uma dor,
Ou ajudar um frágil passarinho
A retornar a seu ninho,
Não terei vivido em vão.”*

Emily Dickinson

RESUMO

Espécies de *Candida spp.* são a principal causa de infecção fúngica nas unidades de cuidados intensivos neonatais. A mortalidade bruta para candidemia nestes pacientes varia entre 15 e 59%. O atual método padrão-ouro para o diagnóstico de candidemia neonatal é a hemocultura, porém, o método não é tão efetivo como necessário e os critérios clínicos associados à presença de fatores de risco são fundamentais para o início de antifúngicos. A detecção do DNA da *Candida spp.* pela MT-PCR pode proporcionar um diagnóstico rápido e confiável em pacientes de alto risco. **Objetivo:** Determinar a frequência de candidemia diagnosticada por hemocultura e MT-PCR em recém-nascidos internados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal, bem como identificar as espécies e seu perfil de susceptibilidade aos antifúngicos e descrever os fatores de risco relacionados ao seu desenvolvimento. **Método:** Estudo observacional, prospectivo, analítico tipo coorte onde foram acompanhados todos os recém-nascidos internados em UTI neonatal com mais de 48 horas de internamento, avaliando a presença de fatores de risco para candidemia, através de hemocultura e MT-PCR, no período de janeiro a dezembro de 2010. Candidemia foi definida como a presença de sinais e sintomas de infecção e isolamento de *Candida spp.* em hemocultura de acordo com os critérios da *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) 2009. Foi utilizado o teste qui-quadrado para verificar possível diferença entre frequências das variáveis e o teste t-Student em amostras independentes para verificar possível diferença na média das variáveis. Foi adotado um nível de 5% de significância. **Resultados:** Foram acompanhados 205 recém-nascidos. Deste total, 37(18,0%) dos pacientes foram a óbito ao final do estudo. Sepses foi observada em 68(33,2%) dos recém-nascidos, e sepse documentada laboratorialmente ocorreu em 38(18,5%). Onze pacientes apresentaram candidemia (5,4%) e a MT-PCR foi positiva para *Candida spp.* em 24(11,7%). A incidência de candidemia no período de estudo foi de 2,55 por 1000 pacientes-dia. Após 28 dias do diagnóstico, dos onze pacientes que apresentaram candidemia comprovada, seis (54,5%) evoluíram para cura e cinco (45,5%) foram a óbito. A *Candida parapsilosis* foi a espécie mais isolada nas hemoculturas (63,6%). Em relação à MT-PCR, a *Candida glabrata* foi a mais prevalente (41,7%). Na avaliação do antifungograma, todas as amostras de *Candida spp.* foram sensíveis a anfotericina B e 90,9% foram sensíveis ao fluconazol. Na análise dos fatores de risco, nos pacientes que evoluíram com candidemia e naqueles com MT-PCR positiva para *Candida spp.*, observou-se maior frequência e maior tempo de uso dos procedimentos de risco quando comparados à população geral. **Conclusões:** Como os marcadores laboratoriais são inespecíficos para o diagnóstico, a associação dos dois métodos permitiu a identificação de um maior número de casos de candidemia. Os fatores de risco com maior impacto para candidemia foram hemotransfusão, uso e tempo de antimicrobiano, uso de CVC, uso e tempo de NPT, tempo de PICC, tempo de VMA, além de tempo de internamento na UTI.

Palavras-chave: Candidemia. Fatores de risco. Sepses. UTI neonatal. Reação em cadeia da polimerase.

ABSTRACT

Candida species are the leading cause of fungal infection in the neonatal intensive care units. The total mortality for candidemia in these patients ranges from 15 to 59%. The current gold standard for diagnosis of neonatal candidemia is the blood culture but the method is not as effective as needed and the clinical criteria associated with the presence of risk factors are essential for the initiation of antifungal agents. The detection of *Candida* DNA by MT-PCR can provide a fast and reliable diagnosis in patients at high risk. **Objective:** To determine the frequency of candidemia diagnosed by blood culture and MT-PCR in newborn infants admitted to Neonatal Intensive Care Unit, as well as to identify the species and its susceptibility profile to antifungals and describe the risk factors related to its development. **Method:** An observational, prospective, analytical study, which followed all newborns admitted to the neonatal intensive care unit with more than 48 hours of hospitalization, evaluating the presence of risk factors for candidemia by blood culture and MT-PCR, from January to December 2010. Candidemia was defined as the presence of signs and symptoms of infection and isolation of *Candida* spp. recovered from blood according to the criteria of the Infectious Diseases Society of America (IDSA) 2009. The chi-square test was performed to check possible differences between frequencies of the variables and the t-Student test was applied to independent samples to check possible differences in the average of the variables. It was adopted a 5% level of significance. **Results:** Two hundred five newborns were followed. Of this total, 37 (18.0%) patients died during the study. Sepsis was observed in 68 (33.2%) of newborns, and laboratory-documented sepsis occurred in 38 (18.5%). Eleven patients had candidemia (5.4%) and MT-PCR was positive for *Candida* in 24 (11.7%). The incidence of candidemia in the study period was 2.55 per 1000 patient-days. After 28 days of diagnosis, among the eleven patients with proven candidemia, six (54.5%) were successfully cured and five (45.5%) died. *Candida parapsilosis* was the species most isolated in blood cultures (63.6%). Regarding MT-PCR, *Candida glabrata* was the most prevalent (41.7%). In assessing the antifungigrama, all samples of *Candida* were susceptible to amphotericin B and 90.9% were susceptible to fluconazole. In the analysis of risk factors in patients who developed candidemia, and those with MT-PCR positive for *Candida*, it was observed more frequently and longer use of the procedures of risk when compared to the general population. **Conclusions:** As laboratory markers are not specific for the diagnosis, the association of the two methods allowed the identification of a greater number of cases of candidemia. Risk factors for candidemia with the greatest impact were blood transfusion, use and duration of antibiotic, use of CVC, use and duration of TPN, time of PICC, AVM time, and length of stay in ICU.

Keywords: Candidemia. Risk factors. Sepsis. Neonatal Intensive Care Unit. Polymerase chain reaction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1. Definição operacional e categorização das variáveis **pág.34**

Quadro 2. Sequência dos inicializadores utilizados no diagnóstico
molecular da infecção fúngica **pág.43**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Microrganismos identificados em 60 hemoculturas de recém-nascidos internados em unidade de terapia intensiva neonatal **pág.55**
- Tabela 2.** Fatores de risco para candidemia em pacientes internados em unidade de terapia intensiva neonatal com diagnóstico de candidemia e em recém-nascidos com MT-PCR positiva para *Candida spp.* **pág.56**
- Tabela 3.** Tempo de exposição aos fatores de risco dos pacientes com candidemia comparados aos pacientes sem candidemia **pág.59**
- Tabela 4.** Distribuição dos fatores de risco em relação aos pacientes infectados ou não por *Candida spp.* **pág.59**
- Tabela 5.** Distribuição dos fatores de risco em relação aos pacientes com MT-PCR positiva e negativa para *Candida spp.* **pág.62**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Graus Celsius

CVC - Cateter venoso central

DNA - *Deoxyribonucleic acid*

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EUA – Estados Unidos da América

IDSA - *Infectious Diseases Society of America*

ITS - *Internal transcribed spacer*

g – Grama

IgG – Imunoglobulina G

µl – Microlitro

ml – Mililitro

MT-PCR - *multiplex PCR*

Nosocomial National Infections system - NNIS

NPT - Nutrição parenteral total

PCR - *Polymerase chain reaction*

PICC – Cateter central perifericamente inserido

RN - Recém-nascido

UTI - Unidade de terapia intensiva

VMA – Ventilação mecânica assistida

VPP - Valor preditivo positivo

VPN - Valor preditivo negativo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO-----	pág.15
2. REVISÃO DA LITERATURA-----	pág.17
2.1. SEPSE NEONATAL-----	pág.17
2.2. EPIDEMIOLOGIA DA CANDIDEMIA NA UTI NEONATAL-----	pág.18
2.3. FATORES DE RISCO PARA CANDIDEMIA NEONATAL-----	pág.20
2.4. DIAGNÓSTICO DA CANDIDEMIA NEONATAL-----	pág.24
3. OBJETIVO-----	pág.28
3.1. OBJETIVO GERAL-----	pág.28
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS-----	pág.28
3.3. OBJETIVO SECUNDÁRIO-----	pág.28
4. PACIENTES E MÉTODOS-----	pág.29
4.1. DESENHO DO ESTUDO-----	pág.29
4.2. POPULAÇÃO ALVO-----	pág.29
4.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO-----	pág.29
4.4. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO-----	pág.29
4.5. DEFINIÇÃO DE TERMOS E VARIÁVEIS-----	pág.29
4.6. MÉTODO DE COLETA E PROCESSAMENTO DE DADOS-----	pág.32
4.7. QUALIDADE DOS INSTRUMENTOS DE MEDIDA E PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS-----	pág.32
AMOSTRAS DE SANGUE PARA REALIZAÇÃO DE HEMOCULTURA-----	pág.32

4.7.1. AMOSTRAS DE CULTURA DE VIGILÂNCIA-----	pág.32
4.7.2. SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO-----	pág.33
4.7.3. AMOSTRAS DE SANGUE PARA AMPLIFICAÇÃO POR PCR-----	pág.33
4.7.4. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO NAS AMOSTRAS DE SANGUE-----	pág.33
4.7.5. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECÇÃO FÚNGICA-----	pág.34
4.8. PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS-----	pág.36
4.9 ASPECTOS ÉTICOS-----	pág.36
5. RESULTADOS	
ARTIGO: Fatores de risco e diagnóstico de candidemia por hemocultura e reação em cadeia da polimerase multiplex (MT-PCR) em recém-nascidos internados em unidade de terapia intensiva neonatal-----	
6. CONCLUSÕES-----	pág.63
REFERÊNCIAS-----	pág.64
7. APÊNDICE A (TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO)-----	
APÊNDICE B-(FICHA DE COLETA DE DADOS/QUESTIONÁRIO)-----	pág.74
ANEXO A – (aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do CCS-UFPE)-----	pág. 79

1. INTRODUÇÃO

Espécies de *Candida spp.* são a principal causa de infecção fúngica invasiva nas unidades de cuidados intensivos neonatais e representam o terceiro microrganismo mais comumente isolado na sepse de início tardio. A taxa global de candidemia na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) neonatal é de aproximadamente 1,6%. Entre os lactentes com peso ao nascer abaixo de 1500g a incidência varia entre 5 e 10% e nos recém-nascidos de extremo baixo peso ao nascer (menos de 1000g), varia entre 7 e 20% (CAREY, 2008).

A incidência de episódios de candidemia tem aumentado nos últimos vinte anos, embora as taxas de mortalidade relacionadas pouco se modificaram mesmo após a introdução de novos antifúngicos (SAIMAN *et al*, 2000). Candidemia neonatal é associada com significativa morbidade e mortalidade. A mortalidade bruta entre neonatos varia entre 15 a 59% (RODRIGUEZ *et al*, 2006; SMITH *et al*, 2007).

Um estudo avaliando neurodesenvolvimento em 320 crianças que nasceram com baixo peso e haviam sido diagnosticados com candidemia e meningite por *Candida spp.*, quando analisadas entre 18 e 22 meses de idade, apresentaram menor desenvolvimento psicomotor e maiores taxas de paralisia cerebral, cegueira, surdez quando comparadas com crianças que não experimentaram infecções por *Candida spp.* (BENJAMIN *et al*, 2006). Outro estudo, tipo caso-controle, sobre custos hospitalares demonstrou que crianças com candidemia, em média, aumentam os custos de internação em aproximadamente 28.500 dólares (SMITH *et al*, 2007).

Muitos fatores de risco específicos para candidemia foram identificados em pacientes na UTI neonatal tais como a estrutura imatura da pele, uso prolongado de antibióticos, notadamente cefalosporinas de terceira geração e carbapenêmicos, procedimentos invasivos, uso de cateteres vasculares, nutrição parenteral, ventilação mecânica, uso de corticóide sistêmico, prematuridade, baixo peso ao nascer, cirurgias do trato gastrointestinal e colonização fúngica preexistente (SAIMAN *et al*, 2001).

A maioria dos estudos que avaliam os fatores de risco para candidemia trazem dados limitados, avaliam uma única instituição, envolvem pequeno número de recém-nascidos e são em sua maioria retrospectivos. Os dados desses estudos não podem ser generalizados pois, não incluíram fatores de risco importantes, como colonização fúngica prévia, não realizaram tipagem molecular das espécies ou não avaliaram transmissão nosocomial (SAIMAN *et al*, 2000).

Devido aos fatores limitantes dos métodos de diagnóstico convencionais, o tratamento com antifúngicos é frequentemente empírico em pacientes com risco elevado para infecção,

causando problemas de toxicidade, aparecimento de resistência aos antifúngicos, além de dificultarem ainda mais o isolamento da *Candida spp.*. Entretanto, a detecção do agente etiológico por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) possibilita diagnóstico rápido e confiável, em pacientes pertencentes aos grupos de risco para o desenvolvimento de candidemias (ELLEPOLA *et al*, 2005; PFALLER *et al*, 2007; PERLROTH *et al*, 2007).

Pelo exposto, evidencia-se a escassez de estudos sobre infecções relacionadas à assistência à saúde em unidade de terapia intensiva neonatal no Brasil, particularmente em relação às infecções fúngicas. A investigação da frequência dessas infecções e a caracterização dos fatores de risco associados ao seu aparecimento são primordiais tanto no sentido de redução na incidência quanto na morbimortalidade.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Sepses neonatal

Óbitos no período neonatal representam mais de um terço da taxa global de mortalidade infantil. As infecções constituem a principal causa de óbitos de recém-nascidos nos países em desenvolvimento (LAWN *et al*, 2005; CAREY, 2008).

Apesar dos avanços na abordagem dos neonatos internados em unidades de terapia intensiva, a incidência de sepses neonatal permanece elevada, de um a dez casos/1000 nascidos vivos e de um caso/250 recém-nascidos (RN) prematuros (WYNN *et al*, 2010).

Devido aos avanços nos cuidados intensivos neonatais, a sobrevivência de recém-nascidos prematuros de muito baixo peso tem aumentado e a sepses tardia continua sendo uma importante causa de morbimortalidade entre esses neonatos (WYNN *et al*, 2010).

Os fatores de risco frequentemente associados à sepses neonatal incluem a prematuridade, devido à imaturidade do sistema imunológico, procedimentos invasivos diagnósticos e/ou terapêuticos, ventilação mecânica, nutrição parenteral, antibiótico de amplo espectro, cirurgia, longa permanência hospitalar e não seguimento das normas de prevenção de infecções relacionadas à assistência à saúde. Dados da literatura sugerem que práticas inadequadas durante trabalho de parto, parto e no pós-atendimento, colocam os recém-nascidos em grande risco de infecções e de morte logo após o nascimento (BENJAMIN *et al*, 2000; BENJAMIN *et al*, 2006; COTTEN *et al*, 2006; CAREY, 2008).

A presença de fatores maternos também está ligada ao desenvolvimento de sepses neonatal, sendo estes relacionados à saúde e nutrição da mãe, à presença de infecção por diversas etiologias e ao nível socioeconômico (BENJAMIN *et al*, 2006).

Estudos sobre infecção neonatal relacionada à assistência à saúde relatam que a prevenção de nascimentos prematuros é uma das estratégias mais efetivas para promover a redução deste tipo de população de risco. Entretanto, a implantação desta medida não é fácil já que depende diretamente de uma boa assistência por parte dos serviços de saúde com a melhoria do atendimento à gestante (Carey, 2008).

Em recém-nascidos os sinais e sintomas, bem como os marcadores laboratoriais de sepses são inespecíficos, sendo importante para o médico usar uma combinação de variáveis para aumentar o valor preditivo do diagnóstico precoce. Vários sinais e sintomas podem ser usados como critérios sugestivos de sepses, entre eles a instabilidade térmica, as alterações de frequência cardíaca e respiratória associadas à gemência e tiragens, a letargia, a intolerância alimentar, as alterações de perfusão tissular e também variáveis laboratoriais tais como

leucocitose ou leucopenia, trombocitopenia, elevação da proteína C reativa e alterações de interleucinas e da reação em cadeia da polimerase (EL BESHAWY *et al*, 2010).

Os patógenos mais comumente identificados incluem *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativo, *Enterococcus* spp e enterobactérias e, num estágio mais tardio, espécies de *Candida* spp. Cinquenta por cento dessas infecções têm como patógeno o *Staphylococcus* coagulase negativo, enquanto que as infecções sistêmicas por Gram negativos causam 20 a 30% das infecções tardias, com uma taxa de mortalidade ao redor de 30 a 50%. Um estudo paquistanês, que analisou dados de países em desenvolvimento sobre as taxas de infecção neonatal, mostrou que bactérias, como *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* são as principais causas de infecções neonatais e mortes no hospital (Carey, 2008).

2.2 Epidemiologia da Candidemia na UTI neonatal

Espécies de *Candida* spp. são a principal causa de infecção fúngica invasiva na unidade de cuidados intensivos neonatais, e representam o terceiro microrganismo mais comumente isolado em hemocultura recuperados a partir de casos de sepse de início tardio na unidade de cuidados intensivos neonatais (COLOMBO *et al*, 2006; DOTIS *et al*, 2005). Candidemia neonatal é associada com significativa morbidade e mortalidade. A mortalidade bruta para candidemia nestes pacientes varia entre 15 e 59% (ROILIDES *et al*, 2004; RODRIGUEZ *et al*, 2006).

A incidência de episódios de candidíase invasiva tem aumentado nos últimos vinte anos, embora as taxas de mortalidade relacionadas pouco se modificaram mesmo após a introdução de novos antifúngicos (SAIMAN *et al*, 2000).

Estudo realizado por Yamamura *et al* (1999) em 14 centros do Canadá, no período de 1992 a 1994 encontrou 415 casos de candidemia, sendo 48 (11,6%) em crianças, das quais 3,8% eram recém-nascidos pré-termo. Karlowicz *et al* (2000), avaliaram 536 recém-nascidos com sepse, tendo diagnosticado candidemia em 18% dos neonatos.

A Incidência de candidemia nos recém-nascidos de extremo baixo peso ao nascer (<1000g) é de 4%. A infecção de corrente sanguínea por *Candida* spp. está associada com uma mortalidade atribuível de 38% e uma mortalidade bruta de 30% a 75% nesta população específica (SHETTY *et al*, 2005).

Estudo multicêntrico que avaliou 6.956 recém nascidos de muito baixo peso (variação do peso ao nascer 401-1500 g) admitidos ao longo de um período de dois anos entre 1998 e 2000 (STOLL *et al*, 2002), *Candida albicans* foi o agente causador de 6% dos episódios de sepse neonatal tardia sendo superada apenas pelo *Staphylococcus* coagulase negativo (48%) e

Staphylococcus aureus (8%) (STOLL *et al*, 2002). Além disso, em outro estudo, a *Candida parapsilosis* foi identificada como relacionada a 4% dos casos de sepse neonatal. (FRIDKIN *et al*, 2006).

A incidência de infecções por *Candida spp.* é maior em recém-nascidos de muito baixo peso, abaixo de 1000 g, como demonstrado em um estudo de vigilância do *Nosocomial National Infections system* (NNIS), que incluiu 130.523 pacientes internados em 128 UTIs neonatais entre 1995 e 2004 (FRIDKIN *et al*, 2006). A taxa global de infecções da corrente sanguínea por *Candida spp.* foi de 1,53 por 1000 pacientes-dia entre os recém-nascidos admitidos na UTI neonatal. Neste estudo, *Candida albicans* foi a espécie mais comumente isolada (60%), seguida pela *Candida parapsilosis* (34%) em 1997 casos identificados de infecções de corrente sanguínea por *Candida spp.* Outras espécies de *Candida spp.* identificadas foram *Candida tropicalis*, *Candida lusitaniae*, *Candida glabrata* e *Candida krusei* isoladas em 4, 2, 2 e <1% dos casos, respectivamente. *Candida krusei* e *Candida glabrata* podem ser parcialmente resistentes ao fluconazol e *Candida lusitaniae* completamente resistente à anfotericina B (FRIDKIN *et al*, 2006).

Mudanças na distribuição das espécies de *Candida spp.* têm sido observadas em diversas instituições com o isolamento cada vez maior de espécies não-*albicans* em recém-nascidos (KOSSOFF *et al*, 1998; MIRANDA *et al*, 2009; AL-SWEIH *et al*, 2009). Infecções neonatais causadas por espécies não-*albicans* ocorrem numa idade mais avançada e têm mais probabilidade de ser adquirida a partir do ambiente hospitalar (SAIMAN *et al*, 2001; FAIRCHILD *et al*, 2002). Estudos relatam que a *Candida parapsilosis* é a segunda espécie mais comumente isolada, representando um terço a um quarto das candidemias (FRIDKIN *et al*, 2006; CLERIHEW *et al*, 2007).

No Brasil, infecções causadas por *Candida parapsilosis* são relatadas em neonatos de muito baixo peso e em adultos. Em São Paulo, autores relatam que *Candida parapsilosis* é a espécie mais frequentemente isolada de sangue e de cateteres intravasculares de neonatos (MOREIRA *et al*, 2005). Entretanto, *Candida albicans* ainda é o principal agente de candidemias e entre as espécies não-*albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* são consideradas os patógenos mais importantes. A emergência de espécies não-*albicans* como agentes importantes de candidemia foi relacionada ao uso profilático ou empírico de drogas antifúngicas (MEDRANO *et al*, 2006).

Embora o uso de fluconazol profilático não resultou em um aumento na incidência de *Candida glabrata* em recém-nascidos, é importante monitorar a incidência relativa das

diferentes espécies de *Candida* com o aumento do uso de antifúngicos na UTI neonatal (SAIMAN *et al*, 2001; FAIRCHILD *et al*, 2002; COTTEN *et al*, 2006).

A candidemia é causa significativa de morbidade e mortalidade em pacientes críticos e imunocomprometidos, e contribui para o aumento no tempo de hospitalização e nos custos médicos. Taxas de mortalidade relatadas variam de 3 a 50% (ABI-SAID *et al*, 1997; FRIDKIN *et al*, 2006; BENJAMIN *et al*, 2010). Ocorre em aproximadamente 5% de neonatos de baixo peso. Essa frequência é mais alta, em torno de 20%, quando se trata de neonatos de extremo baixo peso (< 1000 g). A taxa de mortalidade total por infecções fúngicas é alta, podendo atingir 50% em recém-nascidos (RAO *et al*, 2005). Kossoff e colaboradores (1998), em estudo retrospectivo realizado nos EUA, analisaram 15 anos de candidemia em uma UTI neonatal e detectaram taxas associadas à mortalidade de 26 % para *Candida albicans* e de 4% para *Candida parapsilosis* (RICHTMANN *et al*, 2005).

2.3 Fatores de risco para candidemia neonatal

Vários estudos têm avaliado fatores de risco específicos para candidemia pré, peri e pós-natais em pacientes na UTI neonatal. Entre estes fatores se destacam a estrutura imatura da pele, uso prolongado de antibióticos, notadamente cefalosporinas de terceira geração e carbapenêmicos, procedimentos invasivos, uso de cateteres vasculares, nutrição parenteral, ventilação mecânica, uso de corticóide sistêmico, prematuridade, baixo peso ao nascer, apgar menor que três nos primeiros cinco minutos após o nascimento, cirurgias do trato gastrointestinal e colonização fúngica preexistente (DARMSTADT *et al*, 2000; CAMPBELL *et al*, 2000, NOYOLA *et al*, 2001; SAIMAN *et al*, 2001).

Darmstadt e colaboradores (2000) evidenciaram um maior risco de sepse por *Candida spp.* entre os recém-nascidos com candidíase cutânea congênita e peso inferior a 1000g. Campbell e colaboradores (2000) observaram associação entre o uso de óleos tópicos na pele de recém-nascidos pré-termo extremos e aumento da incidência de candidíase sistêmica.

O uso de antibióticos de largo espectro contribuem para o aumento na frequência de infecções por *Candida spp.* Estudo com 3702 recém-nascidos em 12 UTI neonatais encontrou uma incidência de 2,4 a 20,4%. O número médio de dias de uso de antibióticos foi correlacionado com a incidência de infecções invasivas por *Candida* (coeficiente de correlação de 0,7). Estes resultados sugerem que uma maior utilização de antibióticos de amplo espectro aumenta o risco de infecção por *Candida spp.* (NOYOLA *et al*, 2001).

Além disso, estudos utilizando técnicas de tipagem molecular, têm demonstrado, a transmissão vertical da *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata* (SHERERTZ *et al*, 1992; WAGGONER-FOUNTAIN *et al*, 1996).

Colonização materna por *Candida spp.* e vulvovaginite aumentam a transmissão vertical do organismo e a colonização neonatal (BALEY *et al*, 1986). Amamentação pode resultar em transmissão de *Candida spp.* a partir da pele materna para a mucosa oral do bebê, especialmente em mães com mastite por *Candida spp.*

Crianças admitidas na UTI neonatal estão em risco aumentado para o desenvolvimento de candidemia. Os recém-nascidos, especialmente os prematuros, têm o sistema imunológico imaturo, devido aos baixos níveis de IgG materna circulante decorrente da perda de transferência transplacentária, que ocorre durante o terceiro trimestre de gravidez. Mesmo na presença de concentrações adequadas de IgG, as funções de opsonização e complementar são reduzidas, especialmente em prematuros. Nessas crianças, as barreiras epiteliais são imaturas e a pele e mucosas são barreiras finas e delicadas, fornecendo proteção mínima (STOLL *et al*, 2002, LÓPEZ SASTREM *et al*, 2003; MAHIEU *et al*, 2010).

Os cuidados intensivos neonatais muitas vezes exige medidas invasivas que comprometem a barreira epitelial do hospedeiro, tais como o uso de cateteres venosos centrais e arteriais, a intubação e cirurgia. Estes procedimentos invasivos são mais comumente realizados em crianças que estão gravemente doentes, ou que são prematuras. Condições clínicas, como a enterocolite necrotizante ou a ruptura da pele, que comprometem as barreiras epiteliais também são fatores de risco para candidíase (WEESE-MAYER *et al*, 1987; ROWEN *et al*, 1994; SAIMAN *et al*, 2000).

Em um estudo prospectivo multicêntrico que envolveu 2.847 crianças de seis UTI neonatais, 1,2% desenvolveram candidemia. Os fatores de risco identificados foram: intubação endotraqueal, hospitalização superior a sete dias, idade gestacional menor que 32 semanas, uso de cateter venoso central, uso de dois ou mais antibióticos, choque, apgar no quinto minuto inferior a cinco, uso de nutrição parenteral total (NPT) por mais de cinco dias e uso de bloqueadores H₂ (SAIMAN *et al*, 2000).

A colonização geralmente precede a infecção fúngica invasiva. Recém-nascidos geralmente são infectados com um clone com o qual tinha sido previamente colonizado (SHERERTZ *et al*, 1992; HUANG *et al*, 1998). Cepas de *Candida spp.* podem ser adquiridas através da transmissão vertical do aparelho gastrointestinal / geniturinário da mãe, ou, mais frequentemente, através de transmissão horizontal das mãos dos profissionais de saúde.

Candida parapsilosis é a espécie mais comumente recuperada nas mãos dos profissionais de saúde (SAIMAN *et al*, 2001).

Os sítios mais comumente colonizados são o trato gastrointestinal a pele e, em algumas séries, o trato respiratório. A tipagem molecular mostrou que as cepas colonizantes do trato gastrointestinal podem posteriormente causar infecções da corrente sanguínea, presumivelmente após translocação através do epitélio do trato gastrointestinal. Globalmente, 23% a 37% dos recém-nascidos de muito baixo peso são colonizados por *Candida spp*. Como esperado, a taxa de colonização tende a aumentar com a duração crescente de permanência hospitalar (SAIMAN, 2001).

Neonatos internados em UTI podem se tornar colonizados muito cedo, em torno de 10% deles na primeira semana de vida. A taxa de colonização geral de recém-nascidos internados em uma UTI neonatal de um a três meses de vida pode ser tão alta quanto 50%. Vários sítios podem tornar-se colonizados, com o trato gastrointestinal sendo geralmente a primeira região envolvida. Os sítios onde a colonização é mais frequente incluem as mucosas da boca e intestino com a mucosa oral variando de 20 a 55% e a mucosa retal em 74%. Em um estudo prospectivo envolvendo 2.157 RN, que foram cultivados semanalmente da admissão até a alta, encontraram o reto como o sítio mais frequente de colonização (SAIMAN *et al*, 2001).

Outro estudo observou que a taxa de colonização é dependente do peso do bebê ao nascimento. Ao realizar análise retrospectiva de culturas de vigilância semanais de pele, trato gastrointestinal, respiratório e umbigo realizadas em 50 recém-nascidos de extremo baixo peso (peso ao nascer abaixo de 1000g), no momento do nascimento até a sexta semana de vida, identificou colonização por espécies de *Candida spp*. em 62% das crianças, sendo que aproximadamente 85% da colonização ocorreu nas duas primeiras semanas de vida. A pele e trato gastrointestinal foram os primeiros locais colonizados, seguido do trato respiratório. A colonização foi inversamente proporcional à idade gestacional (KAUFMAN *et al*, 2006).

Estudo multicêntrico prospectivo, realizado em seis UTIs neonatais nos Estados Unidos entre 1993 e 1995, o trato gastrointestinal de 2157 recém-nascidos foi cultivado para pesquisa de colonização por espécies de *Candida spp*. na admissão à UTI e semanalmente até a alta. A prevalência de colonização fúngica encontrada foi de 23%, 14 % e 3% para *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, e outras espécies de *Candida spp.*, respectivamente. A análise de regressão logística revelou que o uso de cefalosporinas de terceira geração foi associado à colonização por *Candida albicans* e *parapsilosis*, o uso de cateter venoso central e a administração intravenosa de lipídios foram fatores de risco para colonização *Candida*

albicans, uso de bloqueadores H_2 representou fator de risco independente para a colonização por *Candida parapsilosis*, sendo o parto cesário fator protetor contra a colonização fúngica (SAIMAN *et al*, 2001).

Além disso, há estudos que demonstram evidências de correlação entre a colonização e a doença invasiva em recém-nascidos de muito baixo peso ao nascer.

Em um estudo prospectivo, encontrou-se uma incidência de colonização fúngica de 26,7% e de 7,7% de doença fúngica sistêmica, em um total de 146 recém-nascidos <1500 g estudados. A colonização foi predominantemente do trato gastrointestinal e respiratório na primeira semana de vida (BALEY *et al*, 1986).

Em um estudo com crianças de muito baixo peso (peso ao nascer abaixo de 1500g), cerca de 27% dos pacientes estavam colonizados com alguma espécie de *Candida spp.*, um terço das quais desenvolveram candidíase mucocutânea e 8% de infecção invasiva por *Candida spp.* (SHERERTZ *et al*, 1992).

Um risco aumentado para candidemia nosocomial foi independentemente associada ao número de sítios de colonização por *Candida spp.* (OR 24,02, IC 95% 1,89) (KAUFMAN, 2006).

O nível de colonização também têm se mostrado um fator importante no desenvolvimento de doença invasiva. Quanto maior a densidade de organismos, mais provável é a chance do organismo penetrar nas barreiras epiteliais, se espalhar para os tecidos subjacentes, e ser difundido através da corrente sanguínea. Em um estudo com 40 recém-nascidos de muito baixo peso, crianças com colonização por *Candida spp.* (definido como um número de colônias maior ou igual a 8×10^6 unidades formadoras de colônias de *Candida spp.*/g de fezes) foram mais propensos a ter intolerância alimentar, sangue nas fezes, e candidemia em comparação àqueles com valores inferiores (PAPPU-KATIKANENI *et al*, 1990). Fatores que promovem o crescimento fúngico no trato gastrointestinal, tais como a utilização de agentes antimicrobianos de amplo espectro, estão associados com um risco aumentado de infecção sistêmica por *Candida spp.*

Dadas as elevadas taxas de morbidade e mortalidade e os custos associados com candidemia na população geral e especialmente na neonatal, a prevenção de infecções por *Candida spp.* seria altamente desejável. Uma das alternativas mais interessantes na UTI neonatal é o uso profilático de fluconazol em recém-nascidos de muito baixo peso para prevenir a candidíase invasiva. A justificativa para esta estratégia é impedir a colonização fúngica nessas crianças de alto risco, com consequente redução de doença invasiva (KAUFMAN *et al*, 2006).

Rastreio sistemático de colonização por *Candida spp.* tem sido sugerido como uma possível ferramenta na prevenção de infecções fúngicas em pacientes de alto risco, favorecendo o uso precoce de profilaxia antifúngica medicamentosa quando a colonização é detectada (KAUFMAN *et al*, 2006).

Em um estudo retrospectivo que obteve culturas de vigilância para *Candida spp.* em 51 recém-nascidos prematuros com ≤ 28 semanas de gestação, 16 crianças desenvolveram a colonização por *Candida spp.* (isto é, fezes ou lavado broncoalveolar / secreções nasofaríngeas). Todos os bebês colonizados desenvolveram infecção por *Candida spp.* no prazo de 24 a 72 horas após a colonização ter sido identificada - 12 com candidemia, dois com candidíase mucocutânea, e dois com pneumonia por *Candida spp.* Apesar de seis crianças com infecções por *Candida spp.* terem morrido, apenas uma morte foi atribuída à infecção fúngica. Trinta e cinco crianças não-colonizadas não desenvolveram infecção por *Candida spp.* e não receberam tratamento antifúngico (KAUFMAN *et al*, 2006).

A profilaxia deve ser abordada de uma forma ampla, e estratégias que diminuam a incidência de colonização e, conseqüentemente, de doença invasiva, têm sido implementadas em vários países, tais como a higienização das mãos dos profissionais de saúde, o manuseio adequado das linhas vasculares, o uso racional de antimicrobianos, o início precoce de dieta enteral, o uso restrito de bloqueadores H₂ e profilaxia medicamentosa com fluconazol endovenoso por seis semanas em recém-nascidos prematuros com peso abaixo de 1.000g nos locais onde a incidência de sepse fúngica é alta (KAUFMAN, 2006).

2.4 Diagnóstico da candidemia neonatal

O tempo entre o diagnóstico e o início da terapia antifúngica parece ser crucial para a sobrevivência do recém-nascido.

Sinais e sintomas de candidemia são inespecíficos. Em geral, os pacientes apresentam febre que persiste mesmo com o uso de antibióticos. Desta forma, o desafio no diagnóstico da infecção reside em identificar pacientes de risco e desenvolver métodos laboratoriais que identifiquem a infecção precocemente, com resultados confiáveis (Alexander *et al*, 2006).

Como em outras causas de sepse neonatal, o atual método padrão-ouro para o diagnóstico de candidemia neonatal é a cultura do sangue. Infelizmente, embora a hemocultura seja sensível para bactérias patogênicas, não é efetiva, como seria necessário, no diagnóstico de infecções fúngicas invasivas (BENJAMIN *et al*, 2000; NG *et al*, 2010).

A partir de estudos realizados em doentes adultos e crianças, a sensibilidade da hemocultura para diagnosticar candidíase invasiva é baixa. Com base em estudos de autópsia,

a sensibilidade da hemocultura para diagnosticar candidíase invasiva é de 29% quando um órgão vital é envolvido, e picos de sensibilidade de 80% são observados quando quatro ou mais órgãos vitais têm invasão documentada por espécies de *Candida spp.* (ZAOUTIS *et al*, 2007).

Sendo assim, a intervenção precoce com tratamento da candidíase invasiva, em populações de alto risco, é necessária para reduzir a morbidade e melhorar a sobrevida. A justificativa para a terapia antifúngica empírica em pacientes de alto risco é o tratamento precoce da doença clinicamente oculta e a prevenção de candidíase disseminada (ZAOUTIS *et al*, 2007).

Não há um modelo bem desenvolvido para terapia antifúngica empírica em recém-nascidos. Terapia antifúngica empírica tem demonstrado reduzir a mortalidade em uma ampla variedade de pacientes imunocomprometidos, e embora exista uma diretriz para terapia antifúngica empírica em crianças com neutropenia, não existe tal modelo para recém-nascidos. Neonatos com candidíase invasiva, não costumam apresentar-se com febre e neutropenia. A apresentação de candidíase neonatal é mais inespecífica, e o desenvolvimento de um protocolo torna-se um desafio. Apesar de não serem neutropênicos, neonatos são considerados imunocomprometidos e a terapia antifúngica empírica na candidemia neonatal tem sido associada a melhores resultados e redução da mortalidade (KAUFMAN *et al*, 2001; KAUFMAN *et al*, 2005; HEALY *et al*, 2005; MANZONI *et al*, 2006).

A detecção precoce da infecção por *Candida spp.* é crucial, porém ainda é problemática. Em recém-nascidos com sepse, a coleta de sangue pode ser difícil e o pequeno volume da amostra obtida pode limitar a sensibilidade da hemocultura. A detecção de candidemia por hemocultura pode demorar 48 horas ou mais, e alguns casos de candidíase sistêmica não são diagnosticados. Como resultado destes obstáculos à detecção da infecção por *Candida spp.* e à elevada morbidade e mortalidade associada ao retardo do tratamento, os recém-nascidos frequentemente são tratados empiricamente com antifúngicos, com consequentes riscos de toxicidade e de emergência de resistência microbiana (JORDAN *et al*, 2010).

Devido ao aumento da incidência de infecções fúngicas em diferentes grupos de pacientes e sua importância em saúde pública, assim como a dificuldade no diagnóstico e sua relevância para introdução de terapia antifúngica adequada, novos métodos diagnósticos estão sendo investigados (CLEMONS *et al*, 1997; PFALLER *et al*, 1995).

A detecção do DNA da *Candida spp.* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) pode proporcionar um diagnóstico rápido e confiável da infecção por *Candida spp.* em pacientes de alto risco (TIRODKER *et al*, 2003; JORDAN *et al*, 2010).

O primeiro relato do emprego da PCR para detecção e identificação de DNA em amostras clínicas, foi publicado em 1990. Em diversas amostras clínicas os resultados da PCR confirmaram as culturas, e houve detecção do DNA da *Candida spp.* em duas amostras com culturas negativas (BUCHMAN *et al*, 1990).

A *multiplex*-PCR (MT-PCR), técnica derivada da PCR clássica onde dois ou mais *loci* são simultaneamente amplificados em uma mesma reação, possibilita a detecção e identificação, ao mesmo tempo, de distintos genes de interesse. Por sua simplicidade e rapidez, tem se mostrado uma boa ferramenta no reconhecimento e diagnóstico de fungos em amostras clínicas (MENDEZ-ALVAREZ e PEREZ-ROTH, 2004). Em um estudo, realizado em 2010, Lau e colaboradores aplicaram MT-PCR em sangue e plasma para detecção de múltiplas espécies de *Candida*. Os autores compararam a hemocultura em relação ao tempo da coleta, ao diagnóstico, a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN), com a MT-PCR, e encontraram que a hemocultura demorava em média oito dias para detecção da espécie, enquanto o da MT-PCR 2,2 dias. Ademais, a MT-PCR demonstrou sensibilidade de 75%, especificidade de 97%, VPP 95% e VPN de 85%.

Outro estudo publicado em 2002, também com *multiplex* PCR para detecção de várias espécies de *Candida spp.*, utilizando diretamente as culturas de fungos como amostra, demonstrou sensibilidade e especificidade de 100% (LUO E MITCHELL, 2002).

Mais recentemente, a técnica de PCR em Tempo Real tem sido utilizada para quantificar o número de cópias de DNA presentes nas amostras clínicas, apresentando potencial para o monitoramento de pacientes sob tratamento. O procedimento automatizado requer menor manipulação das amostras clínicas e dos produtos de amplificação, reduzindo o aparecimento de reações falso-positivas. A sensibilidade elevada dos testes favorece a detecção precoce do patógeno em pacientes com risco para o desenvolvimento da infecção (ERJAVEC E VERWEIJ, 2002).

Em relação à mortalidade neonatal relacionada à infecção tardia em países em desenvolvimento, esta pode ser prevenida com a adoção de intervenções capazes de reduzir sua incidência e o número de óbitos (ANTUNES *et al*, 2004; FILIOTI *et al*, 2007).

Poucos dados existem, no Brasil, em relação às infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva neonatal, menores ainda são as informações em relação às infecções

fúngicas. A investigação da prevalência dessas infecções e a caracterização dos fatores de riscos associados ao desenvolvimento dessas infecções são primordiais tanto no sentido de redução de custos hospitalares quanto de mortalidade.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar a frequência de candidemia diagnosticada por hemocultura e MT-PCR e dos fatores de risco relacionados ao seu desenvolvimento em recém-nascidos internados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal em Recife, Pernambuco, bem como identificar as espécies de *Candida spp.* e seu perfil de susceptibilidade aos antifúngicos.

3.2 Objetivos Específicos

Em recém-nascidos internados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal:

- a) Determinar a frequência de candidemia diagnosticada por hemocultura e MT-PCR;
- b) Determinar os fatores de risco para candidemia diagnosticada por hemocultura e MT-PCR;
- c) Determinar o tempo médio entre o internamento e o aparecimento da candidemia;
- d) Identificar as espécies de *Candida spp.* envolvidas nas infecções fúngicas e sua susceptibilidade aos antifúngicos;

3.3 Objetivo Secundário

Descrever o desfecho (cura ou óbito), da candidemia após 28 dias do término do tratamento antifúngico.

4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo observacional, prospectivo, analítico, tipo coorte onde foram acompanhados recém-nascidos internados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal, avaliando a presença de fatores de risco para candidemia e seu diagnóstico através de hemocultura e MT-PCR convencional.

4.2 População alvo

A população do estudo foi constituída pelos recém-nascidos internados na UTI neonatal do Hospital Agamenon Magalhães (UTI pública de um hospital terciário) em Recife, Pernambuco, constituída por 16 leitos de alta complexidade de 01 de janeiro de 2010 a 31 de dezembro de 2010.

4.3 Critérios de inclusão

Recém-nascidos de ambos os sexos internados na UTI neonatal do Hospital Agamenon Magalhães entre os meses de janeiro e dezembro de 2010.

4.4 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os recém-nascidos que receberam alta da UTI ou foram a óbito com menos de 48h de internamento.

4.5 Definição de termos e variáveis

Definição de termos:

1. Candidemia: definida como presença de sinais e sintomas de infecção e o isolamento de *Candida spp.* em hemocultura de acordo com os critérios da *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) 2009.
2. Sepsis: Para uma infecção ser definida como sepsis confirmada laboratorialmente apresentou **um** dos seguintes critérios:
 - ✓ **Critério 01:** Uma ou mais hemoculturas positivas por microrganismos não contaminantes da pele;
 - ✓ **Critério 02:** Pelo menos um dos seguintes sinais e sintomas sem outra causa não infecciosa reconhecida (discutido com médico assistente do RN): instabilidade térmica; bradicardia; apnéia; intolerância alimentar; piora do

desconforto respiratório; intolerância à glicose; instabilidade hemodinâmica; hipoatividade/letargia.

- ✓ **E:** Microrganismos contaminantes comuns da pele (difteróides, *Propionibacterium sp.*, *Bacillus sp.*, estafilococos coagulase negativo ou micrococcos) cultivados em pelo menos **duas** hemoculturas colhidas em **dois** locais diferentes, com intervalo máximo de 48 horas entre as coletas;

Para uma infecção ser definida como sepse clínica considerou-se **um** dos seguintes critérios (discutido com médico assistente do recém-nascido):

- ✓ **Critério 01 - Pelo menos um** dos seguintes sinais e sintomas sem outra causa reconhecida: instabilidade térmica, apnéia; bradicardia; intolerância alimentar; piora do desconforto respiratório; intolerância à glicose; instabilidade hemodinâmica, hipoatividade/letargia.
 - ✓ **E todos** os seguintes critérios:
 - a) Hemograma com ≥ 3 parâmetros alterados (Rodwell et al. em 1988):
 - leucocitose ou leucopenia (considerar leucocitose ≥ 25.000 ao nascimento ou ≥ 30.000 entre 12 e 24 horas ou acima de $21.000 \geq 48$ horas. Considerar leucopenia ≤ 5.000);
 - neutrofilia ou neutropenia;
 - elevação de neutrófilos imaturos;
 - índice neutrofílico aumentado;
 - razão dos neutrófilos imaturos sobre os segmentados $\geq 0,3$;
 - alterações degenerativas nos neutrófilos com vacuolização e granulação tóxica;
 - plaquetopenia ($\leq 150.000/\text{mm}^3$) e/ou Proteína C Reativa quantitativa alterada (será considerado valor normal do PCR quando menor que 1mg/dl pelos métodos quantitativos);
 - b) Hemocultura não realizada ou negativa;
 - c) Terapia antimicrobiana instituída pelo médico assistente.
- (Definição dos critérios nacionais de infecções relacionadas à assistência à saúde em neonatologia, ANVISA, 2008).

A definição operacional e a categorização das variáveis estão no quadro 1.

Quadro 1. Definição operacional e categorização das variáveis:

Fatores Biológicos	
Idade gestacional	Variável contínua definida através da análise do Capurro, USG do primeiro trimestre ou data da última menstruação.
Sexo	Variável nominal, categorizada em masculino ou feminino.
Peso ao nascer	Variável contínua definida pelo peso em gramas apresentado pelo recém-nascido ao nascer.
Fatores relacionados à realização de procedimentos invasivos	
Presença de acesso venoso central	Definida como presença de acesso venoso central. Categorizada como variável dicotômica em sim ou não.
Número de dias de uso de acesso venoso central	Intervalo de dias em que o recém-nascido esteve com cateter central instalado. Categorizada como variável quantitativa discreta.
Presença de Cateter Central Perifericamente Inserido (PICC)	Definida como presença de PICC. Categorizada como variável dicotômica em sim ou não.
Número de dias de uso de PICC	Intervalo de dias em que o recém-nascido esteve com PICC. Categorizada como variável quantitativa discreta.
Hemotransusão	Definida como a administração de hemoderivados (concentrado de hemácias, concentrado de plaquetas ou plasma fresco). Categorizada como variável dicotômica em sim ou não.
Número de hemotransfusões	Definida como a quantidade de hemotransfusões realizadas pelo recém-nascido. Categorizada como variável quantitativa discreta.
Uso de Nutrição Parenteral Total (NPT)	Definida como uso de NPT. Categorizada como variável nominal dicotômica em sim ou não.
Número de dias de uso de NPT	Intervalo de dias em que o recém-nascido esteve em uso de NPT. Categorizada como variável quantitativa discreta.
Cateterismo umbilical	Definida como uso de cateter umbilical. Categorizada como variável nominal dicotômica em sim ou não.
Número de dias de uso de cateter umbilical	Intervalo de dias em que o recém-nascido esteve em uso de cateter umbilical. Categorizada como variável quantitativa discreta.
Ventilação mecânica	Definida como uso de ventilação mecânica. Categorizada como variável nominal dicotômica em sim ou não.
Número de dias de uso de ventilação mecânica	Intervalo de dias em que o recém-nascido esteve em uso de ventilação mecânica. Categorizada como variável quantitativa discreta.
Cirurgia	Definido como realização de cirurgia cardíaca ou gastrointestinal durante internamento na UTI. Categorizada como variável nominal dicotômica em sim ou não.
Fatores relacionados à infecção	
Tempo de internamento hospitalar	Intervalo de dias em que o recém-nascido esteve internado no hospital.
Tempo de internação em UTI	Intervalo de dias em que o recém-nascido esteve internado em UTI.
Uso de antibiótico	Definido como uso de antibiótico. Categorizada como variável dicotômica em sim ou não.
Indicação do uso de antibiótico	Definido como terapêutico quando o uso do antibiótico é realizado para o tratamento de doença infecciosa e profilático aplica-se ao uso do antibiótico para prevenção de doença infecciosa. Categorizado em terapêutica e profilática.
Uso de cefalosporina	Definido como uso de cefalosporina. Categorizada como variável dicotômica em sim ou não.
Uso de carbapenêmico	Definido como uso de carbapenêmico. Categorizada como variável dicotômica em sim ou não.
Bacteremia	Definido como presença de bactéria em corrente sanguínea comprovada em hemocultura. Categorizada como variável dicotômica em sim ou não.
Deteção de fungo por hemocultura	Colhida a critério do médico assistente do recém-nascido. Categorizada como positiva ou negativa e posteriormente foi discriminado o gênero e espécie isolados.

Susceptibilidade antifúngica	Definido como sensibilidade ou resistência da <i>Candida spp.</i> aos antifúngicos testados segundo protocolo do CLSI (<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>). Categorizada em: Fluconazol sensível ou resistente; Anfotericina B sensível ou resistente; Anidulafungina sensível ou resistente; Voriconazol sensível ou resistente.
Colonização fúngica documentada	Definida como crescimento de espécies de <i>Candida spp.</i> em cultura de vigilância. Categorizada como variável dicotômica em presente ou ausente.
Deteção de fungo por <i>multiplex PCR</i>	Colhida ao diagnóstico de sepse, categorizada como positiva ou negativa, e discriminado o gênero e espécies detectados.
Plaquetopenia	Definida quando número de plaquetas menor < 150.000/ μ L no dia da coleta da hemocultura ou MT-PCR. Categorizada como variável dicotômica em sim ou não.
Fatores relacionados ao tratamento e desfecho da candidíase	
Uso de antifúngico	Definido como uso de antifúngico. Categorizada como variável dicotômica em sim ou não.
Indicação do uso de antifúngico	Definido como terapêutico quando o uso do antifúngico é realizado para o tratamento de infecção fúngica e profilático aplica-se ao uso do antifúngico para prevenção de infecção fúngica. Categorizado em terapêutico ou profilático.
Desfecho do episódio de candidíase invasiva	Definida como situação clínica do recém-nascido após 28 dias do término do tratamento antifúngico. Categorizada em cura, recidiva, óbito.
Fatores relacionados à mãe	
Vulvovaginite Fúngica	Definida como infecção do trato genital feminino inferior de etiologia fúngica presente no momento do parto. Categorizada como variável dicotômica em sim ou não.
Infecção do Trato Urinário	Definida como processo infeccioso bacteriano ou fúngico do trato urinário presente durante a gestação ou no momento do parto. Categorizada como variável dicotômica em sim ou não.
Corioamnionite	Definida como processo infeccioso das membranas extraplacentárias, placa coriônica da placenta e cordão umbilical. Categorizada como variável dicotômica em sim ou não.

4.6 Métodos de coleta e processamento de dados

A coleta de dados foi realizada após o responsável legal pelo recém-nascido ter sido esclarecido dos objetivos da pesquisa e ter assinado o termo de consentimento livre e esclarecido. Os dados foram coletados diariamente através do preenchimento de um questionário padronizado com informações pessoais e clínico-epidemiológicas e por consulta em prontuário clínico diariamente. Posteriormente, durante coleta de hemocultura, na rotina do serviço, eram coletadas amostras de sangue para realização do MT-PCR.

4.7 Qualidade dos instrumentos de medida e padronização das técnicas

4.7.1 Amostras de sangue para realização de hemocultura

A solicitação de hemoculturas, sua coleta, processamento do material e identificação das espécies, seguiu a rotina do laboratório de microbiologia do hospital. Os resultados dos exames foram resgatados do laboratório do hospital.

As hemoculturas dos recém-nascidos internados na UTI neonatal foram realizadas rotineiramente pelo laboratório de microbiologia do Hospital Agamenon Magalhães. De um a três mililitros de sangue foram coletados por paciente e, no laboratório de microbiologia, mantidos no equipamento automatizado Bactec®. Ao se detectar positividade, o material era semeado em meios específicos. A identificação das espécies de bactérias isoladas foi realizada pelo equipamento Phoenix 100. As amostras de *Candida spp.* foram encaminhadas ao laboratório de micologia da Universidade Federal de Pernambuco para identificação da espécie e realização da susceptibilidade antifúngica.

4.7.2 Amostras de cultura de vigilância

Foram realizadas semanalmente coleta de culturas de vigilância por *swabs* de diferentes sítios (cavidade oral, região anal/periretal, pele/região inguinal e região do sítio de inserção do cateter venoso central).

As amostras foram obtidas por aplicação do *swab* estéril umedecido com soro fisiológico 0,9% e posto em seguida em meio de transporte e enviado imediatamente ao laboratório de microbiologia do Hospital Agamenon Magalhães. Para realização das culturas foi utilizada metodologia manual e automatizada de acordo com as normas do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). As amostras de *Candida spp.* foram encaminhadas ao laboratório de micologia da Universidade Federal de Pernambuco para realização da susceptibilidade antifúngica.

4.7.3 Susceptibilidade antifúngica *in vitro*

Os testes de susceptibilidade *in vitro* foram realizados segundo o método de microdiluição em caldo, de acordo com a padronização publicada no documento M27-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008).

No ensaio foram incluídas linhagens do American Type Culture Collection (ATCC), recomendadas pelo método, foram utilizadas: *Candida krusei* ATCC 6528, *C. parapsilosis* ATCC 22019 (NCCLS, 2002).

4.7.4 Amostras de sangue para amplificações por PCR

Estas amostras foram obtidas por coleta de 1 ml de sangue em tubo contendo EDTA (*ethylenediamine tetraacetic acid*), no mesmo momento da coleta da hemocultura. Foi colhida uma amostra por recém-nascido, por episódio de sepse, e encaminhada ao laboratório de

biologia molecular do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), onde foram realizados os testes moleculares.

4.7.5 Extração de dna genômico nas amostras de sangue

Amostras de 0,3-0,5 ml de sangue periférico foi submetido a lise celular com 700 µl do reagente DNAzol BD (Invitrogen, São Paulo, Brasil), e a precipitação de DNA com 200 µl de Isopropanol 100% em temperatura ambiente por 5 minutos. O precipitado obtido com centrifugação a 6.000 rpm por 6 minutos foi lavado com etanol 75% e, após rápida secagem, foi ressuspenso em 250 µl de água DEPC e submetido à purificação do DNA visando à remoção de inibidores da reação presentes no sangue. A purificação consistiu em adicionar um volume da solução de igual partes de fenol-clorofórmio, homogeneizar no vórtex e centrifugar por 5 minutos a 12.000 rpm em microcentrífuga. Em seguida o sobrenadante foi retirado para um microtubo limpo e foi adicionado um volume de clorofórmio e submetido a nova centrifugação como citado. O DNA genômico é precipitado com a adição de 3 M NaCl em um volume correspondente a 1/10 do volume do sobrenadante acrescidos de 2 volumes de 100% ETOH permanecendo cerca de 18 h em -20°C. Após a centrifugação a 12.000 rpm, a 4°C, o precipitado de DNA é lavado com álcool 70 %, seco e ressuspendido em 30 µl de água DEPC.

4.7.6 Diagnóstico molecular de infecção fúngica

A detecção molecular da infecção fúngica consistiu em três etapas. A primeira etapa foi submeter à amostra a uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação do gene humano constitutivo *gpdH* visando confirmar a qualidade da amostra nos casos do teste negativo. Na segunda etapa, a amostra foi avaliada quanto à presença de elemento genético de fungo que consiste em sequência conservada da região intercalante do gene ribossomal chamada de ITS. A última etapa só foi realizada nas amostras positivas para o ITS e consistem na amplificação do gene ribossomal das espécies fúngicas mais frequentes na infecção relacionada à assistência à saúde. Nessa etapa, as amostras foram submetidas a duas reações de PCR multiplex com inicializadores específicos para a identificação das espécies *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* na multiplex 1, e para as espécies de *Aspergillus spp*, *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* na multiplex 2.

A reação de amplificação do gene constitutivo foi preparado com 100 ng de DNA, 25 pmol de cada inicializador, 1,76 mM MgCl₂, 0,45 mM de dNTPs, 1x tampão e 1,0U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) num volume total de 25 µL. A amplificação por PCR foi

executada no termociclador Mastercycler, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) utilizando o programa de ciclagem formulado em 5 minutos para desnaturação inicial a 94°C, seguido de 40 ciclos de 1 minuto a 94°C para desnaturação, 1 minuto a 62°C para anelamento dos inicializadores, e 1 minuto a 72°C para extensão; ao final foi adicionado um ciclo de 7 minutos a 72°C.

A reação de amplificação da sequência ITS foi preparada com 100ng de DNA, 25 pmol de cada inicializador, 1,5 mM MgCl₂, 0,3 mM de dNTPs, 1x tampão e 1,0 U *Taq* DNA polimerase em um volume total de 25 µL. A amplificação por PCR foi executada no termociclador Mastercycler Eppendorf utilizando o mesmo programa de ciclagem citado acima. As PCR Multiplex foram feitas com as concentrações e condições acima citadas e a lista de inicializadores utilizados está descrita no quadro abaixo.

Quadro 2. Sequência dos inicializadores utilizados no diagnóstico molecular da infecção fúngica.

Alvo	Inicializadores
gpdH (gene humano)	5' GTCTCCACCACCATGGAGAAGGCT 5' CATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCA
ITS (sequência fúngica)	5' TCCCTAGGGTGAAGTGGG 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC
rDNA <i>Aspergillus fumigatus</i>	5'CGCCGAAGACCCCAACATGAACGC 5'TAAAGTTGGGTGTCGGCTGGC
rDNA <i>Candida albicans</i>	5'TTTATCAACTTGTCACACCAGA 5'ATCCCGCCTTACCACTACCG
rDNA <i>Candida glabrata</i>	5'TTATCACACGACTCGACACT 5'CCCACATACTGATATGGCCTACAA
rDNA <i>Candida tropicalis</i>	5'CAATCCTACCGCCAGAGGTTAT 5'TGGCCACTAGCAAAATAAGCGT
rDNA <i>Candida parapsilosis</i>	5'GCCAGAGATTAACTCAACCAA 5'CCTATCCATTAGTTTATACTCCGC
rDNA <i>Cryptococcus neoformans</i>	5'ATCACCTTCCCACTAACACATT 5'GAAGGGCATGCCTGTTTGAGAG

4.8. Processamento e análise dos dados

Para cálculos estatísticos foram utilizados os programas SPSS Statistics 17.0® para Microsoft Windows® e R versão 2.9.0.

As variáveis qualitativas foram expressas por frequências absolutas e relativas. As variáveis quantitativas foram expressas por média e desvio padrão. Foi utilizado o teste qui-quadrado para verificar possível diferença entre frequências das variáveis. Foi utilizado o teste t-Student para amostras independentes para verificar possível diferença em média das variáveis. Para as variáveis que apresentaram associação no teste Qui-quadrado, foi determinado a OR (*Odds Ratio*) e o intervalo de confiança para *Odds*. Em todas as análises foi utilizado o nível de significância de 5%.

4.9. Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco – CEP/CCS/UFPE (Parecer final nº 349/2009, anexo A).

O responsável legal por cada recém-nascido assinou consentimento livre e esclarecido (Apêndice A), de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, após ser assegurado da total confidencialidade das informações captadas durante o estudo e, da garantia do uso dos resultados exclusivamente para fins científicos e responderam a entrevista padronizada (Apêndice B).

Os dados serão armazenados pelo pesquisador por pelo menos cinco anos para eventual comprovação.

5 RESULTADOS

Fatores de risco e diagnóstico de candidemia por hemocultura e reação em cadeia da polimerase *multiplex* (MT-PCR) em recém-nascidos internados em unidade de terapia intensiva neonatal♦

Risk factors and diagnosis of candidemia by blood culture and polymerase chain reaction multiplex (MT-PCR) in newborn infants admitted to neonatal intensive care unit.

Moacir Batista Jucá

♦ Artigo no formato para a Revista Pediatric Critical Care Medicine

RESUMO

Objetivo: Determinar a prevalência de candidemia diagnosticada por hemocultura e MT-PCR em recém-nascidos internados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal, bem como identificar as espécies e seu perfil de susceptibilidade aos antifúngicos e descrever os fatores de risco relacionados ao seu desenvolvimento.

Desenho: Estudo descritivo, prospectivo, observacional.

Local: UTI neonatal de um hospital público.

Pacientes: Todos os recém-nascidos internados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal com mais de 48 horas de internamento.

Intervenções: Foi avaliada a presença de fatores de risco para candidemia e culturas de vigilância para *Candida spp.* foram realizadas semanalmente. Nos pacientes com suspeita de sepse, hemoculturas e MT-PCR foram coletadas.

Medições e Principais Resultados: Foram acompanhados 205 recém-nascidos. Trinta e sete (18,0%) dos pacientes foram a óbito ao final do estudo. Sepse foi observada em 68(33,2%) dos recém-nascidos, e sepse documentada laboratorialmente ocorreu em 38(18,5%). Onze pacientes apresentaram candidemia (5,4%) e a MT-PCR foi positiva para *Candida spp.* em 24(11,7%). Após 28 dias do término do tratamento, dos onze pacientes que apresentaram candidemia comprovada, cinco (45,5%) foram a óbito. A *Candida parapsilosis* foi a espécie mais isolada nas hemoculturas (63,6%). Em relação à MT-PCR, a *Candida glabrata* foi a mais prevalente (41,7%). Na avaliação do antifungigrama, todas as amostras de *Candida* foram sensíveis a anfotericina B e 90,9% foram sensíveis ao fluconazol. Na análise dos fatores de risco, nos pacientes que evoluíram com candidemia e naqueles com MT-PCR positiva para *Candida spp.*, observou-se maior frequência e maior tempo de uso dos procedimentos de risco quando comparados à população geral.

Conclusões: Como os marcadores laboratoriais são inespecíficos para o diagnóstico, a associação dos dois métodos permitiu a identificação de um maior número de casos de candidemia.

Palavras-chave: Candidemia; Recém-nascido; Fatores de risco; Sepse neonatal; Unidade de Terapia Intensiva Neonatal; Reação em cadeia da polimerase.

ABSTRACT

Objective: To determine the prevalence of candidemia diagnosed by blood culture and MT-PCR in newborn infants admitted to a neonatal intensive care unit, as well as to identify the species and its susceptibility profile to antifungals and describe the risk factors involved in development.

Design: An observational, prospective and analytical study.

Location: Neonatal intensive care unit of a public hospital in the northeast region, Brazil.

Patients: All newborns admitted to the Neonatal Intensive Care Unit with more than 48 hours of admission.

Interventions: It was evaluated the presence of risk factors for candidemia and surveillance cultures for *Candida* were performed weekly. Blood cultures and MT-PCR were collected in patients with suspected sepsis.

Measurements and Main Results: Two hundred five newborns were analyzed. Thirty-seven (18%) patients died during the study. Sepsis was observed in 68 (33.2%) of newborns, and laboratory-documented sepsis occurred in 38 (18.5%). Eleven patients had candidemia (5.4%) and MT-PCR was positive for *Candida* in 24 (11.7%). After 28 days of the end of the treatment, 11 patients with proven candidemia, five (45.5%) died. *Candida parapsilosis* was the species most isolated in blood cultures (63.6%). Regarding MT-PCR, *Candida glabrata* was the most prevalent (41.7%). In assessing the antifungigrama, all samples of *Candida* were susceptible to amphotericin B and 90.9% were susceptible to fluconazole. In the analysis of risk factors in patients who developed candidemia, and those with MT-PCR positive for *Candida*, it was observed more frequently and longer use of the procedures of risk when compared to the general population.

Conclusions: As laboratory markers are not specific for the diagnosis, the association of the two methods allowed the identification of a greater number of cases of candidemia.

Keywords: Candidemia; Newborn Risk factors, neonatal sepsis, Neonatal Intensive Care Unit; polymerase chain reaction.

INTRODUÇÃO

Óbitos de crianças no período neonatal representam mais de um terço da taxa global de mortalidade infantil. As infecções constituem a principal causa de óbitos de recém-nascidos nos países em desenvolvimento (CAREY, 2008).

Em recém-nascidos, os sinais e sintomas, bem como os marcadores laboratoriais de sepse são inespecíficos, sendo importante para o médico usar uma combinação de variáveis para aumentar o valor preditivo do diagnóstico precoce. Vários sinais e sintomas podem ser usados como critérios sugestivos de sepse, entre eles a instabilidade térmica, as alterações de frequência cardíaca e respiratória associadas à gemência e tiragens, a letargia, a intolerância alimentar, as alterações de perfusão tissular e dentre as variáveis laboratoriais a presença de leucocitose ou leucopenia, trombocitopenia, elevação da proteína C reativa e alterações de interleucinas são marcadores da sepse (EL BESHAWY, 2010).

Espécies de *Candida spp.* são a principal causa de infecção fúngica invasiva na unidade de cuidados intensivos neonatal, e representam o terceiro microrganismo mais comumente isolado em hemocultura recuperados nos casos de sepse de início tardio (DOTIS et al., 2005; COLOMBO et al., 2006). Candidemia neonatal é associada com significativa morbidade e mortalidade. A mortalidade bruta nesse grupo de pacientes varia entre 15 e 59% (ROILIDES et al., 2004; RODRIGUEZ et al., 2006).

A incidência de infecções por *Candida spp.* é maior em recém-nascidos de muito baixo peso, abaixo de 1000 g como demonstrado por um estudo de vigilância do *Nosocomial National Infections system* (NNIS), que incluiu 130.523 pacientes internados em 128 UTIs neonatais entre 1995 e 2004. A taxa global de infecções da corrente sanguínea por *Candida spp.* foi de 1,53 por 1000 pacientes-dia entre os recém-nascidos admitidos na UTI neonatal (FRIDKIN et al., 2006).

As espécies de *Candida spp.* têm se modificado, com o isolamento cada vez mais frequente de espécies não-albicans em recém-nascidos (KOSSOFF; BUESCHER; KARLOWICZ, 1998; MIRANDA et al., 2009; AL-SWEIH et al., 2009). Infecções neonatais causadas por espécies não-albicans ocorrem numa idade mais avançada e têm maior probabilidade de serem originais a partir do ambiente hospitalar (SAIMAN et al., 2001; FAIRCHILD et al., 2002). Enquanto a *Candida albicans* ainda ocupa o primeiro lugar e é a mais prevalente, a *Candida parapsilosis* é a segunda espécie mais comumente isolada, representando um quarto a um terço das candidemias (FRIDKIN et al., 2006).

Muitos fatores de risco específicos para candidemia pré, peri e pós-natais foram identificados em pacientes na UTI neonatal tais como a estrutura imatura da pele, uso prolongado de antibióticos, notadamente cefalosporinas de terceira geração e carbapenêmicos, procedimentos invasivos, uso de cateteres vasculares, nutrição parenteral, ventilação mecânica, uso de corticóide sistêmico, prematuridade, baixo peso ao nascer, apgar menor que 3 nos primeiros cinco minutos após o nascimento, cirurgias do trato gastrointestinal e colonização fúngica preexistente (SAIMAN et al., 2001).

Como em outras causas de sepse neonatal, o atual método padrão-ouro para o diagnóstico de candidemia neonatal é a cultura do sangue. Infelizmente, embora a hemocultura seja sensível para bactérias patogênicas, não é efetiva, como seria necessário, no diagnóstico de infecções fúngicas invasivas (BENJAMIN et al., 2000; NG; LAM, 2010).

Devido ao aumento da incidência de infecções fúngicas em diferentes grupos de pacientes e sua importância em saúde pública, assim como a dificuldade no diagnóstico e sua relevância para introdução de terapia antifúngica adequada, os métodos diagnósticos estão se aprimorando continuamente procurando melhor especificidade, sensibilidade e acurácia (PFALLER, 1995; CLEMONS et al., 1997).

A detecção do DNA da *Candida spp.* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) pode proporcionar um diagnóstico rápido e confiável da infecção em pacientes de alto risco (TIRODKER, 2003; JORDAN, 2010).

A PCR *multiplex* (MT-PCR) é uma técnica derivada da PCR clássica onde dois ou mais *loci* são simultaneamente amplificados em uma mesma reação, o que possibilita a detecção e identificação, ao mesmo tempo, de distintos genes de interesse. Por sua simplicidade e rapidez, tem se mostrado uma boa ferramenta no reconhecimento e diagnóstico de fungos em amostras clínicas (MÉNDEZ-ÁLVAREZ; PÉREZ-RPTH, 2004).

Apesar do risco elevado para candidemia, o seu diagnóstico em recém-nascidos é falho, visto que depende da positividade das hemoculturas que, além de serem pouco acessíveis, apresentam a dificuldade da coleta de sangue em relação ao acesso e volume retirado. Assim, os diagnósticos são muitas vezes presuntivos/preemptivos e tardios. A utilização do tratamento profilático e preemptivo, não são em si ruins, entretanto, a falta de conhecimento da espécie de *Candida spp.*, do seu perfil de sensibilidade antifúngica e a falta de confirmação do diagnóstico, dificultam a melhor escolha terapêutica, tempo de terapia e aumentam o risco de morte.

A dificuldade do diagnóstico em populações de risco é uma lacuna que a literatura médica tenta resolver e um dos caminhos é a detecção da *Candida spp.* e sua espécie em

amostras de sangue através da PCR. Por isso realizamos o presente estudo, utilizando a hemocultura e PCR multiplex com o objetivo de identificar os episódios de candidemia.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho e local: Foi realizado um estudo observacional, prospectivo, analítico, tipo coorte em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal de Hospital público no nordeste do Brasil, no período de 01 de janeiro de 2010 a 31 de dezembro de 2010.

População do estudo: Foi constituída pelos recém-nascidos de ambos os sexos internados na UTI neonatal entre os meses de janeiro e dezembro de 2010 dos quais foi obtida autorização dos responsáveis através de assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido para o estudo. Foram excluídos os recém-nascidos que receberam alta da UTI ou foram a óbito com menos de 48h de internamento.

Coleta de dados: Os dados foram coletados diariamente através do preenchimento de um questionário padronizado com informações pessoais e clínico-epidemiológicas e por consulta em prontuário clínico. Posteriormente, durante coleta de hemocultura, na rotina do serviço, eram coletadas amostras de sangue para realização do MT-PCR. Semanalmente, foram realizadas coleta de culturas de vigilância por swabs de diferentes sítios (cavidade oral, região anal/periretal, pele/região inguinal e região do sítio de inserção do cateter venoso central) e o acompanhamento foi realizado até 28 dias após a alta da UTI.

Métodos microbiológicos: As hemoculturas foram realizadas de acordo com a rotina do serviço. De um a três mililitros de sangue foram coletados por paciente e, no laboratório de microbiologia, mantidos no equipamento automatizado Bactec®. Ao se detectar positividade, o material era semeado em meios específicos. A identificação das espécies de bactérias isoladas foi realizada pelo equipamento Phoenix 100. As amostras de *Candida spp.* foram encaminhadas ao laboratório de micologia para identificação da espécie e realização da susceptibilidade antifúngica. As culturas de vigilância foram obtidas por aplicação do swab estéril umedecido com soro fisiológico 0,9% e posto em seguida em meio de transporte e enviado ao laboratório de microbiologia. Foi utilizada metodologia manual e automatizada de acordo com as normas do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). As amostras de *Candida spp.* foram encaminhadas ao laboratório de micologia para realização da susceptibilidade antifúngica. Os testes de susceptibilidade *in vitro* foram realizados segundo o método de microdiluição em caldo, de acordo com a padronização publicada no documento M27-A3 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008).

Método molecular: As amostras foram obtidas por coleta de 1 ml de sangue no mesmo momento da coleta da hemocultura. Foi colhida uma amostra por recém-nascido, por episódio de sepse. A detecção molecular da infecção fúngica consistiu em três etapas. A primeira etapa foi submeter a amostra a uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação do gene humano constitutivo *gpdH* visando confirmar a qualidade da amostra nos casos do teste negativo. Na segunda etapa, a amostra foi avaliada quanto à presença de elemento genético de fungo que consiste em sequência conservada da região intercalante do gene ribossomal chamada de ITS. A última etapa, só realizada nas amostras positivas para o ITS, consistiu na amplificação do gene ribossomal das espécies fúngicas. A extração e diagnóstico molecular foi realizado de acordo com Luo e Mitchell (2002). A lista de iniciadores utilizados está descrita no quadro 1.

Quadro 1. Sequência dos inicializadores utilizados no diagnóstico molecular da infecção fúngica.

Alvo	Inicializadores
<i>gpdH</i> (gene humano)	5' GTCTCCACCACCATGGAGAAGGCT 5' CATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCA
ITS (sequência fúngica)	5' TCCCTAGGGTGAAGTGC GG 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC
rDNA <i>Aspergillus fumigatus</i>	5'CGCCGAAGACCCCAACATGAACGC 5'TAAAGTTGGGTGTCGGCTGGC
rDNA <i>Candida albicans</i>	5'TTTATCAACTTGTCACACCAGA 5'ATCCCGCCTTACCACTACCG
rDNA <i>Candida glabrata</i>	5'TTATCACACGACTCGACACT 5'CCCACATACTGATATGGCCTACAA
rDNA <i>Candida tropicalis</i>	5'CAATCCTACCGCCAGAGGTTAT 5'TGGCCACTAGCAAAATAAGCGT
rDNA <i>Candida parapsilosis</i>	5'GCCAGAGATTAAACTCAACCAA 5'CCTATCCATTAGTTTATACTCCGC
rDNA <i>Cryptococcus neoformans</i>	5'ATCACCTTCCCACTAACACATT 5'GAAGGGCATGCCTGTTTGAGAG

Definições: Candidemia foi definida como presença de sinais e sintomas de infecção e isolamento de *Candida spp.* em hemocultura de acordo com os critérios da *Infectious*

Diseases Society of America (IDSA) (PAPPAS et al., 2009). Sepses foi definida como sepsis confirmada laboratorialmente e sepsis clínica de acordo com a definição dos critérios nacionais de infecções relacionadas à assistência à saúde em neonatologia (ANVISA, 2008).

Análise estatística: Para cálculos estatísticos foram utilizados os programas SPSS Statistics 17.0® para Microsoft Windows® e R versão 2.9.0. As variáveis qualitativas foram expressas por frequências absolutas e relativas. As variáveis quantitativas foram expressas por média e desvio padrão. Foi utilizado o teste qui-quadrado para verificar possível diferença entre frequências das variáveis. Foi utilizado o teste t-Student para amostras independentes para verificar possível diferença em média das variáveis. Para as variáveis que apresentaram associação no teste Qui-quadrado, foi determinado a OR (*Odds Ratio*) e o intervalo de confiança para *Odds*. Em todas as análises foi utilizado o nível de significância de 5%.

Considerações éticas: O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (nº 349/09) e o responsável legal por cada recém-nascido assinou consentimento livre e informado após ser assegurado da total confidencialidade das informações captadas durante o estudo e, da garantia do uso dos resultados exclusivamente para fins científicos.

RESULTADOS

No período de 01 de janeiro a 31 de dezembro de 2010 foram internados 232 recém-nascidos na UTI neonatal. Vinte e sete (11,6%) foram excluídos do estudo por apresentarem tempo de internamento na UTI menor de 48 horas. Restaram 205 recém-nascidos que constituíram a população do presente estudo. Cento e doze (54,6%) eram do sexo masculino. Deste total 168(82%) receberam alta e 37(18%) dos pacientes foram a óbito ao final do estudo.

Sepses foi observada em 68(33,2%) dos recém-nascidos, e sepsis documentada laboratorialmente ocorreu em 38(18,5%). A mortalidade entre os pacientes com sepsis foi de 30,9% (21 pacientes). Onze pacientes apresentaram candidemia (5,4%) e a MT-PCR foi positiva para *Candida spp.* em 24(11,7%). A incidência de candidemia no período de estudo foi de 2,55 por 1000 pacientes-dia.

Dentre as 169 hemoculturas colhidas, 60(36,5%) foram positivas. Em 11(6,5%) culturas, foi identificado *Candida spp.*

O *Staphylococcus coagulase negativa* foi o principal patógeno isolado nas hemoculturas e a *Candida spp.* foi o terceiro microrganismo mais frequente. Tabela 1.

Tabela 1. Microrganismos identificados em 60 hemoculturas de recém-nascidos internados em unidade de terapia intensiva neonatal.

Microrganismos	n	%
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	27	45,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ¹	14	23,3
<i>Serratia marcescens</i>	4	6,7
<i>Enterococcus spp</i>	2	3,3
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	1,7
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	1,7
<i>Candida parapsilosis</i> ²	7	11,6
<i>Candida albicans</i>	4	6,7
<i>Candida glabrata</i> ²	1	1,7

¹ *Klebsiella pneumoniae* ESBL foi isolada em oito amostras.

² Em um recém-nascido foram isoladas *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata* em uma mesma hemocultura.

Na avaliação do antifungigrama, todas as amostras de *Candida spp.* foram sensíveis a anfotericina B, dez amostras (90,9%) foram sensíveis ao fluconazol, nove amostras (81,8%) foram sensíveis a anidulafungina e sete amostras (63,6%) foram sensíveis ao voriconazol.

A média do número de dias de internamento para diagnóstico de bacteremia foi de $18,3 \pm 1,9$ dias e para o diagnóstico de candidemia foi de $20,5 \pm 3,1$ dias.

Em relação ao desfecho, após 28 dias do término do tratamento, dos onze pacientes que apresentaram candidemia comprovada, seis (54,5%) evoluíram para cura e cinco (45,5%) foram a óbito. A *Candida parapsilosis* foi a espécie identificada em três (60%) dos óbitos e a *Candida albicans* em dois (40%).

Na análise dos procedimentos de risco, observou-se que os pacientes que evoluíram com candidemia e os que apresentaram MT-PCR positiva para *Candida spp.* apresentaram maior frequência e maior tempo de uso dos procedimentos comparados à população geral. A frequência e a média de tempo de utilização dos procedimentos invasivos dos pacientes com candidemia e MT-PCR positiva comparadas à população geral estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Fatores de risco para candidemia em pacientes internados em unidade de terapia intensiva neonatal com diagnóstico de candidemia e em recém-nascidos com MT-PCR positiva para *Candida spp.*

Procedimentos invasivos	População Geral (n=205)	RN com Candidemia (n=11)	RN com MT-PCR positiva (n=24)
Uso de cateter umbilical	76,6%	100,0%	100,0%
Tempo de cateter umbilical em dias (média $\pm$ DP)	7,9 $\pm$ 3,2 dias	7,9 $\pm$ 1,5 dias	8,1 $\pm$ 0,8 dias
Hemotransfusão	30,2%	90,9%	87,5%
Uso de ventilação mecânica em dias (média $\pm$ DP)	56,6%	81,8%	91,7%
Tempo de ventilação mecânica (média $\pm$ DP)	6,2 $\pm$ 0,8 dias	21,7 $\pm$ 6,1 dias	20,3 $\pm$ 4,2 dias
Uso de PICC	28,8%	36,4%	37,5%
Tempo de PICC em dias (média $\pm$ DP)	16,7 $\pm$ 1,9 dias	43,5 $\pm$ 12,1 dias	25,7 $\pm$ 7,3 dias
Uso de CVC	26,8%	63,6%	45,8%
Tempo de CVC em dias (média $\pm$ DP)	22,7 $\pm$ 2,7 dias	28,1 $\pm$ 5,4 dias	42,6 $\pm$ 9,5 dias
Uso de NPT	66,3%	100,0%	95,8%
Tempo de NPT em dias (média $\pm$ DP)	15,2 $\pm$ 1,2 dias	27,9 $\pm$ 5,2 dias	25,0 $\pm$ 3,7 dias
Cirurgia cardíaca e cirurgia gastrointestinal	8,3%	27,3%	25,0%

A plaquetopenia foi observada em 37(18%) casos. A média de dias de internamento para surgimento de plaquetopenia foi de 15,6 $\pm$ 1,9 dias.

O uso de antibiótico foi constatado em 184(89,8%) pacientes. A média do tempo de antibiótico foi de 16,4 $\pm$ 1,1 dias. A média do número de antibióticos foi de 3,1 $\pm$ 0,1.

Antifúngico foi utilizado em 24 (11,7%) pacientes. Vinte e quatro (11,7%) fizeram uso de fluconazol e quatro (2,0%) dos pacientes utilizaram anfotericina B.

A média do tempo de uso de antifúngico foi de 18,2 $\pm$ 0,5 dias. Em 79(38,5%) pacientes foi utilizado cefalosporina e o carbapenêmico foi utilizado em 41(20%) dos pacientes.

Quanto à colonização, foi avaliada em 116 (56,6%) pacientes. Em 35(30,2%), foi identificada colonização por bactérias multirresistentes. A média do número de dias para identificação de colonização por bactéria multirresistente foi de 19,7 $\pm$ 2,7 dias.

A colonização por *Candida spp.* foi constatada em 34 (29,3%) recém-nascidos. A média do número de dias para identificação de colonização por *Candida spp.* foi de 23,8 $\pm$ 4,1

dias. A média do número de dias de uso de antibióticos antes da identificação de colonização por *Candida spp.* foi de $17,0 \pm 2,1$ dias. Em relação aos pacientes com candidemia, a média do número de dias de internamento para identificação de colonização por bactéria multirresistente foi de $29,7 \pm 12,9$ dias, enquanto para colonização por *Candida spp.* foi de $18,3 \pm 5,4$ dias.

As espécies de *Candida spp.* isoladas na colonização foram: *Candida albicans* 21 (43,8%), *Candida parapsilosis* 18(37,5%), *Candida glabrata* seis (12,5%) e *Candida tropicalis* três (6,2%). Os sítios de colonização por *Candida spp.* foram: em 23(67,4%) oral, 20(58,8%) na pele, três (8,8%) se deram no sítio de inserção do cateter venoso central e dois (5,9%) retal. Quando se avaliou as espécies de *Candida spp.* isoladas nos sítios de colonização, em região oral observou-se *Candida albicans* em 14 (60,9%), *Candida parapsilosis* em quatro (17,4%), *Candida glabrata* três (13%) e *Candida tropicalis* em dois (8,7%) dos isolados. Na pele, identificou-se *Candida parapsilosis* em 11 (55%), *Candida albicans* em cinco (25,0%), *Candida glabrata* em três (15%) e *Candida tropicalis* em um (5,0%). No sítio de inserção do cateter venoso central, a *Candida parapsilosis* foi identificada em três (100%) dos casos e no sítio retal, a *Candida albicans* esteve presente em dois (100%) dos isolados.

Entre os pacientes que evoluíram com candidemia, oito (72,7%) foram avaliados quanto à presença de colonização por *Candida spp.* Nestes pacientes a colonização foi identificada em quatro (50%). Destes, dois (50%) a colonização foi identificada na pele, um (25%) em região oral e um (25%) no sítio de inserção do cateter venoso central. Nestes, a *Candida albicans* foi isolada na região oral e a *Candida parapsilosis* na pele e no sítio de inserção do cateter venoso central. Ao se comparar as amostras colonizantes e as isoladas em hemoculturas, observou-se concordância entre as espécies de *Candida spp.* em três pacientes (75,0%). Apenas um paciente apresentou hemocultura com *Candida albicans* e a espécie identificada na colonização da pele foi *Candida parapsilosis*.

Entre os 34 pacientes colonizados por *Candida spp.*, 33(97,1%) apresentaram amostras sensíveis a fluconazol e apenas um (2,9%) paciente apresentou amostra resistente a fluconazol (*Candida glabrata*).

Tabela 3. Tempo de exposição aos fatores de risco dos pacientes com candidemia comparados aos pacientes sem candidemia.

Fatores de risco	Candidemia (Média±dp)		Valor p
	Sim (n=11)	Não (n=194)	
Tempo de internamento na UTI	41,2±7,1	19,6±1,7	0,004
Tempo de internamento no hospital	51,5±7,2	40,1±2,2	0,224
Idade gestacional	29,8±1,1	31,6±0,2	0,094
Peso ao nascer	1241,1±175,7	1615,4±57,2	0,127
Tempo de uso de antibiótico	36,6±5,6	15,2±1,1	<0,0001
Tempo de uso de cateter umbilical	7,9±1,5	5,9±0,3	0,245
Tempo de uso de CVC	28,1±5,4	21,9±1,0	0,460
Tempo de uso de VMA	21,7±6,1	5,6±0,8	0,022
Tempo de uso de PICC	43,5±12,1	4,1±0,7	0,001
Tempo de uso de NPT	27,9±5,2	9,1±0,8	0,001
Tempo de internação para colonização por <i>Candida spp.</i>	18,3±5,4	25,1±3,2	0,983

Tabela 4. Distribuição dos fatores de risco em relação aos pacientes infectados ou não por *Candida spp.*

Fatores de risco	Candidemia				OR	IC	Valor p
	n	Sim %	n	Não %			
Sexo							
Masculino	7	6,3	105	93,7	-	-	0,538
Feminino	4	4,3	89	95,7	-	-	
Corioamnionite							
Sim	2	14,3	12	85,7	3,34	0,32-19,0	0,001
Não	9	4,7	182	95,3	-	-	
Cateter umbilical							
Sim	11	7,0	146	93,0	-	-	0,059
Não	0	0,0	48	100,0	-	-	
Hemotransusão							
Sim	10	16,1	52	83,9	26,87	3,66-1185,66	<0,0001
Não	1	0,7	142	99,7	-	-	
VMA							
Sim	9	7,8	107	92,2	-	-	0,083
Não	2	2,2	87	97,8	-	-	
Cefalosporina							
Sim	10	12,7	69	87,3	17,89	2,45-789,17	<0,0001
Não	1	0,8	125	99,2	-	-	
Carbapenêmico							
Sim	10	24,4	31	75,6	51,17	6,86-2264,54	<0,0001
Não	1	0,6	163	99,4	0,076		
Bacteremia							
Sim	5	10,4	43	89,6	-	-	
Não	6	3,8	151	96,2	-	-	
MT-PCR							
Positiva	3	12,5	21	87,5	-	-	0,459
Negativa	6	25,0	18	75,0			
PICC							
Sim	4	6,8	55	93,2	-	-	0,568
Não	7	4,8	139	95,2	-	-	
CVC							
Sim	7	12,7	48	87,3	5,27	1,28-25,63	0,005
Não	4	2,7	146	97,3	-	-	
NPT							
Sim	11	8,1	125	91,9	-	-	0,015
Não	0	0,0	69	100,0	-	-	
Colonização por <i>Candida spp.</i>							
Sim	4	11,8	30	88,2	-	-	0,121
Não	3	3,9	73	96,1	-	-	
Cirurgia							
Realizou	3	17,6	14	82,3	-	-	0,074
Não realizou	8	4,3	180	95,7	-	-	
Infecção do trato urinário							
Sim	4	5,5	69	94,5	-	-	0,957
Não	7	5,3	125	94,7	-	-	
Vulvovaginite fúngica							
Sim	3	4,4	65	95,6	-	-	0,669
Não	8	5,8	129	94,2	-	-	

Dentre os exames laboratoriais realizados, observou-se que a plaquetopenia foi mais frequente entre os pacientes com candidemia ($p < 0,0001$; OR 25,98; IC 5,02-258,17).

Em relação à MT-PCR, foi realizada em 48 (23,4%) pacientes e 24 (50,0%) foram positivas para *Candida spp.* Destes, seis (25%) foram a óbito.

A média do tempo de internação para positividade do MT-PCR foi de $16,2 \pm 2,1$ dias.

Em relação às espécies de *Candida spp.* identificadas pela MT-PCR observou-se: 10 (41,7%) pacientes com *Candida glabrata*, seis (25%) com *Candida parapsilosis*, três (12,5%) com *Candida tropicalis*, dois (8,3%) com *Candida albicans* e em nove (37,5%) não foi possível a identificação da espécie. Em três pacientes foram identificadas mais de uma espécie de *Candida spp.* (um recém-nascido com *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*, um com *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis* e outro com *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata*).

Entre os 11 pacientes com candidemia comprovada por hemocultura, a MT-PCR foi realizada em nove (81,8%). Os dois pacientes restantes tiveram amostras insuficientes para realização do método. Dentre os nove testados, três (33,3%) também apresentaram MT-PCR positiva.

Vinte e um (87,5%) dos recém-nascidos com MT-PCR positiva fizeram uso de antifúngico. Dos três (12,5%) que não fizeram uso, dois (66,7%) morreram.

Tabela 5. Distribuição dos fatores de risco em relação aos pacientes com MT-PCR positiva e negativa para *Candida spp.*

Fatores de risco		MT-PCR para <i>Candida spp.</i>				OR	IC	Valor p
		Positiva		Negativa				
		n	%	n	%			
Sexo								
Masculino		12	46,2	14	53,8	-	-	0,562
Feminino		12	54,5	10	45,5	-	-	
Corioamnionite								
Sim		2	40,0	3	60,0	-	-	0,637
Não		22	51,2	21	48,8	-	-	
Cateter umbilical								
Sim		24	51,1	23	48,9	-	-	0,312
Não		0	0,0	1	100,0	-	-	
Hemotransusão								
Sim		21	55,3	17	44,7	-	-	0,155
Não		3	30,0	7	70,0	-	-	
VMA								
Sim		22	59,5	15	40,5	6,35	1,09-68,64	0,016
Não		2	18,2	9	81,8			
Cefalosporina								
Sim		17	45,9	20	54,1	-	-	0,303
Não		7	63,6	4	36,4	-	-	
Carbapenêmico								
Sim		18	54,5	15	45,5	-	-	0,350
Não		6	40,0	9	60,0	-	-	
Bacteremia								
Sim		10	41,7	14	58,3	-	-	0,248
Não		14	58,3	10	41,7	-	-	
PICC								
Sim		9	47,4	10	52,6	-	-	0,768
Não		15	51,7	14	48,3	-	-	
CVC								
Sim		11	40,7	16	59,3	-	-	0,146
Não		13	61,9	8	38,1	-	-	
NPT								
Sim		23	50,0	23	50,0			1,000
Não		1	50,0	1	50,0			
Colonização	por							
<i>Candida spp.</i>								
Sim		6	66,7	3	33,3	-	-	0,343
Não		5	45,5	6	54,5	-	-	
Cirurgia								
Realizou		6	54,5	5	45,5	-	-	0,919
Não realizou		18	48,6	19	51,4	-	-	
Infeção do trato urinário								
Sim		10	55,5	8	44,5	-	-	0,765
Não		14	46,7	16	53,3	-	-	
Vulvovaginite fúngica								
Sim		11	50,0	11	50,0	-	-	0,772
Não		13	50,0	13	50,0	-	-	

DISCUSSÃO

No presente estudo, identificamos que uma parcela significativa de pacientes apresentaram sepse (33,2%), dos quais 18,5% confirmados laboratorialmente. Onze pacientes apresentaram candidemia (5,4%) onde predominou a *Candida parapsilosis*. A MT-PCR foi positiva para *Candida spp.* em 50% dos 48 pacientes com sepse submetidos ao teste. Os fatores de risco com maior impacto para candidemia foram hemotransusão, uso e tempo de antibiótico, uso de CVC, uso e tempo de NPT, tempo de PICC, tempo de VMA, além de tempo de internamento na UTI. A espécie mais encontrada como colonizante foi a *Candida albicans*, enquanto a principal espécie identificada nas candidemias foi a *Candida parapsilosis* e esta espécie foi mais frequente em pele e sítio de inserção do cateter venoso central. A mortalidade de todos os pacientes com sepse foi de 30,9%, enquanto a mortalidade dos recém-nascidos com candidemia confirmada foi 45,5%.

A sepse neonatal é uma das principais causas de morte dos recém-nascidos em todo mundo e configura-se como um dos fatores que mais contribui para a elevação do índice de mortalidade neonatal (HERNÁNDEZ et al., 2005; HAQUE; KALHID, 2005).

Em um estudo envolvendo 7.861 recém-nascidos de muito baixo peso (≤ 1000 g), Stoll e colaboradores demonstraram que as infecções hospitalares são muito comuns e levam a morbidade e letalidade significantes. Este estudo identificou taxas de sepse variando de 2% a 25% (STOLL et al., 1996).

A *Candida spp.* foi o terceiro patógeno mais frequentemente isolado entre os recém-nascidos no presente estudo. Este dado é semelhante ao de várias outras pesquisas. Em um estudo multicêntrico que avaliou 6.956 recém-nascidos de baixo peso admitidos ao longo de um período de dois anos em UTIs neonatais americanas, a infecção por *Candida spp.* foi a terceira causa mais comum de sepse neonatal tardia (STOLL et al., 2002).

A candidemia é causa significativa de morbidade e mortalidade em pacientes críticos e imunocomprometidos. Esta infecção ocorre em aproximadamente 5% de neonatos de baixo peso. Essa frequência é mais alta, em torno de 20%, quando se trata de neonatos de extremo baixo peso (< 1000 g) (RICHTMANN et al., 2005).

Estudos de vigilância epidemiológica sobre infecções fúngicas hospitalares do *National Nosocomial Infections Surveillance* (NNIS) nos EUA, demonstram que as candidemias constituem a quarta causa mais comum entre todas as infecções de corrente sanguínea, em hospitais terciários dos EUA, com frequência variando de 0,28 a 0,96 casos por 1.000 internações. Na Europa, *Candida spp.* ocupa do 6º ao 10º lugar entre os agentes mais

isolados de infecções hematogênicas. A frequência de casos de candidemia adquirida em hospitais terciários em diferentes países da Europa varia de 0,17-0,76 casos por 1.000 internações (COLOMBO et al., 2006; TORTORANO et al., 2006; PFALLER; DIEKEMA, 2007; WARNOCK, 2007).

No presente estudo, observamos uma frequência anual de candidemia de 2,55 por 1000 pacientes-dia. Apesar de elevada está de acordo com dados nacionais. Colombo e colaboradores (2006) realizaram o maior estudo brasileiro prospectivo multicêntrico abrangendo 11 hospitais terciários brasileiros, e encontraram elevada frequência de candidemias (2,49 casos por 1.000 internações), 2 a 15 vezes maiores que as referidas em centros hospitalares da Europa e EUA. *Candida spp.* foi o quarto agente mais frequentemente isolado dos episódios de infecção hematogênica e, em 41% dos casos, isolou-se *Candida albicans*. A taxa de mortalidade geral em 30 dias foi de 54%.

A taxa de mortalidade total por infecções fúngicas é alta, podendo atingir 50% em recém-nascidos (RAO; ALI, 2005), taxa que se aproximada da encontrada no nosso estudo. Kossoff e colaboradores (KOSSOFF; BUESCHER; KARLOWICZ, 1998), em estudo retrospectivo, analisaram 15 anos de candidemia em UTI neonatal e detectaram taxas associadas à mortalidade de 26 % para *Candida albicans* e de 4% para *Candida parapsilosis* (RICHTMANN et al., 2005).

No presente estudo, entre as espécies identificadas em hemocultura, a *Candida parapsilosis* foi observada em 60% dos óbitos e a *Candida albicans* em 40%.

Dentre os pacientes com sepse, o isolamento de *Candida spp.* nas hemoculturas ocorreu em 16,2% dos pacientes. Em relação à MT-PCR, observou-se elevada positividade para *Candida spp.*, 50,0% dentre as 48 amostras analisadas. Resultados de diversos estudos demonstraram o potencial da técnica de PCR para detectar *Candida spp.* com sensibilidade e especificidade elevadas, quando comparada aos métodos convencionais de diagnóstico, particularmente às hemoculturas (ELLEPOLA; MORRISON, 2005). No entanto, alguns estudos mostraram resultados discordantes inclusive com a positividade da PCR menor que a das hemoculturas, respectivamente 25 e 37,5% (POLANCO et al., 1999). Devido ao elevado poder de detecção de patógenos em amostras clínicas, os riscos de reações falso-positivas por PCR são elevados (COLOM; JOVER; FERRER, 2006). Outra possibilidade seria a contaminação da amostra do sangue utilizado na amplificação no momento da coleta por espécie de *Candida spp.* que estivesse colonizando a pele do recém-nascido (MIYAKAWA; MABUCHI; FUKAZAWA, 1993; MORACE et al., 1997). Também se deve levar em conta a possibilidade de candidemia transitória, detectada por PCR, mas não pela hemocultura,

devido ao maior poder de detecção da técnica molecular. Alguns autores documentaram resultados positivos de PCR em amostras sanguíneas de pacientes de risco para candidemia, porém sem evidências de infecção hematogênica, sugerindo transitoriedade da candidemia (MORACE et al., 1997; AHMAD et al., 2002).

Observamos no nosso estudo que os fatores de risco para candidemia foram os tradicionalmente encontrados na literatura tais como, tempo de internamento na UTI, uso de antibióticos, em especial cefalosporinas e carbapenêmicos, tempo de ventilação mecânica, uso de cateter venoso central, hemotransfusão, tempo de PICC e tempo de NPT. Entretanto, avaliando-se mais detalhadamente, observa-se que o tempo de duração das intervenções evidencia ainda mais a diferença entre os grupos, ou seja, pacientes que apresentaram candidemia utilizaram em media mais tempo de uso de PICC (43 dias contra 4 dias dos que não apresentaram candidemia), tempo de ventilação mecânica (21 dias contra 5 dias dos que não apresentaram candidemia), tempo de NPT (27 dias contra 9 dias dos que não apresentaram candidemia). Este achado aponta para que a redução do tempo das intervenções pode diminuir o evento, mesmo que este procedimento não possa ser evitado. Outro dado de interesse foi o tempo de utilização do antibiótico, 36 dias em quem teve candidemia comparado a 15 em quem não teve. Outros fatores de risco importantes foram avaliados porém, não se identificou diferença estatística entre os pacientes com e sem candidemia (idade gestacional, peso ao nascer, colonização prévia por *Candida spp.*). Provavelmente, devido ao pequeno número de pacientes com candidemia não foi possível evidenciar essas diferenças.

Vários fatores de risco associados com a candidemia, incluindo prematuridade, uso prévio de antibióticos, duração prolongada de ventilação mecânica, uso de NPT, presença de cateter venoso central, procedimentos cirúrgicos, hospitalização prolongada, e colonização por *Candida spp.* são já bem documentados (MAKHOUL et al., 2001).

Em relação à colonização por *Candida spp.*, quase 30% dos recém-nascidos investigados apresentaram-se colonizados. A fonte de candidemia é usualmente endógena, a partir da colonização das mucosas, principalmente intestinal, do neonato. O recém-nascido crítico é colonizado muito cedo, cerca de 10% destes se tornam colonizados na primeira semana de vida, e mais de 64% estão colonizados após quatro semanas de hospitalização (HUANG et al., 1992). Há evidências de correlação entre colonização fúngica e doença invasiva em neonatos de extremo baixo peso (BALEY et al., 1986; LIBOVITZ et al., 2002). A colonização por *Candida spp.* tem sido mostrada em alguns estudos por ser um fator de risco independente para Candidemia. Os sítios onde a colonização é mais frequente incluem

as mucosas da boca e intestino (MAGILL et al., 2006). Com a da mucosa oral, variando de 20% a 55% (MAKHOUL et al., 2002) e mucosa do intestino 74% (GAGNEUR et al., 2001).

No nosso estudo, a *Candida albicans* foi a principal espécie identificada nas colonizações (43,8%), seguida da *Candida parapsilosis* (37,5%) e os principais sítios de colonização foram em 67,4% dos pacientes o oral, e em 58,8% a pele, três (8,8%) se deram no sítio de inserção do cateter venoso central e dois (5,9%) retal. Observamos que em região oral e retal a principal espécie foi a *Candida albicans* o que é compatível com a presença dessa espécie no trato gastrointestinal. Outra observação importante foi que na pele e no sítio de inserção do cateter venoso central, a *Candida parapsilosis* foi a principal espécie o que sugere transmissão pelo manuseio.

Também constatamos que quando comparadas as amostras colonizantes e as isoladas em hemoculturas, observou-se concordância entre as espécies de *Candida spp.* em 75,0% dos pacientes.

Vários estudos têm encontrado a colonização como um fator de risco, mas nem sempre ela é identificada antes da infecção. Em um grande estudo multicêntrico, prospectivo, a colonização não foi um fator de risco independente para candidemia (SAIMAN et al., 2000; SMITH; STEINBACH; BENJAMIN, 2005).

Em relação à distribuição das espécies de *Candida spp.* identificadas em hemocultura e MT-PCR, houve discordância nos resultados. A *Candida parapsilosis* foi a principal espécie identificada por hemocultura seguida da *Candida albicans*. Na MT-PCR a *Candida glabrata* foi a principal espécie seguida da *Candida parapsilosis*. Quanto à *Candida albicans* esta foi a segunda espécie de *Candida spp.* mais frequente nas hemoculturas, enquanto foi apenas a quarta espécie identificada na MT-PCR.

Estudos de vigilância epidemiológica têm demonstrado que as espécies não-albicans têm emergido como importantes agentes de fungemias (DIEKEMA et al., 2002; ROILIDES et al., 2004; FRIDKIN et al., 2006). Isso também pode ser observado na presente investigação, onde o número de *Candida spp.* não *albicans* foi superior ao de *Candida albicans* tanto nas hemoculturas quanto nas espécies identificadas na MT-PCR.

Entre as espécies de não-albicans isoladas em hemocultura, *Candida parapsilosis* foi a mais frequentemente isolada, similar ao encontrado por outros pesquisadores (BENJAMIN et al., 2006; FRIDKIN et al., 2006).

No nosso estudo, apesar de pouco frequente nas hemoculturas (1,7%), como observado em estudos americanos (PFALLER et al., 2002; GODOY et al., 2003; Hajjeh et al., 2004) a *Candida glabrata* apresentou frequência expressiva de isolamento na MT-PCR,

41,7%. A grande maioria das infecções fúngicas, no período neonatal, são causadas por *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*. Nos últimos anos, o número de infecções por outras espécies, incluindo a *Candida glabrata* aumentaram. A emergência de espécies não-albicans como agentes importantes de candidemia tem sido relacionada ao uso profilático ou empírico de drogas antifúngicas (MEDRANO et al., 2006). No entanto, não é prática da unidade de terapia intensiva neonatal onde se realizou este estudo, o uso de antifúngico profilático. Essa frequência aumentada na MT-PCR pode ser explicada pelo uso elevado de fluconazol para tratamento empírico ou contaminação da amostra no momento da coleta.

Apesar de observarmos certa discordância entre positividade e espécies isoladas em hemocultura e MT-PCR, notamos que 87,5% dos recém-nascidos com MT-PCR positiva fizeram uso de antifúngico e 66,7 % dos que não foram tratados morreram. Desta forma, pode-se concluir que, o uso de técnicas moleculares para detecção de DNA fúngico pode ter impacto na decisão e início precoce da terapêutica em recém-nascidos. A utilização da MT-PCR associada à hemocultura e aos critérios clínicos podem permitir a identificação de um maior número de recém-nascidos com infecção fúngica.

Não obstante a importância do presente estudo, destacam-se algumas limitações. Primeiro, considerando-se a complexa interrelação entre os vários fatores de riscos avaliados, não podemos descartar eventual viés de confusão. Portanto, pretende-se realizar análise multivariável para identificarmos os fatores de riscos independentes para candidemia. Segundo, só foi possível realizarmos MT-PCR em 48 recém-nascidos com sepse devido a algumas amostras inadequadas o que pode ter influenciado na nossa análise estatística. Terceiro, a pequena amostra de pacientes com candidemia no período do estudo mostrou a necessidade de um acompanhamento por um período mais prolongado, inclusive em outras instituições.

CONCLUSÕES

A frequência de candidemia, entre os recém-nascidos internados em unidade de terapia intensiva neonatal, no período de 01 de janeiro a 31 de dezembro de 2010, diagnosticada por hemocultura foi de 11 casos (5,4%) e por MT-PCR foi de 24 casos (11,7%).

As espécies de *Candida spp.* responsáveis pelos episódios de candidemia foram: *Candida parapsilosis*, *Candida albicans* e *Candida glabrata*. Em relação ao perfil de susceptibilidade aos antifúngicos, todas as amostras de *Candida spp.* foram sensíveis a

anfotericina B, dez amostras (90,9%) foram sensíveis ao fluconazol, nove amostras (81,8%) foram sensíveis a anidulafungina e sete amostras (63,6%) foram sensíveis ao voriconazol.

Os fatores de risco identificados nos recém-nascidos com candidemia diagnosticado por hemocultura foram tempo de internamento na UTI, tempo de uso de antibiótico, tempo de ventilação mecânica, tempo de uso de PICC, tempo de uso de NPT, presença de corioamnionite no nascimento, hemotransusão, uso de cefalosporinas, uso de carbapenêmicos, uso de CVC, uso de NPT. Em relação aos pacientes com MT-PCR positiva, apenas o uso de ventilação mecânica foi identificado como fator de risco para candidemia.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA- ANVISA. Neonatologia: Critérios nacionais de infecção relacionadas à assistência à saúde, 2008.

AHMAD, S; KHAN, Z; MUSTAFA, AS; *et al.* Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. **J Clin Microbiol**, v.40, p.2483-2489, 2002.

AL-SWEIH, N; KHAN, Z; KHAN, S; *et al.* Neonatal candidaemia in Kuwait: a 12-year study of risk factors, species spectrum and antifungal susceptibility. **Mycoses**, v.52, p.518, 2009.

BALEY, JE; KLIEGMAN, RM; BOXERBAUM, B; *et al.* Fungal colonization in the very low birth weight infant. **Pediatrics**, v.78, p.225, 1986.

BENJAMIN, DK JR; ROSS, K; MCKINNEY JR, RE; *et al.* When to Suspect Fungal Infection in Neonates: A Clinical Comparison of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* Fungemia With Coagulase-Negative Staphylococcal Bacteremia. **Pediatrics**, v.106(4), p.712-718, 2000.

BENJAMIN, DK JR; STOLL, BJ; FANAROFF, AA; *et al.* Neonatal Candidiasis among infants <1000g birthweight: risk factors, mortality, and neuro-developmental outcomes at 18–22 months. **Pediatrics**, v.117, p.84–92, 2006.

CAREY, AJ. Hospital-Acquired Infections in the NICU: Epidemiology for the New Millennium. **Clin Perinatol**, v.3, p.223–249, 2008.

CLEMONS, KV; FEROZE, F; HOLMEMBERG, K; *et al.* Comparative Analysis of Genetic Variability among *Candida albicans* Isolates from different geographic Locales by three Genotypic Methods. **J Clin Microbiol**, p.1332-1336, 1997.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard**, 3rd ed. document M27-A3. Wayne, PA, 2008.

COLOM, MF; JOVER, A; FERRER, C. Biología molecular em el diagnóstico de la candidiasis profunda em el paciente crítico no neutropênico. **Rev Iberoam Micol**, v.23, p.26-28, 2006.

COLOMBO, AL; NUCCI, M; PARK, BJ; *et al.* Brazilian Network Candidemia Study. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J Clin Microbiol**; v.44, p.2816-2823, 2006.

DIEKEMA, DJ; MESSER, AS; BRUEGGEMANN, AB; *et al.* Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. **J Clin Microbiol**, v.40, p.1298-1302, 2002.

DOTIS, J; EVDORIDOU, J; KREMENOPOULOS, G; *et al.* Survey of neonatal candidiasis in Greece. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.24, p.749–752, 2005.

EL BESHAWY. A Study of protein C, protein S, and antithrombin III in newborns with sepsis. **Pediatr Crit Care Med**, v. 11(1), p.52-59, 2010.

ELLEPOLA, AN; MORRISON, CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. **J Microbiol**; v.43, p.65-84, 2005.

FAIRCHILD, KD; TOMKORIA, S; SHARP, EC; *et al.* Neonatal *Candida glabrata* sepsis: clinical and laboratory features compared with other *Candida* species. **Pediatr Infect Dis J**, v.21, p.39, 2002.

FRIDKIN, SK; KAUFMAN, D; EDWARDS, JR; *et al.* National Nosocomial Infection Surveillance System Hospitals. Changing incidence of candida Bloodstream infections among NICU patients the United State: 1995-2004. **Pediatrics**, v.117, p.1680-1687, 2006.

GAGNEUR, A; SIZUN, J; VERNOTLE, E; *et al.* Low rate of *Candida* parapsilosis – related colonization and infection in hospitalized preterm infants: a one-year prospective study. **J Hosp Infect**, v.48(3), p.193-197, 2001.

GODOY, P; TIRABOSCHI, IN; SEVERO, LC; *et al.* Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin America hospitals. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.98, p.401-405, 2003.

HAJJEH, RA; SOFAIR, AN; HARRISON, LH; *et al.* Incidence of bloodstream infections due to *Candida species* and *in vitro* susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. **J Clin Microbiol**, v.42, p.1519-1527, 2004.

HAQUE, KN. Definitions of bloodstream infection in the newborn. **Pediatr Crit Care**, v.6(3 Suppl), S45-9, 2005.

HERNÁNDEZ, ME; RAMOS, MJC; HERNÁNDEZ, NR; *et al.* Análisis de episodios de sepsis en una unidad de cuidados intensivos neonatal. **Rev Panam Infectol**, v.7, p.22-28, 2005.

HUANG, YC; LI, C; LIN, T; *ET AL.* Association of fungal colonization and invasive disease in very low birth weight infants. **Pediatr Infect Dis J**, v.17(9), p.819-822, 1992.

JORDAN, JA. Molecular Diagnosis of Neonatal Sepsis. **Clin Perinatol**, v.37(2), p.411-419, 2010.

LIBOVITZ, E. Neonatal candidiasis: clinical picture, management controversies and consensus and new therapeutic options. **J Antimicrob Chemother**, v.49(Suppl), p.69-73, 2002.

LUO, G; MITCHELL, TG. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. **J Clin Microbiol**, v.40, p.2860-2865, 2002.

KOSSOFF, EH; BUESCHER, ES; KARLOWICZ, MG. Candidemia in a neonatal intensive care unit: trends during fifteen years and clinical features of 111 cases. **Pediatr Infect Dis J**, v.17, p.50, 1998.

MAGILL, SS; SWOBODA, SM; JOHNSON, EA; *et al.* The association between anatomic site of *Candida* colonization invasive candidiasis, and mortality in critically ill surgical patients. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 55(4), p.293-301, 2006.

MAKHOUL, IR; KASSIS, I; SMOLKIN, T; *et al.* Review of 49 neonates with acquired fungal sepsis: further characterization. **Pediatrics**, v.107(1), p.61-66, 2001.

MAKHOUL, IR; SUJOV, P; ARDEKIAN, L; *et al.* Factors influencing oral colonization in premature infants. **The Israel Medical Association journal**, v.4(2), p.98-102, 2002.

MÉNDEZ-ÁLVAREZ, S, PÉREZ-RPTH, E: La PCR-multiple em microbiologia. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22: 183-192.

MIRANDA, LN; VAN DER HEIJDEN, IM; COSTA, SF; *et al.* Candida colonization as a source for candidaemia. **J Hosp Infect**, v.72, p.9, 2009.

MIYAKAWA, Y; MABUCHI, T; FUKAZAWA, Y. New method for detection of *Candida albicans* in human blood by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, v.31, p.3344-3347, 1993.

MEDRANO, DJA; BRILHANTE, RSN; CORDEIRO, RA; *et al.* Candidemia in a Brazilian Hospital: The Importance of *Candida parapsilosis*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**; v.48 (1), p.17-20, 2006.

MORACE, G; SANGUINETTI, M; POSTERARO, B; *et al.* Identification of various medically important *Candida* species in clinical specimens using PCR-restriction enzyme analysis. **J Clin Microbiol**, v.35, p.667-672, 1997.

NG, PC; LAM, HS. Biomarkers for Late-Onset Neonatal Sepsis: Cytokines and Beyond **Clin Perinatol**, v.37(3), p.599-610, 2010.

PAPPAS, PG; KAUFFMAN, CA; ANDES, D; *et al.* Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v.48, p.503-535, 2009.

PFALLER, MA. Nosocomial fungal infections: Epidemiology of candidiasis. **J Hosp Infect**, v.30 (suppl), p.329-338, 1995.

PFALLER, AM; DIEKEMA, DJ. Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. **J Clin Microbiol**, v.40, p.3551-3557, 2002.

PFALLER, MA; DIEKEMA, DJ. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. **Clin Microbiol Rev**, v.20(1), p.133-163, 2007.

POLANCO, A; MELLADO, E; CASTILLA, C; *et al.* Detection of *Candida albicans* in blood by PCR in a rabbit animal model of disseminated candidiasis. **Diagn Microbial Infect Dis**, v.34, p.177-183, 1999.

RAO, S; ALI, U. Systemic fungal infections in neonates. **J Postgrad Med**, v.51, p.27- 29, 2005.

RICHTMANN, R; TAKAGI, NB; VALCILOTO, E; *et al.* Candidemia em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal: Onde Estamos? **Revista da Sociedade Paulista de Infectologia**, v.1, p.5-9, 2005.

RODRIGUEZ, D; ALMIRANTE, B; PARK, BJ; *et al.* Candidemia in Neonatal Intensive Care Units. Barcelona, Spain. **Pediatr Infect Dis J**, v.25, p. 224–229, 2006.

ROILIDES, E; FARMAKI, E; EVDORIDOU, J; *et al.* Neonatal candidiasis: analysis of epidemiology, drug susceptibility, and molecular typing of causative isolates. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.23, p.745-750, 2004.

SAIMAN, L. Risk factors for candidemia in Neonatal Intensive Care Unit patients. **Pediatr Infect Dis J**, v.19, p.319–324, 2000.

SAIMAN, L; LUDINGTON, E; DAWSON JD; *et al.* Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. **Pediatr Infect Dis J**. v. 20, p.1119 – 1124, 2001.

SMITH, PB; STEINBACH WJ; BENJAMIN, DK JR. Neonatal Candidiasis. **Infect Dis Clin N Am**; v.19, p. 603–615, 2005.

STOLL, BJ; GORDON, T; KORONES, SB; *et al.* Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. **J Pediatr**, v.129, p.63-71, 1996.

STOLL, BJ; HANSEN, N; FANAROFF, AA; *et al.* Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. **Pediatrics**, v.110(2), p.285–291, 2002.

TIRODKER, UH. Detection of Fungemia by Polymerase Chain Reaction in Critically Ill Neonates and Children. **Journal of Perinatology**, v.23, p.117-122, 2003.

TORTORANO, AM; KIBBLER, C; PEMAN, J; *et al.* Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. **Int J Antimicrob Agents**, v.27(5), p.359-366, 2006.

WARNOCK, DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. **Jpn J Med Mycol**, v.48, p.1-12, 2007.

7. CONCLUSÕES

1. A frequência de candidemia, entre os recém-nascidos internados em unidade de terapia intensiva neonatal, no período de 01 de janeiro a 31 de dezembro de 2010, diagnosticada por hemocultura foi de 11 casos (5,4%) e por MT-PCR foi de 24 casos (11,7%).
2. Os fatores de risco identificados nos recém-nascidos com candidemia diagnosticado por hemocultura foram tempo de internamento na UTI, tempo de uso de antibiótico, tempo de ventilação mecânica, tempo de uso de PICC, tempo de uso de NPT, presença de corioamnionite no nascimento, hemotransfusão, uso de cefalosporinas, uso de carbapenêmicos, uso de CVC, uso de NPT. Em relação aos pacientes com MT-PCR positiva, apenas o uso de ventilação mecânica foi identificado como fator de risco para candidemia.
3. A média do número de dias de internamento para diagnóstico de candidemia foi de $20,5 \pm 3,1$ dias.
4. As espécies de *Candida spp.* responsáveis pelos episódios de candidemia foram: *Candida parapsilosis*, *Candida albicans* e *Candida glabrata*. Em relação ao perfil de susceptibilidade aos antifúngicos, todas as amostras de *Candida spp.* foram sensíveis a anfotericina B, dez amostras (90,9%) foram sensíveis ao fluconazol, nove amostras (81,8%) foram sensíveis a anidulafungina e sete amostras (63,6%) foram sensíveis ao voriconazol.
5. Em relação ao desfecho, após 28 dias do término do tratamento, dos onze pacientes que apresentaram candidemia comprovada, seis (54,5%) evoluíram para cura e cinco (45,5%) foram a óbito.

REFERÊNCIAS

ABI-SAID, D; ANAÏSSIE, E; UZUN, O; *et al.* The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. **Clin Infect Dis**, v.24, p.1122-1128, 1997.

AHMAD, S; KHAN, Z; MUSTAFA, AS; *et al.* Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. **J Clin Microbiol**, v.40, p.2483-2489, 2002.

ALEXANDER, BD; PFALLER, MA. Contemporary tools for the diagnosis and management of invasive mycoses. **Clin Infect Dis**, v.43, S15-27, 2006.

AL-SWEIH, N; KHAN, Z; KHAN, S; *et al.* Neonatal candidaemia in Kuwait: a 12-year study of risk factors, species spectrum and antifungal susceptibility. **Mycoses**, v.52, p.518, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA- ANVISA. Neonatologia: Critérios nacionais de infecção relacionadas à assistência à saúde, 2008.

ANTUNES, AGV; PASQUALOTTO, AC; DIAZ, MC; *et al.* Candidemia in a Brazilian Tertiary Care Hospital: Species, Distribution and Antifungal Susceptibility Patterns. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.46, p.239-241, 2004.

BALEY, JE; KLIEGMAN, RM; BOXERBAUM, B; *et al.* Fungal colonization in the very low birth weight infant. **Pediatrics**, v.78, p.225, 1986.

BENJAMIN, DK JR; ROSS, K; MCKINNEY JR, RE; *et al.* When to Suspect Fungal Infection in Neonates: A Clinical Comparison of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* Fungemia With Coagulase-Negative Staphylococcal Bacteremia. **Pediatrics**, v.106(4), p.712-718, 2000.

BENJAMIN, DK JR; STOLL, BJ; FANAROFF, AA; *et al.* Neonatal Candidiasis among infants <1000g birthweight: risk factors, mortality, and neuro-developmental outcomes at 18–22 months. **Pediatrics**, v.117, p.84–92, 2006.

BENJAMIN, DK JR; STOLL, BJ; GANTZ, MG; *et al.* Neonatal candidiasis: epidemiology, risk factors, and clinical judgment. **Pediatrics**, v.126, p.865, 2010.

BUCHMAN, TG; ROSSIER, M; MERZ, WG; *et al.* Charache P. Detection of surgical pathogens by in vitro DNA amplification. Part I. Rapid identification of *Candida albicans* by in vitro amplification of fungus-specific gene. **Surgery**, v.108, p.338-347, 1990.

CAMPBELL, JR; ZACCARIA, E; BAKER, CJ. Systemic Candidiasis in Extremely Low Birth Weight Infants Receiving Topical petrolatum Ointment for skin care: A case-control study. **Pediatrics**, v.105, p.1041-1045, 2000.

CAREY, AJ. Hospital-Acquired Infections in the NICU: Epidemiology for the New Millennium. **Clin Perinatol**, v.3, p.223–249, 2008.

CLEMONS, KV; FEROZE, F; HOLMEMBERG, K; *et al.* Comparative Analysis of Genetic Variability among *Candida albicans* Isolates from different geographic Locales by three Genotypic Methods. **J Clin Microbiol**, p.1332-1336, 1997.

CLERIHEW, L; LAMAGNI, TL; BROCKLEHURST, P; *et al.* *Candida parapsilosis* infection in very low birth weight infants. **Arch Dis Child Fetal Neonatal**, v. 92, p.127-129, 2007.

COLOM, MF; JOVER, A; FERRER, C. Biología molecular em el diagnóstico de la candidiasis profunda em el paciente crítico no neutropênico. **Rev Iberoam Micol**, v.23, p.26-28, 2006.

COLOMBO, AL; NUCCI, M; PARK, BJ; *et al.* Brazilian Network Candidemia Study. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J Clin Microbiol**; v.44, p.2816-2823, 2006.

COTTEN, CM; MCDONALD, S; STOLL, B; *et al.* The Association of Third-Generation Cephalosporin Use and Invasive Candidiasis in Extremely Low Birth-Weight Infants **Pediatrics**, v.118, p.717-722, 2006.

DARMSTADT, GL; DINULOS, JG; MILLER, Z. Congenital cutaneous candidiasis: clinical presentation, pathogenesis and management Guidelines. **Pediatrics**, v.105, p.438-44, 2000.

DIEKEMA, DJ; MESSER, AS; BRUEGGEMANN, AB; *et al.* Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. **J Clin Microbiol**, v.40, p.1298-1302, 2002.

DOTIS, J; EVDORIDOU, J; KREMENOPOULOS, G; *et al.* Survey of neonatal candidiasis in Greece. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.24, p.749–752, 2005.

EL BESHAWY. A Study of protein C, protein S, and antithrombin III in newborns with sepsis. **Pediatr Crit Care Med**, v. 11(1), p.52-59, 2010.

ELLEPOLA, AN; MORRISON, CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. **J Microbiol**; v.43, p.65-84, 2005.

ERJAVEC, Z; VERWEIJ, PE. Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host. **Drug Resist Updat**, v.5, p.3-10, 2002.

FAIRCHILD, KD; TOMKORIA, S; SHARP, EC; et al. Neonatal *Candida glabrata* sepsis: clinical and laboratory features compared with other *Candida* species. **Pediatr Infect Dis J**, v.21, p.39, 2002.

FILIOTI, J; SPIROGLOU, K; ROILIDES, E. Invasive candidiasis in pediatric intensive care patients: epidemiology, risk factors, management, and outcome. **Intensive Care Med**, v.33, p.1272–1283, 2007.

FRIDKIN, SK; KAUFMAN, D; EDWARDS, JR; et al. National Nosocomial Infection Surveillance System Hospitals. Changing incidence of candida Bloodstream infections among NICU patients the United State: 1995-2004. **Pediatrics**, v.117, p.1680-1687, 2006.

GAGNEUR, A; SIZUN, J; VERNOTLE, E; et al. Low rate of *Candida* parapsilosis – related colonization and infection in hospitalized preterm infants: a one-year prospective study. **J Hosp Infect**, v.48(3), p.193-197, 2001.

GODOY, P; TIRABOSCHI, IN; SEVERO, LC; et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin America hospitals. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.98, p.401-405, 2003.

HAJJEH, RA; SOFAIR, AN; HARRISON, LH; et al. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and *in vitro* susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. **J Clin Microbiol**, v.42, p.1519-1527, 2004.

HAQUE, KN. Definitions of bloodstream infection in the newborn. **Pediatr Crit Care**, v.6(3 Suppl), S45-9, 2005.

HEALY, CM; BAKER, CJ; ZACCARIA, E; et al. Impact of fluconazole prophylaxis on incidence and outcome of invasive candidiasis in a neonatal intensive care unit. **J Pediatr**, v.147, p.166-171, 2005.

HERNÁNDEZ, ME; RAMOS, MJC; HERNÁNDEZ, NR; et al. Análisis de episodios de sepsis en una unidad de cuidados intensivos neonatal. **Rev Panam Infectol**, v.7, p.22-28, 2005.

HUANG, YC; LI, C; LIN, T; ET AL. Association of fungal colonization and invasive disease in very low birth weight infants. **Pediatr Infect Dis J**, v.17(9), p.819-822, 1992.

JORDAN, JA. Molecular Diagnosis of Neonatal Sepsis. **Clin Perinatol**, v.37(2), p.411-419, 2010.

KAUFMAN, D; BOYLE, R; HAZEN, KC; *et al.* Fluconazole prophylaxis against fungal colonization and infection in preterm infants. **N Engl J Med**, v.345, p.1660-1666, 2001.

KAUFMAN, D; BOYLE, R; HAZEN, KC; *et al.* Twice weekly fluconazole prophylaxis for prevention of invasive *Candida* infection in high-risk infants of <1000 grams birth weight. **J Pediatr**, v.147, p.172–179, 2005.

KAUFMAN, DA; GURKA, MJ; HAZEN, KC; et al. Patterns of Fungal Colonization in Preterm Infants Weighing Less Than 1000 Grams at Birth. **Pediatr Infect Dis J**, v. 25(8), p.733-737, 2006.

KARLOWICZ, MG; BUESCHER, S; SURKA, AE. Fulminant late onset sepsis in a neonatal intensive care unit, 1988-1997, and the impact of avoiding empiric vancomycin therapy. **Pediatrics**, p.1387-1390, 2000.

KOSSOFF, EH; BUESCHER, ES; KARLOWICZ, MG. Candidemia in a neonatal intensive care unit: trends during fifteen years and clinical features of 111 cases. **Pediatr Infect Dis J**, v.17, p.50, 1998.

LAWN, JE; COUSENS S; ZUPAN, J. 4 million neonatal deaths: when? Where? Why? **Lancet**, v.365(9462), p.891–900, 2005.

LIBOVITZ, E. Neonatal candidiasis: clinical picture, management controversies and consensus and new therapeutic options. **J Antimicrob Chemother**, v.49(Suppl), p.69-73, 2002.

LÓPEZ-SASTRE, JB; COTO-COTALLO, GD; FERNÁNDEZ-COLOMER, B. Grupo de Hospitales Castrillo. Neonatal invasive candidiasis: a prospective multicenter study of 118 cases. **Am J Perinatol**, v.20, p.153, 2003.

LUO, G; MITCHELL, TG. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. **J Clin Microbiol**, v.40, p.2860-2865, 2002.

MAGILL, SS; SWOBODA, SM; JOHNSON, EA; *et al.* The association between anatomic site of *Candida* colonization invasive candidiasis, and mortality in critically ill surgical patients. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 55(4), p.293-301, 2006.

MAHIEU, LM; VAN GASSE, N; WILDEMEERSCH, D; *et al.* Number of sites of perinatal *Candida* colonization and neutropenia are associated with nosocomial candidemia in the neonatal intensive care unit patient. **Pediatr Crit Care Med**, v.11, p.240, 2010.

MAKHOUL, IR; KASSIS, I; SMOLKIN, T; *et al.* Review of 49 neonates with acquired fungal sepsis: further characterization. **Pediatrics**, v.107(1), p.61-66, 2001.

MAKHOUL, IR; SUJOV, P; ARDEKIAN, L; *et al.* Factors influencing oral colonization in premature infants. **The Israel Medical Association journal**, v.4(2), p.98-102, 2002.

MANZONI, P; ARISIO, R; MOSTERT, M; *et al.* Prophylactic fluconazole is effective in preventing fungal colonization and fungal systemic infections in preterm neonates: a single-center, 6-year, retrospective cohort study 2. **Pediatrics**, v.117, p.e22-e32, 2006.

MEDRANO, DJA; BRILHANTE, RSN; CORDEIRO, RA; *et al.* Candidemia in a Brazilian Hospital: The Importance of *Candida parapsilosis*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**; v.48 (1), p.17-20, 2006.

MIRANDA, LN; VAN DER HEIJDEN, IM; COSTA, SF; *et al.* *Candida* colonization as a source for candidaemia. **J Hosp Infect**, v.72, p.9, 2009.

MORACE, G; SANGUINETTI, M; POSTERARO, B; *et al.* Identification of various medically important *Candida* species in clinical specimens using PCR-restriction enzyme analysis. **J Clin Microbiol**, v.35, p.667-672, 1997.

MOREIRA, MEL. Controversies about the management of invasive fungal infections in very low birth weight infants. **Jornal de Pediatria**, v. 81, p.52-58, 2005.

MIYAKAWA, Y; MABUCHI, T; FUKAZAWA, Y. New method for detection of *Candida albicans* in human blood by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, v.31, p.3344-3347, 1993.

NG, PC; LAM, HS. Biomarkers for Late-Onset Neonatal Sepsis: Cytokines and Beyond **Clin Perinatol**, v.37(3), p.599-610, 2010.

NOYOLA, DE; FERNANDEZ, M; MOYLETT, EH; *et al.* Ophthalmologic, visceral, and cardiac involvement in neonates with candidemia. **Clin Infect Dis**, v.32, p.1018, 2001.

PAPPAS, PG; KAUFFMAN, CA; ANDES, D; *et al.* Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v.48, p.503-535, 2009.

PAPPU-KATIKANENI, LD; BANISTER, K. Gastrointestinal colonization with yeast species and *Candida* septicemia in very low birth weight infants. **Mycoses**, v.33(1), p.20-23, 1990.

PERLROTH, J; CHOI, B; SPELLBERG, B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis and treatment. **Med Mycol**, v.45, p.321-346, 2007.

PFALLER, MA. Nosocomial fungal infections: Epidemiology of candidiasis. **J Hosp Infect**, v.30 (suppl), p.329-338, 1995.

PFALLER, AM; DIEKEMA, DJ. Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. **J Clin Microbiol**, v.40, p.3551-3557, 2002.

PFALLER, MA; DIEKEMA, DJ. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. **Clin Microbiol Rev**, v.20(1), p.133-163, 2007.

POLANCO, A; MELLADO, E; CASTILLA, C; *et al.* Detection of *Candida albicans* in blood by PCR in a rabbit animal model of disseminated candidiasis. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.34, p.177-183, 1999.

RAO, S; ALI, U. Systemic fungal infections in neonates. **J Postgrad Med**, v.51, p.27- 29, 2005.

RICHTMANN, R; TAKAGI, NB; VALCILOTO, E; *et al.* Candidemia em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal: Onde Estamos? **Revista da Sociedade Paulista de Infectologia**, v.1, p.5-9, 2005.

RODRIGUEZ, D; ALMIRANTE, B; PARK, BJ; *et al.* Candidemia in Neonatal Intensive Care Units. Barcelona, Spain. **Pediatr Infect Dis J**, v.25, p. 224–229, 2006.

ROILIDES, E; FARMAKI, E; EVDORIDOU, J; *et al.* Neonatal candidiasis: analysis of epidemiology, drug susceptibility, and molecular typing of causative isolates. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.23, p.745-750, 2004.

ROWEN, JL; RENCH, MA; KOZINETZ, CA; *et al.* Endotracheal colonization with *Candida* enhances risk of systemic candidiasis in very low birth weight neonates. **J Pediatr**, v.124, p.789, 1994.

SAIMAN, L. Risk factors for candidemia in Neonatal Intensive Care Unit patients. **Pediatr Infect Dis J**, v.19, p.319–324, 2000.

SAIMAN, L; LUDINGTON, E; DAWSON JD; *et al.* Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. **Pediatr Infect Dis J**. v. 20, p.1119 – 1124, 2001.

SHERERTZ, RJ; GLEDHILL, KS; HAMPTON, KD; *et al.* Outbreak of *Candida* bloodstream infections associated with retrograde medication administration in a neonatal intensive care unit. **J Pediatr**, v.120, p.455, 1992.

SHETTY, SS; HARRISON, LH; HAJJEH, RA; *et al.* Determining Risk Factors for Candidemia Among Newborn Infants From Population-Based Surveillance. Baltimore, Maryland, 1998–2000. **Pediatr Infect Dis J**, v.24, p.601–604, 2005.

SMITH, PB; STEINBACH WJ; BENJAMIN, DK JR. Neonatal Candidiasis. **Infect Dis Clin N Am**; v.19, p. 603–615, 2005.

SMITH, PB; MORGAN, J; BENJAMIN, JD; *et al.* Excess costs of hospital care associated with neonatal candidemia. **Pediatr Infect Dis J**, v.26(3), p.197-200, 2007.

STOLL, BJ; GORDON, T; KORONES, SB; *et al.* Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. **J Pediatr**, v.129, p.63-71, 1996.

STOLL, BJ; HANSEN, N; FANAROFF, AA; *et al.* Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. **Pediatrics**, v.110(2), p.285–291, 2002.

TIRODKER, UH. Detection of Fungemia by Polymerase Chain Reaction in Critically Ill Neonates and Children. **Journal of Perinatology**, v.23, p.117-122, 2003.

TORTORANO, AM; KIBBLER, C; PEMAN, J; *et al.* Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. **Int J Antimicrob Agents**, v.27(5), p.359-366, 2006.

WARNOCK, DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. **Jpn J Med Mycol**, v.48, p.1-12, 2007.

WAGGONER-FOUNTAIN, LA; WALKER, MW; HOLLIS, RJ; *et al.* Vertical and horizontal transmission of unique *Candida* species to premature newborns. **Clin Infect Dis**, v.22, p.803, 1996.

WEESE-MAYER, DE; FONDRIEST, DW; BROUILLETTE, RT; *et al.* Risk factors associated with candidemia in the neonatal intensive care unit: a case-control study. **Pediatr Infect Dis J**, v.6, p.190, 1987.

WYNN, JL; WONG, HR. Pathophysiology and Treatment of Septic Shock in Neonates. **Clin Perinatol**; v.37(2), p.439-79, 2010.

YAMAMURA, DLR; ROTSTEIN, C; NICOLLE, LE; *et al.* Candidemia at selected Canadian sites: results from the fungal disease registry, 1992-1994. **J Clin Microbiol**, v.160, p.93-99, 1999.

ZAOUTIS, T; WALSH, TJ. Antifungal therapy for neonatal candidiasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.20, p.592–597, 2007.

APÊNDICES

APÊNDICE A - TERMO DE CONSETIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, (responsável legal do recém-nascido: _____) permito a participação no estudo “**Fatores de risco e diagnóstico de candidemia por hemocultura e reação em cadeia da polimerase multiplex (MT-PCR) em recém nascidos internados em unidade de terapia intensiva neonatal em Recife, Pernambuco**”, a ser realizado no Hospital Agamenon Magalhães coordenado pelo Dr. Moacir Batista Jucá.

Antes de minha participação um profissional envolvido no trabalho me informou que esse estudo é uma investigação sobre fatores de risco para infecção fúngica em pacientes recém-nascidos. Fui informado em relação aos riscos e benefícios para o participante que por se tratar de estudo observacional não haverá riscos aos participantes da pesquisa já que não será realizado procedimentos relacionados ao estudo e os benefícios são os de possibilitar avaliação de fatores de risco para infecção fúngica permitindo um melhor conhecimento epidemiológico da unidade de terapia intensiva neonatal.

Autorizo a equipe a fazer algumas perguntas e responderei ao questionário sobre o tema e sobre alguns hábitos e comportamentos. A equipe de pesquisa utilizará os resultados de exames, das coletas realizadas durante o internamento do recém-nascido, pelo qual sou responsável, na UTI neonatal e dados do prontuário.

Permito a guarda de qualquer material coletado para exame laboratorial com o objetivo futuro de pesquisa médica ou educacional. Autorizo ainda a utilização das informações médicas obtidas de minha pessoa em reuniões, congressos e publicações científicas sem que meu nome ou o nome do recém-nascido pelo qual sou responsável apareça, ou que haja possibilidades de ser identificado.

Finalmente, estou ciente que caso eu deseje mais esclarecimentos ou caso eu tenha qualquer dúvida sobre a pesquisa, a equipe de pesquisadores me responderá a qualquer dúvida pelos telefones 81-31841610 e 99641492 nos horários das 8:00 às 18:00 horas e pelo e-mail moacirjuca@hhotmail.com.br. Caso eu não queira participar ou se quiser desistir em qualquer momento, isso não vai implicar nenhum prejuízo de qualquer natureza para minha pessoa ou de meus familiares. Eu concordo em participar deste estudo, assinando esse termo em duas vias, ficando uma cópia comigo.

Recife-PE, ____ de _____ de 2010.

(Assinatura do responsável)

Moacir Batista Jucá
Coordenador da pesquisa

1ª Testemunha

2ª Testemunha

APÊNDICE B – FICHA DE COLETA DE DADOS

FORMULARIO DE COLETA DE DADOS

IDENTIFICAÇÃO

1. Número do questionário : _ _ _ _ _
2. Número do prontuário : _____
3. Rn
de _____
4. Data de Nascimento: ____/____/____
5. Local de internação: Hospital Agamenon Magalhães
6. Data de internação no hospital: ____/____/____
7. Data de admissão na UTI Neonatal: ____/____/____
8. Data de alta da UTI: ____/____/____
9. Data de alta do hospital: ____/____/____
10. Tempo de permanência na UTI: _____ dias
11. Sexo: Masculino (1) Feminino (2)
12. Naturalidade: Recife (1) Outro (2) Qual? _____.
13. Procedência: Recife (1) Outro (2) Qual? _____.
14. Idade gestacional ao nascimento: _____ semanas
15. Peso ao nascer: _____ gramas
16. Apgar no 1º minuto: _____
17. Apgar no 5º minuto: _____
18. Indicação do internamento na
UTI: _____
19. Condições de saída da UTI: Alta (1) Óbito (2)
20. Situação da criança no 28º dia após o término do tratamento antifúngico:

Alta para casa	(1)	Óbito	(3)
 Permanece na UTI	 (2)	 Permanece na enfermaria/apto	 (4)
21. Desfecho do episódio de candidíase invasiva:

Cura (1)	Recidiva (2)	Óbito (3)
----------	--------------	-----------

DADOS MATERNOS

22. Prontuário:_____

23. Idade:_____anos

24. Escolaridade:_____anos de estudo

25. Ocupação habitual:_____

26. Estado civil: Solteira (1) Casada (2) União consensual (3) Divorciada (4) Viúva (5)

27. Pré-natal: Sim (1) Não (2) Nº de consultas:_____

28. Problemas na Gestação (identificadas pelo médico no pré-natal):

Ameaça de abortamento	Sim (1)	Não (2)
-----------------------	---------	---------

Ameaça TP prematuro	Sim (1)	Não (2)
---------------------	---------	---------

Diabetes melito	Sim (1)	Não (2)
-----------------	---------	---------

Hipertensão arterial sistêmica	Sim (1)	Não (2)
--------------------------------	---------	---------

DHEG	Sim (1)	Não (2)
------	---------	---------

Cardiopatía	Sim (1)	Não (2)
-------------	---------	---------

Hepatopatía	Sim (1)	Não (2)
-------------	---------	---------

Nefropatia	Sim (1)	Não (2)
------------	---------	---------

Vulvovaginite	Sim (1)	Não (2)
---------------	---------	---------

ITU	Sim (1)	Não (2)
-----	---------	---------

Dermatofitose	Sim (1)	Não (2)
---------------	---------	---------

Doença infectocontagiosa (DIC)	Sim (1)	Não (2)
--------------------------------	---------	---------

Contato com DIC	Sim (1)	Não (2)
-----------------	---------	---------

Internamento	Sim (1)	Não (2)
--------------	---------	---------

Outros:_____

DADOS PERINATAIS

29. Tempo de bolsa rota: _____ horas
30. Duração do trabalho de parto: _____ horas
31. Tipo de parto: Transvaginal (1) Cesário (2)
32. Aspecto do líquido amniótico: Claro (1) Meconizado (2)
33. Quantidade do líquido amniótico: Normal (1) Aumentado (2) Reduzido (3)
Ignorado (99)
34. Corioamionite: Sim (1) Não (2)

35. Medidas utilizadas na assistência imediata ao neonato:

Intubação Traqueal () Cateterismo umbilical ()

Outras: _____

36. Procedimentos realizados na UTI:

Intubação Traqueal () Início: ____/____/____ Fim: ____/____/____

Cateterismo umbilical () Início: ____/____/____ Fim: ____/____/____

Cpap nasal () Início: ____/____/____ Fim: ____/____/____

Dreno torácico () Início: ____/____/____ Fim: ____/____/____

SOG () Início: ____/____/____ Fim: ____/____/____

Hemotransfusão () N° ____

Exsanguíneotransfusão () N° ____

Surfactante () Data: ____/____/____

Ventilação mecânica () Início: ____/____/____ Fim: ____/____/____

Outros: _____

37. Sepsis: Sim (1) Não (2)
38. Choque séptico Sim (1) Não (2)
39. Meningite: Sim (1) Não (2)
40. Insuficiência respiratória: Sim (1) Não (2)

41. Insuficiência renal: Sim (1) Não (2)
42. Administração de antibiótico: Sim (1) Não (2)
43. Dias de uso de antibióticos: _____ dias Início: ____/____/____ Fim: ____/____/____
44. Número de antibióticos: _____
Quais? _____
45. Indicação: Terapêutica (1) Profilática (2)
46. Realização de culturas: Sim (1) Não (2)
47. Material(is) clínico(s) cultivado(s): _____
48. Agente(s) Isolado(s): _____
49. Isolamento de espécie(s) de *Candida*: Sim (1) Não (2)
50. Qual(is)? _____
51. Realização de MT-PCR: Sim (1) Não (2)
52. Data da MT-PCR: ____/____/____
53. Data da MT-PCR: ____/____/____
54. Data da MT-PCR: ____/____/____
55. Espécies identificadas no MT-PCR? _____
56. Documentação de colonização fúngica: Sim (1) Não (2)
57. Data da(s) cultura(s): ____/____/____ Sítio: Oral (1) Retal (2) Umbilical (3) Pele (4)
Cateter (5)
58. Data da(s) cultura(s): ____/____/____ Sítio: Oral (1) Retal (2) Umbilical (3) Pele (4)
Cateter (5)
59. Data da(s) cultura(s): ____/____/____ Sítio: Oral (1) Retal (2) Umbilical (3) Pele (4)
Cateter (5)
60. Data da(s) cultura(s): ____/____/____ Sítio: Oral (1) Retal (2) Umbilical (3) Pele (4)
Cateter (5)
61. Data da(s) cultura(s): ____/____/____ Sítio: Oral (1) Retal (2) Umbilical (3) Pele (4)
Cateter (5)
62. Data da(s) cultura(s): ____/____/____ Sítio: Oral (1) Retal (2) Umbilical (3) Pele (4)
Cateter (5)
63. Data da(s) cultura(s): ____/____/____ Sítio: Oral (1) Retal (2) Umbilical (3) Pele (4)
Cateter (5)
64. Data da(s) cultura(s): ____/____/____ Sítio: Oral (1) Retal (2) Umbilical (3) Pele (4)
Cateter (5)
65. Data da(s) cultura(s): ____/____/____ Sítio: Oral (1) Retal (2) Umbilical (3) Pele (4)
Cateter (5)
66. Data da(s) cultura(s): ____/____/____ Sítio: Oral (1) Retal (2) Umbilical (3) Pele (4)
Cateter (5)
67. Documentação de Infecção fúngica invasiva: Sim.(1) Não (2)

68. Data da(s) cultura(s): ____/____/____ Sítio: _____

69. Data da(s) cultura(s): ____/____/____ Sítio: _____

70. Data da(s) cultura(s): ____/____/____ Sítio: _____

71. Data da(s) cultura(s): ____/____/____ Sítio: _____

72. Data da(s) cultura(s): ____/____/____ Sítio: _____

73. Tratamento(s): _____

74. Susceptibilidade antifúngica de *Candida* obtidas por cultura(s) de vigilância(s):

Fluconazol Sensível (1) / Resistente (2) / Não realizado (3)

Anfotericina B Sensível (4) / Resistente (5) / Não realizado (6)

Outro(s) antifúngico(s) testado(s): _____

75. Susceptibilidade antifúngica de *Candida* obtidas por cultura(s) de líquido(s) estéril(eis):

Fluconazol Sensível (1) / Resistente (2) / Não realizado (3)

Anfotericina B Sensível (4) / Resistente (5) / Não realizado (6)

Outro(s) antifúngico(s) testado(s): _____

76. Uso de antifúngico(s): Sim (1) Não (2)

77. Qual(is)?: _____

78. Adequação do tratamento ao antifungigrama: Sim (1) Não (2)

79. Uso de cateter(es) vascular(es): Sim.(1) Não (2)

80. Se sim, Sítio: _____ Início: ____/____/____ Fim: ____/____/____

i. Sítio: _____ Início: ____/____/____ Fim: ____/____/____

ii. Sítio: _____ Início: ____/____/____ Fim: ____/____/____

iii. Sítio: _____ Início: ____/____/____ Fim: ____/____/____

81. Uso de Nutrição Parenteral Total (NPT): Sim (1) Não (2)

82. Se sim, Início: ____/____/____ Fim: ____/____/____

83. Necessidade de terapia substitutiva renal: Sim (1) Não (2)

84. Se sim, Início: ____/____/____ Fim: ____/____/____

85. Uso de corticóide sistêmico: Sim (1) Não (2)

86. Se sim, Início: ____/____/____ Fim: ____/____/____ Dose: _____ mg/Kg de peso

87. Uso de outro(s) imunossupressor(es): Sim (1) Não (2)

88. Se sim, Início: ____/____/____ Fim: ____/____/____ Qual(is): _____

89. Cirurgia: Sim (1) Não (2)

90. Se sim,

Qual(is): _____

91. Se sim, quando: ____/____/____ ____/____/____

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do CCS-UFPE



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº. 003/2010 - CEP/CCS Recife, 04 de janeiro de 2010

Registro do SISNEP FR – 303027
 CAAE – 0345.0.172.000-09
 Registro CEP/CCS/UFPE N.º 349/09
 Título: PREVALÊNCIA DOS FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DE INFECÇÃO FÚNGICA POR *Candida spp* EM RECÉM-NASCIDOS INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL EM RECIFE, PERNAMBUCO.

Pesquisador Responsável: Moacir Batista Jucá

Senhor(a) Pesquisador(a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 04 de janeiro de 2010.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

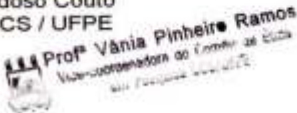
- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente



Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
 Coordenador do CEP/ CCS / UFPE



Prof.ª Vânia Pinheiro Ramos
 Vice-coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa - UFPE

Ao
 Mestrando Moacir Batista Jucá
 Pós-graduação em Medicina Tropical – CCS/UFPE

Av. Prof. Moraes Rego, s/n Cid. Universitária, 50670-901, Recife - PE, Tel/fax: 81 2126 8588; cepccs@ufpe.br