Eliete Cristina da Ângela Rodrigues

**Investigação dos casos de candidemia na
Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital
das Clínicas da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo no período de 2002 a 2008**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Dermatologia
Orientador: Prof. Dr. Paulo Ricardo Criado

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rodrigues, Eliete Cristina da Ângela

Investigação dos casos de candidemia na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo no período de 2002 a 2008 / Eliete Cristina da Ângela Rodrigues. -- São Paulo, 2009.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Dermatologia.

Área de concentração: Dermatologia.

Orientador: Paulo Ricardo Criado.

Descritores: 1.Candidíase 2.Prematuro 3.Infecção hospitalar 4.Unidades de terapia intensiva neonatal

USP/FM/SBD-245/09

Eliete Cristina da Ângela Rodrigues

**Investigação dos casos de candidemia na Unidade de
Terapia Intensiva Neonatal do Hospital das Clínicas
da Faculdade de Medicina da Universidade de São
Paulo no período de 2002 a 2008**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Dermatologia
Orientador: Prof. Dr. Paulo Ricardo Criado

São Paulo

2009

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos Lucas, Leonardo e Victor que me ensinaram o verdadeiro sentido da vida: nada é maior que o verdadeiro amor.

Ao Eurico meu esposo, brilhante médico, que me inspira e cujo amor tivemos nossos filhos, o propósito maior das nossas vidas.

Ao meu pai José e minha mãe Maria Geny, cujo sonho e esforço me conduziram até aqui.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Ricardo Criado, Dermatologista e colaborador do Laboratório de Investigação Médica (LIM) 53, Micologia Médica, da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) pelo apoio e orientação que tornaram possível a execução deste trabalho.

A Dra. Sílvia Figueredo da Costa, por tudo que me ensinou, pelo apoio, colaboração e incentivo na realização deste estudo.

A Dra. Anna Sara Shaferman Levin, pelo apoio e orientação na realização deste trabalho, além de ser responsável em grande parte pelo meu crescimento pessoal e profissional, minha eterna amizade e meu agradecimento sincero.

A Dra. Lourdes Miranda, por todo apoio, ajuda e paciência comigo durante toda realização deste estudo.

A Kátia Cristina Dantas que se tornou minha amiga, agradeço pelo apoio e pela padronização das técnicas moleculares (RAPD) para este estudo.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Costa Martins, Professor Titular do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, a

quem admiro pelo entusiasmo pela dermatologia e todo apoio e ajuda durante o trabalho.

A Elizabeth Maria Heins pelo incentivo e ajuda recebida ao iniciar esta trajetória.

A Natalina Takahashi de Mello, por toda ajuda e orientação no início deste trabalho.

A Inneke Marie Van Der Heijden, pelo apoio e colaboração na realização deste trabalho.

A Dra. Maria Helena Matté, do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, pela ajuda nas análises dos resultados.

A minha mãe Maria Geny, por sempre deixar sua casa e seus afazeres para vir a São Paulo me ajudar com as crianças para que eu pudesse terminar este estudo.

Ao meu pai José pelo apoio e compreensão, por todas as vezes que lhe roubei minha mãe.

A todos aqueles que, mesmo não mencionados aqui, de alguma forma colaboraram comigo durante este percurso.

Normalização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Normalização adotada

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos Gerais	1
1.2 Fatores de risco para infecções fúngicas na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal	5
1.3 Aumento das infecções fúngicas por <i>Candida parapsilosis</i>	7
1.4 Métodos moleculares	11
2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	13
3 OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo geral	14
3.2 Objetivos específicos	14
4 MÉTODOS	15
4.1 Local do estudo	17
4.2 População estudada	17
4.2.1 Amostras obtidas das hemoculturas dos recém-nascidos da UTI-N	17
4.2.2 Amostras obtidas das mãos dos funcionários da UTI-N	18
4.3 Dados epidemiológicos dos recém-nascidos	19
4.4 Avaliação da pureza e viabilidade da amostra	19
4.5 Análise da micromorfologia (microcultivo)	20
4.6 Identificação das leveduras isoladas. Método tradicional e “Kit	

comercial API – ID 32 C”	21
4.7 Assimilação de carboidratos	21
4.8 Tipagem molecular	22
4.8.1 Gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE)	23
4.8.2 Extração e preparo dos blocos de DNA	24
4.8.3 Preparo do gel para a corrida	24
4.8.4 Análise do DNA	25
4.8.5 Extração do DNA para <i>Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)</i>	25
4.8.6 Técnica de RAPD	26
4.8.7 Eletroforeses	27
4.8.8 PCR para amplificação do DNA	27
4.8.9 Purificação do DNA	27
4.8.10 Sequenciamento do DNA	27
5. RESULTADOS	29
5.1 Identificação da <i>Candida parapsilosis</i>	36
5.2 Tipagem molecular	37
5.2.1 Comparação dos perfis eletroforéticos pelos métodos de RAPD PFGE	41
5.2.2 Resultados do sequenciamento do DNA	41
6. CONCLUSÃO	42
7. DISCUSSÃO	43
8. ANEXOS	49
Aprovação da Comissão de Ética	49
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	50
9. REFERÊNCIAS	61
10. APÊNDICE	
Dados recuperados dos prontuários dos recém-nascidos com candidemia	

LISTA DE ABREVIATURAS

C – Graus Celcius

CVC – Cateter Venoso Central

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DO – Densidade Óptica

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

EPM – Escola Paulista de Medicina

FMUSP – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

H – Hora

HC – Hospital das Clínicas

IH – Infecção Hospitalar

Kb – Kilobase

LIM – Laboratório de Investigação Médica

M – Molar

mL – Mililitro

min – Minuto

mm - milímetro

mM – Milimolar

µl – Microlitros

ng – Nanograma

nm – Nanômetro

pb – Pares de Base

PCR – Reação da Polimerase em Cadeia

PFGE – Pulsed Field Gel Electrophoresis

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA

RPM – Rotação por minuto

RN-p – recém-nascido prematuro

RN-b – recém-nascido de baixo peso

RNs – recém-nascidos

SDA – Sabouraud Dextrose Agar

UTI-N – Unidade de Terapia Intensiva Neonatal

UV – Luz Ultravioleta

YEPD – Extrato de levedura Peptona Dextrose

LISTA DE SIGLAS

ABTN – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ATCC – American Type Culture Collection

CAPPesq: Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CHROM ágar *Candida*®: - Meio de isolamento cromogênico

HC-FMUSP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo

USP – Universidade de São Paulo

ID32C® - Método de Identificação de espécies de *Candida* através da
assimilação de açúcares.

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards

®: nome comercial

UBER – UTI berçário

EBEN – berçário normal ou berçário baixo risco

EBEL – berçário médio risco

EBEA – berçário alto risco

EBEI – berçário isolamento

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organograma: Coleta das amostras, culturas e métodos moleculares utilizados	16
Figura 2 — Número de casos de infecções por <i>Candida spp</i> e <i>Candida parapsilosis</i> na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal no período de 2002 a 2008	31
Figura 3 – Distribuição temporal dos 20 recém-nascidos que apresentaram fungemia por <i>Candida parapsilosis</i> no período de 2003 a 2005 (Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo, Brasil)	32
Figura 4 - Resultados das culturas positivas obtidas das mãos dos funcionários	35
Figura 5 – Resultados das hemoculturas positivas dos recém-nascidos da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal no período de abril de 2004 a julho de 2005	36
Figura 6 - Perfil das amostras isoladas dos recém-nascidos e dos funcionários– Pulsed Field Gel Eletrophoresis - <i>Candida parapsilosis</i>	38
Figura 7 –: Perfil das amostras isoladas dos recém-nascidos e dos funcionários - Gel - <i>Random Amplified Polymorphic DNA Candida parapsilosis</i>	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Vigilância e controle dos agentes infecciosos de importância epidemiológica	3
Tabela 2 – Estudos de surtos por <i>Candida parapsilosis</i> em recém-nascidos	9
Tabela 3 – Incidência dos casos de fungemia por <i>Candida parapsilosis</i> na unidade neonatal no período de 2002-2008 (Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo, Brasil)	30
Tabela 4 – Recém-nascidos que apresentaram culturas positivas para <i>Candida parapsilosis</i> no período de abril de 2004 a julho de 2005.	33
Tabela 5 – Funcionários que apresentaram culturas positivas para <i>Candida parapsilosis</i> no período de março de 2005 a junho de 2005.	34
Tabela 6 – Dados recuperados dos prontuários dos recém-nascidos com candidemia	73

RESUMO

Rodrigues E. **Investigação dos casos de candidemia na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo** no período de 2002 a 2008 [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. XXp.

Introdução: A *Candida spp* é considerada uma das principais causas de infecção fúngica invasiva em unidades de terapia intensivas neonatais (UTI-N), sendo a terceira levedura mais comum isolada de culturas de sangue, podendo levar a septicemia e óbito. **Objetivos:** O objetivo deste estudo foi analisar a incidência da *C. parapsilosis* em candidemias em UTI-N nos últimos sete anos e investigar as possíveis causas do surto durante este período. **Método:** Foram revisados os prontuários dos neonatos com candidemia incluídos no estudo entre os anos de 2002 a 2008 e isoladas amostras das mãos dos 71 funcionários que tinham contato direto com os recém-nascidos e do sangue dos recém-nascidos acometidos por candidemia em um surto ocorrido no período de maio de 2004 a julho de 2005. As técnicas utilizadas para a análise das amostras biológicas foram: (i) identificação dos isolados pela micologia clássica e bioquímica (Auxanograma, Zimograma e API ID32), (ii) a análise do DNA genômico por meio do “Pulsed Field Gel Eletrophoresis” (PFGE) e “Randomly Amplified Polymorphic DNA” (RAPD) e (iii) seqüenciamento da região conservada ITS1/ 4. **Resultados:** Os resultados obtidos, no período de 2003 a 2005 demonstraram que houve um aumento significativo de aproximadamente 75% nos casos de *C. parapsilosis* confirmando a ocorrência de um surto de candidemia. Nos isolados destes recém nascidos, 80% das leveduras recuperadas foram identificadas como *C. parapsilosis*, e nos funcionários este agente foi recuperado em 11% das amostras. A análise do polimorfismo genômico destas amostras, pelos métodos PFGE e RAPD apresentou baixo poder discriminatório entre os isolados dos recém-nascidos e funcionários, não os correlacionado. **Conclusões:** Os resultados obtidos confirmam a ocorrência de um surto da *C. parapsilosis* no período de 2003 a 2005 na

UTI-N, apesar de não ter sido possível identificar a fonte de origem deste agente. O aumento da incidência da *C. parapsilosis* na UTI-N no período de 2002 a 2008 e a caracterização de um surto entre os anos de 2003 a 2005 pode ser utilizado como indicador da necessidade de iniciativas de melhoria nas práticas de controle de infecção hospitalar e profilaxia de infecções na unidade de cuidados intensivos neonatais.

Descritores: candidíase, prematuro, infecção hospitalar, UTI neonatal.

SUMMARY

Rodrigues E. **Candidemia case investigations in the Neonatal Intensive Care unit at the Clinical Hospital - Medical School of the University of São Paulo** from 2002 to 2008 [dissertation]. São Paulo: Medical School of the University of São Paulo; 2009. XXp.

Introduction: *Candida spp* is considered one of the main causes of fungal invasive infection in the neonatal intensive care unit (NICU), and the third most common yeast isolated in blood cultures that could lead to septicemia and death. Objectives: This study's goal is to analyze the incidence of *C. parapsilosis* in NICU candidemias in the past seven years and investigate possible causes for an outbreak during this time period. Method: Clinical files of neonates with candidemia included in the study between 2002 and 2008 were revised, and hand samples of 71 employees that came into direct contact with newborns, and neonate candidemia infected blood samples were isolated, which occurred during an outbreak between May 2004 and July 2005. Techniques used to analyze the biological samples, were: (i) isolates identification by classic mycology and biochemistry (Auxanogram, Zymogram and API ID32), (ii) genomic DNA analysis by means of Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and (iii) ITS1/ 4 preserved area sequence. Results: Results obtained between 2003 and 2005 showed a significant increase of approximately 75% in *C. parapsilosis* cases, confirming the occurrence of a candidemia outbreak. In these neonate isolates, 80% of the retrieved yeast was identified as *C. parapsilosis*, and on employees this agent was retrieved in 11% of the samples. The genomic polymorphism analysis of these samples, using PFGE and RAPD methods, presented a non-correlating, low discriminatory strength between neonate and employee isolates. Conclusions: Obtained results confirmed the *C. parapsilosis* outbreak from 2003 to 2005 in the NICU, although it was not possible to identify the origin source of this agent. The increase of *C. parapsilosis* incidence in the NICU between 2002 and 2008, and the characteristics of an outbreak from 2003 to 2005, can be used as an indication for the need of improved initiatives in the control of hospital infection and infection prophylaxis in the Neonatal Intensive Care Unit.

Key words: candidiasis, premature, hospital infection, Neonatal ICU.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais

As infecções hospitalares (IH) estão largamente difundidas, principalmente as causadas por estafilococos e estreptococos, que desencadearam epidemias nos hospitais dos países desenvolvidos especialmente a partir do final da década de 1940 (Lacerda, 2002). Entre as décadas de 1950 e 1960 a IH estava especialmente relacionada com a transmissão de doenças infecciosas bacterianas nos hospitais. A infecção era atribuída a vários fatores, entre os quais a resistência a antibióticos sendo um dos mecanismos responsáveis, especialmente relacionado à falta de critérios no seu uso (Lacerda, 2002). Atribuía-se estas infecções a fatores eminentemente relacionados ao ambiente e a procedimentos inadequados de anti-sepsia (Lacerda, 2002). Nos anos 1960 e 1980, a sepse por Gram negativos era a principal preocupação dentre as infecções hospitalares. Os principais agentes envolvidos eram a *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* e *Pseudomonas* (Luz, 1979). Neste período, o Brasil entra na era das IH “modernas”: endógenas e multiresistentes, tendo em vista as características relacionadas ao avanço tecnológico, voltado para intervenções diagnósticas, terapêuticas invasivas e uso de drogas imunossupressoras (Lacerda, 2002). Diante deste quadro passou-se a conviver tanto com as infecções endógenas, quanto com as exógenas. (Guimarães et al., 2005). Em meados da década de 1970, pesquisas pioneiras foram realizadas, sob enfoques clínico-bacteriológicos, para avaliar fatores ambientais e atribuídos a procedimentos (Lacerda, 2002). Durante os

anos 1980 e 1990 os Gram positivos, particularmente o *Staphylococcus spp* e o *Enterococcus spp* passaram a ser os focos principais de atenção (Guimarães et al., 2005). Enquanto isso, as Comissões de Controle de Infecção Hospitalar evidenciavam através de estudos experimentais controlados sobre microrganismos e sua resistência novas fontes e modos de transmissão, fatores de risco, além dos procedimentos técnicos potencialmente desencadeadores destas infecções (Lacerda, 2002). Paralelamente, com o advento da AIDS, das Hepatites B e C e do recrudescimento da tuberculose houve o reconhecimento de outra modalidade de IH: a ocupacional, que passa a dominar o cenário das preocupações de transmissão destas infecções. Os estudos nacionais referem-se principalmente à validação de processos hospitalares (esterilização, desinfecção, controle do ambiente, componentes de paramentação, embalagens de artigos, reutilização de descartáveis, etc.) e avaliação de procedimentos, principalmente pela enfermagem (Lacerda, 2002). Além destas infecções hospitalares causadas por agentes bacterianos, nas ultimas décadas tem-se evidenciado o envolvimento de agentes fúngicos neste grupo de infecções.

Os fungos são seres dispersos no meio ambiente, em vegetais, ar atmosférico, solo e água, sendo as leveduras capazes de colonizar o homem e os animais e principalmente frente à perda do equilíbrio parasita-hospedeiro, podem causar diversos quadros infecciosos com formas clínicas localizadas ou disseminadas (Lacaz et al., 2002). Dentre as centenas de espécies descritas, as leveduras do gênero *Candida* são os principais

agentes de infecção hospitalar e representam um desafio para a sobrevivência dos pacientes com doenças graves e aqueles em período pós-operatório. Em trabalho de vigilância epidemiológica, no qual se avaliou o índice de mortalidade, em um período de três anos, relacionado as infecção hospitalar nos Estados Unidos da América (EUA) em 1999, verificou-se que as diferentes espécies de *Candida spp*, ocupavam o 4º lugar entre as causas de infecção nosocomial, registrando-se 934 casos (7,6%) atribuídos a estas leveduras, ultrapassando a ocorrência da *Escherichia coli*, conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1 – Vigilância e controle dos agentes infecciosos de importância epidemiológica.

Classificação	Agente Infeccioso	Nº de isolados	%	Índice de Mortalidade (%)
1	<i>Staphylococcus Coagulase-negativo</i>	3908	31,9	21
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	1928	15,7	25
3	<i>Enterococcus sp</i>	1354	11,1	32
4	<i>Candida spp</i>	934	7,6	40
5	<i>Escherichia coli</i>	700	5,7	24
6	Espécies de <i>Klebsiella</i>	662	5,4	27
7	Espécies de <i>Enterobacter</i>	557	4,5	28
8	Espécies de <i>Pseudomonas</i>	542	4,4	33
9	Espécies de <i>Serratia</i>	177	1,4	26
Classificação	Agente Infeccioso	Nº de isolados	%	Índice de Mortalidade (%)
10	<i>Streptococcus viridans</i>	173	1,4	23

Fonte: Edmond et al., 1999. *Clin Infect Dis*. 29:239-44.

No estudo de Edmond (1999), o gênero *Candida* determinou 40% de óbitos, o que corresponde à maior letalidade entre os 10 agentes de infecções nosocomiais. Estes resultados corroboram os dados de (Arendrup et al., 2005, Almirante et al., 2005) que relataram o aumento da incidência de infecção nosocomial pela *Candida spp.*

Estudos realizados nos hospitais americanos, na década de 1990 avaliando sépsse verificaram que o gênero *Candida* foi responsável por 8% do total de casos, sendo que e um terço destas infecções foram causadas por espécies “não *albicans*” (Jarvis, 1995; Jarvis, 1996; Pfaller, 1995). A *C. albicans* foi responsável por 80% das fungemias em 1984 em hospitais e clínicas da Universidade de Iowa, sendo que em 1991 observou-se um decréscimo desta proporção para 50% (Wenzel, 1995). Em contrapartida, a *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e outras espécies são hoje responsáveis por 11,5% de todas as infecções fúngicas recuperadas do sangue (Wenzel, 1995; Costa et al., 2000).

Lunel et al., (1999) atribuem o aumento da incidência das candidíases nosocomiais a fatores endógenos (cirurgias gastrointestinais, neutropenia e diabetes melitus) e exógenos (catéteres, nutrição parenteral, sondas e má assepsia das mãos dos profissionais da saúde). A diferenciação entre esses dois fatores torna-se importante na determinação das medidas de controle para prevenção da transmissão nosocomial da *Candida spp* (Fridkin & Jarvis, 1996).

Sendo assim, o estudo das leveduras do gênero *Candida* torna-se fundamental para que se possa estabelecer o elo entre as fontes de infecção

e as vias de transmissão. A possibilidade da identificação das fontes de infecção é um importante passo para o desenvolvimento de medidas efetivas para a prevenção e controle de uma infecção (Branchine et al., 1998, Soll, 1992).

1.2. Fatores de risco para infecções fúngicas na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal.

A incidência de candidemia em neonatos nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTI-N) vem aumentando, principalmente porque recém-nascidos (RNs) com baixo peso são susceptíveis a infecções devido à imaturidade do sistema imune, ruptura da barreira cutânea e fatores iatrogênicos (Linder et al., 2004). Além disso, outros fatores de risco para infecções incluem: (i) o uso de ventilação mecânica; (ii) o uso de cateteres umbilicais ou centrais; (iii) administração de emulsões lipídicas; (iv) medicações antibióticas de amplo espectro, aminofilinas e esteróides; (v) presença de sepse bacterianas e coagulação intravascular; (vi) preexistência de colonização fúngica na traquéia ou trato gastrointestinal (Lee & Cheung, 1998; Makhoul & Kassis, 2001; Saiman et al., 2000; Stoll et al, 1996; Emori e Gaynes, 1993; Diekema & Pfaller, 2004; Pfaller & Wenzel, 2003).

O aumento das infecções fúngicas nosocomiais entre os recém-nascidos parece estar relacionado ao aumento da sobrevivência destes, especialmente em decorrência dos avanços científicos que promoveram a melhoria diagnóstica e terapêutica. As áreas hospitalares onde ocorrem com maior

freqüência estas infecções são as Unidades de Terapia Intensiva (neonatal e pediatria), uma vez que 1,2% dos pacientes internados nestes setores desenvolvem candidemia (Carton et al., 2001).

Além da alta morbidade e mortalidade a candidemia está relacionada a um aumento significativo no tempo de internação e conseqüentemente maiores custos hospitalares (Edmond et al. 2004, Morgan et al. 2005).

Os pacientes submetidos à internação hospitalar são mais susceptíveis a adquirir candidemia devido ao seu estado geral debilitado e por precisar freqüentemente de procedimentos invasivos. A utilização de dispositivo intravascular é um importante fator de risco associado ao desenvolvimento de infecção sanguínea nosocomial primária e também de candidemia em UTI (Levin et al., 1998; Jarvis, 1995, Girão et al., 2008). A principal fonte de infecções hospitalares por leveduras é ainda a flora endógena do paciente. No entanto, as mãos dos profissionais da saúde são também consideradas importantes para a colonização e infecção, especialmente pela *C. parapsilosis* (Van Asbeck Ec et al., 2007; Bonassoli et al., 2005)

Recém-nascidos de baixo-peso apresentam maior risco de desenvolver sepse tardia, responsável por considerável morbidade e mortalidade (Saiman, 2001). A mortalidade da candidemia alcança a ordem de 40 a 50% e não se observa diminuição deste índice a décadas (Arendrup et al., 2005, Almirante et al., 2005). Um estudo, utilizando dados de um caso-controle pareado de base populacional realizado em Baltimore, por Morgan et al.(2005) estimou uma mortalidade atribuída à *Candida* variando entre 19

a 24%, dependendo da idade do doente. Entre as diversas espécies de *Candida* relacionadas a estes óbitos tem sido emergente o papel da *Candida parapsilosis* (Morgan et al., (2005).

1.3. Aumento das Infecções fúngicas por *Candida parapsilosis*

Para que a candidemia possa ser caracterizada, é necessário o isolamento da levedura por mais de dois dias no sangue circulante (Lacaz et al., 2002).

A *Candida spp* é a principal causa de infecções fúngicas invasivas nas unidades de terapia intensiva neonatal (UTI-N) e é a terceira mais comum recuperada a partir de hemoculturas nos casos de sepse na UTI-N. A incidência de candidemia neonatal em recém-nascidos de extremo baixo peso ao nascer (definido como crianças com peso <1.000g) é de 7% a 20%, e diminui com o aumento do peso ao nascer (<1% em recém-nascidos com peso ao nascer > 1500g) (Zaoutis et al., 2007). Os pacientes mais suscetíveis a infecções por *C. parapsilosis* são recém-nascidos de baixo peso em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal, que geralmente requerem antibióticos e uso de cateteres venosos centrais por longos períodos e, frequentemente recebem nutrição parenteral total (Weems et al., 1987). Segundo Levin et al., (1998) a candidemia nosocomial relacionada ao cateter é a mais comum e pode ser a causa primária ou secundária de óbito.

Embora a *C. albicans* continue a ser a espécie mais comum entre as infecções fúngicas humanas, tem se observado o aumento da incidência de

outras espécies associadas à fungemia (Pfaller et al., 2000, Sandven, 2000). A colonização pela *C. albicans* é precoce, freqüentemente de forma vertical, oposto ao que ocorre com a colonização pela *C. parapsilosis* que é mais tardia e ocorre principalmente por via horizontal (Saiman et al. 2001, Lupetti et al., 2002).

A *C. parapsilosis* pode infectar e colonizar pacientes a partir de fontes ambientais. Inúmeros locais do corpo podem ser colonizados, entretanto a pele é o mais freqüente, seguido pelos pontos de inserções de intravenosa (IV) ou arterial que atuam como importantes fatores de risco para doença sistêmica (Huang et al., 2004). *C. parapsilosis* é uma levedura oportunista para o homem, podendo causar infecções superficiais ou sistêmicas em pacientes imunocomprometidos. Embora menos comum que a *C. albicans*, a *C. parapsilosis* causa vaginites, peritonite, candidemia oral, infecção do trato urinário, septicemia e endocardite (Odds, 1979). Ao contrário das outras espécies, a *C. parapsilosis* causa candidemia nosocomial sem prévia colonização em outros sítios, o que sugere que esta levedura pode ganhar acesso à corrente sanguínea diretamente a partir de fontes do ambiente (Levin et al., 1998)

A perda da flora gastrointestinal normal, devido ao uso de cefalosporinas, principalmente as de terceira geração, e a demora na introdução da alimentação enteral está associada a uma maior colonização pela *C. parapsilosis* (Saiman et al., 2001).

A virulência da *C. parapsilosis* esta associada com a sua capacidade de aderência às superfícies plásticas e, conseqüentemente, para o

desenvolvimento de candidemias relacionadas a cateteres (Traoré et al., 2002). Ela é capaz de se multiplicar em altas concentrações de soluções de glicose, e produz uma grande quantidade de material extracelular, formando biofilmes sobre a superfície do cateter, permitindo a multiplicação e permanência do fungo e, conseqüentemente, a sua disseminação (Branchini et al., 1994).

Entre recém-nascidos admitidos em UTI-N a literatura contemporânea tem referido diversas ocorrências de sepse pela *C. Parapsilosis* como demonstrado na tabela 2.

Tabela 2 – Estudos de surtos por *Candida parapsilosis* em recém-nascidos.

Ano	Nº de casos <i>C. parapsilosis</i>	País	Período do Estudo	Fonte do surto
Huang Y. C. et al 2004	17 casos	Taiwan	1996	**
Rodriguez et al. 2006	16 casos	Espanha	2002-2003	**
Fridkin et al. 2006	30 casos	USA	1995 - 2004	**
Benjamin et al. 2006	98 casos	USA		**
Lupetti, et al. 2002	06 casos	Itália	2002	Mãos de 2 enfermeiras

Nota: ** não especificada a fonte do surto

Um estudo epidemiológico de uma microepidemia ocorrida no hospital-dia da Hematologia da Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), entre janeiro e março de 1994 revelou que o único fator associado à fungemia foi a

utilização cateteres venosos centrais, por um longo período de tempo (Levin et al, 1998). A *C. parapsilosis* foi isolada nas mãos de três funcionários do Hospital que manuseavam os pacientes, sendo que outras possíveis fontes, tais como, o uso de medicamentos, desinfetantes, e infusões, não foram implicados (Levin et al. 1998). Costa et al. (2000), em estudo retrospectivo, verificaram que a fungemia nosocomial por *Candida*, no Hospital das Clínicas da FMUSP, no período de 1994 a 1996, representava o 2º agente causal entre os microrganismos isolados nas unidades de cuidados críticos. Os autores observaram que a *C. albicans* representava 50% dos casos, seguida da *C. parapsilosis* (17%).

Um estudo multicêntrico brasileiro, envolvendo seis hospitais universitários, realizado no período de janeiro de 1995 a outubro de 1996, demonstrou que a *C. albicans* foi o agente etiológico em apenas 37% dos 145 episódios de candidemia avaliados. Espécies “não *albicans*” representaram 63% de todos os episódios estudados, sendo que a *C. parapsilosis* constituiu 25% dos isolados, seguida de *C. tropicalis* (24% dos casos)(Colombo et al., 1999).

Miranda et al. (2009) em estudo na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital das Clínicas da FMUSP, durante o período de maio de 2004 a julho de 2005 avaliaram a colonização pela *Candida* em pacientes com candidemia, onde está localizada a unidade neonatal. Em todos pacientes com diagnóstico de candidemia foram coletados materiais para realização de culturas de vigilância (urina, reto e orofaringe, pele da virilha e axila; pele ao redor do cateter e ponta de cateter, quando disponível). Durante este estudo,

um grande número de casos de candidemia causada por *C. parapsilosis* foi observado na unidade neonatal e foi levantada a hipótese da ocorrência de um surto pela *C. parapsilosis*. Com exceção de uma criança, todas eram prematuras de baixo peso (mediana 1.125g; variação de 620 a 2.790g). Sete dos RNs com candidemia por *C. parapsilosis* foram a óbito, mas a *Candida* não foi à causa da morte. Destes recém-nascidos, cinco apresentavam cateter venoso central (CVC) no dia da hemocultura. A mediana do intervalo de tempo entre o diagnóstico e a retirada do dispositivo foi de 8 dias (variação de 2 a 11 dias).

1.4. Métodos moleculares

Devido o 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 (Clemons et al. 1997; Pfaller, 1992). Os métodos moleculares destacam-se pela caracterização do microrganismo, permitindo investigação epidemiológica, pela sua capacidade de avaliar as variabilidades intra-específicas entre amostras, além de gerar resultados rápidos, fato importante para permitir medidas terapêuticas ágeis ou para o controle de infecções hospitalares. Além disso, estes métodos são ferramentas úteis para a caracterização de um surto, determinando por vezes a fonte da

infecção, delimitando a área atingida e comprovando a recidiva do mesmo agente (Clemons et al. 1997, Pfaller 1995, Sader & Pignatari 1997).

Os métodos convencionais de tipagem molecular como a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), o RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) e PFGE (Pulsed Field Gel Eletrophoresis) não diferenciam a *C. parapsilosis* das duas novas espécies descritas na literatura, a *C. orthopsilosis* e a *C. metapsilosis* (Tavanti et al., 2005; Gomes-Lopes et al., 2008). Apenas os métodos de seqüenciamento genômico, poderá reduzir as incertezas inerentes aos procedimentos habitualmente utilizados nas investigações epidemiológicas.

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Baseando-se nos achados de Miranda et al.(2009) sobre a ocorrência de um surto por *C. parapsilosis* na UTI-N do Hospital das Clínicas da FMUSP no período de abril de 2004 a julho de 2005 procedemos ao estudo dos casos de fungemia pela *C. parapsilosis* entre os recém-nascidos da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do HC-FMUSP no período de abril de 2004 à julho de 2005 a fim de elucidar os aspectos epidemiológicos envolvidos durante este evento. Além disso, nos propusemos a investigar os casos de candidemia ocorridos nesta unidade no período de 2002 a 2008.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar os casos de candidemia no berçário da UTI - neonatal no período compreendido entre os anos de 2002 a 2008.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar os cariótipos das amostras de *C. parapsilosis*, isoladas durante o estudo.
- Avaliar a relação genética entre os isolados recuperados dos recém-nascidos e dos profissionais da saúde.
- Avaliar a incidência de candidemia pela *C. parapsilosis* em uma unidade de terapia intensiva neonatal durante sete anos e descrever um surto que ocorreu durante este período.

4. MÉTODOS

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Pesquisa e Ética do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e pela Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da FMUSP (Protocolo de Pesquisa nº0938/08, 2008) (Anexo A).

O estudo foi desenvolvido a partir da obtenção de amostras dos fungos isolados do sangue dos recém-nascidos da UTI-N no período de abril de 2004 a junho de 2005 e do material coletado das mãos dos profissionais de saúde que tinham contato direto ou indireto com estas crianças no período de março de 2005 a junho de 2005.

Um organograma sobre os passos da coleta de material e métodos empregados pode ser visualizado na figura 1.

Figura 1 - Organograma: Coleta das amostras, culturas e métodos moleculares utilizados

4.1. Local do estudo

O Hospital das Clínicas é um hospital universitário com 2000 leitos, filiado à Universidade de São Paulo, Brasil. Possui uma unidade neonatal com 63 leitos que admite apenas crianças nascidas no Hospital, geralmente a partir de gestações de alto risco. Há cinco seções dentro da unidade: uma para recém-nascidos normais - **EBEN** (23 leitos); uma para recém-nascidos de médio risco - **EBEL** (15 leitos); uma unidade de alto risco **EBEA** – (9 leitos); um isolamento - **EBEI** (8 leitos) e unidade de cuidados intensivos neonatais **UBER** (8 leitos).

4.2. População estudada

Foram incluídos no estudo, todos os recém-nascidos com sinais de fungemia documentados na UTI-N do berçário do Hospital das Clínicas da FMUSP e os funcionários que apresentaram culturas de “swabs” de mãos positivas para leveduras e que tinham contato direto ou indireto com os recém-nascidos dentro do berçário.

4.2.1. Amostras obtidas das hemoculturas dos recém-nascidos da UTI-N.

No período de maio de 2004 a julho de 2005, 11 pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva do Berçário do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (UTI-N), apresentaram sinais clínicos de fungemia. A solicitação e coleta de hemoculturas atenderam à investigação diagnóstica de rotina dos médicos assistentes de cada paciente. O processamento foi realizado no Laboratório

Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Através da vigilância ativa no Laboratório de Microbiologia, observou-se o crescimento de *Candida spp* nas hemoculturas. Quando esta se apresentava, o RN fonte da hemocultura era identificado e era pedido o consentimento do responsável para inclusão do mesmo no estudo.

As cepas de *Candida* isoladas só foram utilizadas para os objetivos propostos no presente estudo.

4.2.2. Amostras das mãos dos funcionários da UTI-N.

Devido à avaliação da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar, que considerou que as fungemias seriam consequência de um surto, principalmente por haver a predominância quase absoluta da *C. parapsilosis*, decidiu-se executar uma avaliação da colonização das mãos dos profissionais da UTI-N na Unidade e comparar os achados obtidos com os resultados das culturas recuperadas dos recém-nascidos.

A coleta das mãos dos profissionais da saúde se realizou no período de março a julho de 2005, tendo-se obtido previamente seu consentimento de por escrito. Antes da coleta, os profissionais eram orientados para lavarem as mãos com água e sabão e secá-las.

As amostras foram coletadas nas regiões interdigitais, subungueais das mãos e profissionais da saúde utilizando-se swabs estéreis umedecidos com água estéril. No berçário da UTI-N trabalhavam na época do estudo 80 profissionais, dividindo-se em enfermeiros, auxiliares de enfermagem,

fisioterapeutas e atendentes, dos quais 71 funcionários participaram do estudo. Destes profissionais houve somente uma coleta. Não foi coletado material das mãos dos médicos, uma vez que estes não permitiram a coleta e dos pais dos recém-nascidos que não se encontravam no hospital em contato com as crianças.

4.3. Dados epidemiológicos dos recém-nascidos.

Um caso de candidemia foi definido como “um bebê internado na unidade neonatal, nascido no hospital, que apresentaram pelo menos uma hemocultura positiva para *C. parapsilosis*”. Casos ocorridos entre os anos de 2002 a 2005 foram revisados. Apenas o primeiro episódio de candidemia para cada recém-nascido foi considerado. As seguintes informações sobre cada caso foram obtidas a partir dos registros dos pacientes: sexo, peso ao nascer, tipo de parto; Apgar (São 5 sinais observados nos recém-nascidos nos primeiros minutos após o nascimento, são eles, frequência cardíaca, respiração, tônus muscular, cor e irritabilidade reflexa); duração da internação até candidemia; uso de antimicrobianos e antifúngicos; uso de corticosteróides, uso de procedimentos invasivos, tais como cateteres venosos centrais (CVC) e nutrição parenteral total (NPT).

4.4. Avaliação da pureza e viabilidade da amostra

Previamente aos experimentos, as amostras foram submetidas à verificação da sua pureza e viabilidade e mantidas em temperatura ambiente

em meio ágar Sabouraud-dextrose, com repiques prévios a fim de que os testes fossem realizados com culturas recentes.

Para avaliação da pureza, as leveduras foram semeadas com alças descartáveis pela técnica de esgotamento, em placas de Petri (90x15mm) descartáveis contendo meio CHROMagar *Candida* (CHROMagar Microbiology, Paris, França), meio cromogênico seletivo, que permite a identificação de culturas mistas de leveduras, que poderiam se perder durante a semeadura convencional em meio sólido, segundo Powell et al. (1998). Após semeadura, as amostras foram incubadas a 30°C durante 48 horas. Foram selecionadas para o estudo as amostras que apresentaram crescimento, com característica de leveduras (Sullivan & Coleman, 1998). Estas leveduras foram mantidas em temperatura ambiente em meio ágar Sabouraud-dextrose, com repiques prévios a fim de que os testes fossem realizados com culturas recentes. Após esta etapa foi realizado o estudo micromorfológico das amostras.

4.5. Análise da micromorfologia (microcultivo)

Para o estudo micromorfológico, as leveduras foram semeadas em meio de ágar-fubá-Tween 80. Observou-se a produção e morfologia e disposição dos blastoconídios, clamidoconídios terminais e formação de pseudohifas e hifas verdadeira, sendo possível identificar o gênero e sugerir a espécie em avaliação (Rivalier & Seydel, 1932). Com o objetivo de observar estruturas características da *C parapsilosis* (blastoconídeos, e

pseudohifas), cada amostra foi semeada, com o auxílio de alças descartáveis, em duas estrias paralelas sobre lâmina de vidro contendo ágar fubá dentro de placas de Petri esteril. As estrias feitas sobre o ágar foram cobertas com lamínulas esterilizadas e a placa incubada a 25 – 28°C, durante 48 a 96 horas (Lacaz et al. 2002). As leituras, no microscópio óptico, foram realizadas diariamente, com objetivas de aumento de 10x e 40x.

4.6. Identificação das leveduras isoladas. Método tradicional e “Kit comercial API – ID 32 C”

As leveduras isoladas foram estudadas quanto as suas características macroscópicas e microscópicas e reprodutivas de acordo com os métodos preconizados por (Kurtzman & Fell, 1998) procedendo-se de modo geral, segundo o protocolo utilizado para identificação de leveduras do Laboratório de Micologia Médica do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – USP. O primeiro método utilizado foi o método tradicional Auxanograma e Zimograma (Hong et al 2000) e posteriormente pelo API – ID 32 C (BioMérieux), (Deak & Beuchat, 1993; Gutierrez et al., 1994), que identifica as leveduras através da Assimilação de Carboidratos.

4.7. Assimilação de carboidratos

A assimilação de carboidratos é a habilidade que uma levedura tem de crescer aerobicamente na presença de determinado carboidrato fornecido como única fonte de energia. (Deak et al., 1993; Gutierrez et al., 1994).

O ID 32C® (BioMérieux) é um sistema de identificação comercial. Este kit consiste em uma placa contendo microcúpulas com carboidratos desidratados. Nestas se inocula a suspensão da levedura e incubam-se sob temperatura adequada ($29^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) por 24-48 horas.

Os resultados são baseados na assimilação de 29 açúcares como fonte de carbono para *Candida*, associado à resistência a cicloheximida e à capacidade de metabolizar a esculina. As provas positivas podem ser observadas pela turvação da microcúpulas. Os perfis bioquímicos obtidos nas reações são transformados em perfil numérico. Os resultados obtidos são transcritos e comparados com os perfis listados no índice (padrão) (Deak et al., 1993; Gutierrez et al., 1994).

4.8. Tipagem molecular

Foi realizada a tipagem molecular das 12 amostras obtidas das hemoculturas dos 11 RNs que apresentaram candidemia por *C. parapsilosis* e das 09 amostras de *C. parapsilosis* obtidas das culturas de *swabs* das mãos de 08 funcionários.

A análise dos perfis genotípicos apresentados pelas amostras foi realizada por inspeção visual comparativa dos géis de eletroforese do PFGE e RAPD. Todas as técnicas foram repetidas três vezes, para garantir a reprodutibilidade dos métodos, bem como também foram testados controles negativos para o RAPD. Em todos os métodos de tipagem os isolados foram

analisados segundo o perfil eletroforético, as amostras consideradas apresentaram similaridade de número e posição de bandas.

Entre as técnicas moleculares correntemente em uso, utilizamos a cariotipagem realizada com eletroforese em campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis – PFGE) e a Amplificação Aleatória do DNA Genômico (RAPD - Random Amplified Polymorphic of DNA).

4.8.1. Gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE)

A realização do processo de gel de eletroforese em campo pulsado — PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) — foi desenvolvida em três fases, a saber:

- **Extração e preparo dos blocos de DNA:** Durante a extração do DNA, para evitar a quebra mecânica do mesmo, as amostras foram envolvidas em blocos de agarose, que foram inseridos posteriormente no gel.
- **Preparo do gel para corrida:** O gel contendo o DNA extraído foi submetido à corrente elétrica que se alterou periodicamente de acordo com a programação estipulada, sendo que a migração do DNA ocorreu do pólo positivo, para o pólo negativo.
- **Análise do DNA:** O tempo requerido para os fragmentos de DNA de diferentes tamanhos se reorientarem no novo campo elétrico é proporcional ao seu peso molecular, permitindo a separação dos fragmentos de DNA. Fragmentos maiores gastam um maior tempo de reorientação no novo campo elétrico, ao passo que fragmentos menores migram mais rápido.

A seguir, relacionamos os passos adotados no desenvolvimento de cada fase do processo.

4.8.2. Extração e preparo dos blocos de DNA

Foi semeada uma única colônia, de cada amostra, em ágar Sabouraud com cloranfenicol por 48 horas à 35°C. As colônias foram semeadas em sete mL de caldo Yesat Extract Peptone Dextrose (YEPD) (12-15 horas) à 30°C. Centrifugação por 10 minutos a 3000 rpm. O precipitado foi lavado em água Milli-Q (estéril). Centrifugado 5000 rpm por 5min a temperatura de 20°C. Dissolução da agarose *low melt* e colocação no banho-maria à 58°C. Foi adicionado Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 50 mM (pH 8,0) de acordo com o peso do precipitado. Em seguida foi adicionada a enzima Lyticase para quebra da parede celular. Foi adicionada a esta suspensão agarose *low melt* a 2% à 58°C a cada tubo. Deste modo, o cromossoma completo fica protegido dentro do bloco de gel de agarose solidificado. Os moldes foram colocados em câmara úmida e incubados à 5°C por 15 minutos e posteriormente à 37°C por 2 horas (em banho-maria seco). A lise da membrana celular foi realizada com a adição de 2,0 mL de NET e 75 µL de proteinase K em cada poço *overnight* a 50°C. Em seguida foi realizada a lavagem dos pocinhos com CHEF TE 1X (TA – 3 vezes) e incubação *overnight* a 5°C.

4.8.3. Preparo do gel para a corrida

PM (*Sacharomyces cereviseae*), ATCC (22019)

Condições de corrida

CHEF-DR II

C. parapsilosis Temperatura: 12°C;

Voltagem: 4,5 V/cm;

Tempo de corrida: 40 horas;

Tempo inicial: 120 segundos;

Tempo final: 280 segundos.

4.8.4. Análise do DNA

A tipagem molecular das amostras isoladas nas hemoculturas dos recém-nascidos e das mãos dos funcionários só foi realizada com os isolados identificados como *C. parapsilosis*. A análise dos perfis de banda foi de acordo com padrão de peso molecular - *Sacharomyces cerevisiae* (Mortimer e Schild 1985; Traver e Davis. 1988).. As amostras foram comparadas com a amostra referência do ATCC 22019 (*C. parapsilosis*), quanto ao perfil de amostra padrão. Os isolados foram considerados diferentes quando apresentaram uma banda em posição diferente (Shin et al., 2005).

4.8.5. Extração do DNA para Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

A partir da amostra semeada foi isolada uma única colônia. Está foi semeada em meio de cultura ágar Sabouraud com cloranfenicol (100 mg/mL), o crescimento será até atingir a fase log, correspondendo à escala 5 de McFarland (1.5×10^9 cells/mL), sob agitação constante (40 rpm). As

células foram lavadas com 0,5M EDTA (pH 8.0), retirando o meio de cultura do precipitado.

A parede celular das amostras de *Candida parapsilosis* foram lisadas com a enzima Lysing enzyme na concentração de 200U (L1412; Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) a 37°C por 3 horas em tampão de lise (1 M sorbitol, 100 mM EDTA e 14 mM β Me). Os isolados foram incubados por 30 minutos a 30°C e centrifugados a 5000×g (temperatura ambiente). O precipitado foi ressuspensionado em 180 μ L do tampão ATL (QIAamp DNA Mini Kit; QIAgen, Valencia, CA, USA). A lise da membrana celular de todos os isolados foi realizada com proteinase K (100 mg/mL) a 56°C por 3 horas.

O DNA foi extraído utilizando o Kit QIAamp DNA MiniKit (QIAgen), e quantificado pelo espectrofotômetro na densidade óptica 260/280 nm. A integridade do DNA foi verificada pela análise do gel de eletroforese de agarose a 1%.

4.8.6. Técnica de RAPD

O perfil de bandas de todas as amostras foi observado em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (10ng/mL). Nós utilizamos os seguintes *primers*: LEG 2 -5'-CTGGCTTCTTCCAGCTTCA-3', OLIGO 1 - 5'TCACGATGCA-3'; OLIGO 3- 5'-GCCGCCGAAACGATCTAC-3' and P5 - 5'GTCATGAGGAATCTCGCCTG-3'. As condições utilizadas na reação de RAPD foram estabelecidas segundo as recomendações de Vrione et al., (2001) e Binelli et al., (2006). A análise foi visual de acordo com o perfil de bandas das amostras, considerando as diferentes posições e quantidade de

bandas. A reação foi repetida três vezes apresentando o mesmo perfil de bandas para todos os isolados.

4.8.7. Eletroforeses

O produto de RAPD foi visualizado por meio do gel de agarose corado com brometo de etídio em tampão de TBE 1X (01M Tris, 0,09 M de ácido bórico, 1mM EDTA, segundo Sambrook et al., 1989. O Padrão de peso molecular utilizado foi de 1kb DNA Ladder plus (Invitrogen). A análise dos géis foi realizada pelo sistema de foto documentação digital e análise SDG-7500 (Bioagency).

4.8.8. PCR para amplificação do DNA

Foi realizado um PCR para a ampliação da região ITS do DNA. Utilizaram-se os primers ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCG CTTATTGATATGC-3') e ITS4 específico para a região. Após a amplificação, executou-se uma eletroforese onde aplicamos o padrão "Low Mass" para a quantificação do DNA. (Low DNA Mass Ladder – In Vitrogen Life Technologies)

4.8.9. Purificação do DNA

Com o produto já amplificado e solúvel ($\leq 100\mu\text{l}$), foi realizada a purificação do DNA com o "Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" - GE Healthcare, UK, segundo, Vogelstein et al., 1979 e Marko et al., 1982.

4.8.10. Seqüenciamento do DNA

As reações de seqüenciamento foram realizadas pela *Genomic Engenharia Molecular Ltda*, usando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit da Applied Biosystems. Os produtos do seqüenciamento foram submetidos à eletroforese em um seqüenciador modelo 3130xl da Applied Biosystems. Foram processados lotes que incluem um controle de DNA plasmideal (pGEM, fornecido pela *Genomic*). Uma análise mais aprofundada foi realizada por comparação com as seqüências nucleotídicas de *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* disponíveis no GenBank, com auxílio do programa BLAST – <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Foi realizado levantamento dos prontuários, nas diferentes unidades do berçário da UTI-N, avaliando a frequência dos casos de fungemia, no período de 2002 a 2008, como pode ser observado na figura 2 e tabela 3. Os resultados mostraram que houve aumento da frequência dos casos de candidemia de aproximadamente 75%, em três anos (2003 – 2005). A partir de 2006 observa-se um declínio progressivo de 50% nos casos de infecções por *Candida spp.* Cabe ressaltar que se encontraram três espécies de *Candida*, sendo 44% dos casos de *C. albicans* (27 casos), 49% dos casos de *C. parapsilosis* (30 casos) e 7% de *C. tropicalis* (4 casos). A tabela 3 mostra que apesar do número de internações na unidade ter diminuído a partir de 2002, no ano de 2003 observou-se uma incidência maior no número de casos. Os dados de 2002 a 2005 foram analisados e a incidência anual de candidemia causada por *C. parapsilosis* para a unidade neonatal foi calculada (tabela 3). Durante os anos 2006-2008 a incidência de fungemia por *C. parapsilosis* também foi calculada para avaliar o impacto das medidas de controle (tabela 3).

Tabela 3 – Incidência dos casos de fungemia por *Candida parapsilosis* na unidade neonatal no período de 2002-2008 (Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo, Brasil).

Ano	Numero de casos de fungemia de <i>C. parapsilosis</i>	Número de admissões na unidade	Incidência de <i>C. Parapsilosis</i> (por 1000 admissões)	Nºde casos de fungemia por <i>Candida spp</i>
2002	0	2502	0	1
2003	1	2254	0.4	14
2004	11	2280	4.8*	18
2005	8	1906	4.2	16
2006	3	2053	1.5	11
2007	6	2027	3.0	4
2008	2	1613	1.2	2

Observação: * $p=0.00007$ (chi square for trend from 2002 to 2004)

A figura 3 mostra o número de casos de infecções por *Candida spp*, *C. parapsilosis*, na UTI-n no período de 2002 a 2008 e o aumento destas infecções nos anos de 2003, 2004 e 2005.

Figura 2 — Número de casos de infecções por *Candida spp* e *Candida parapsilosis* na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal no período de 2002 a 2008.

No período de maio de 2004 a julho de 2005, onde houve o predomínio de infecções por *C. parapsilosis* na UTI-N estudamos 15 recém-nascidos que apresentaram candidemia (11 por *C. parapsilosis*) e 08 profissionais da saúde que apresentaram culturas de swabs das mãos positivas para *C. parapsilosis*, no berçário da Unidade de Terapia Intensiva do Hospital das Clinicas da FMUSP. Na tabela 4 podemos ver essa população estudada, os recém-nascidos, a data de nascimento, a data de coleta e os funcionários com as respectivas datas de coleta.

Na figura 3, podemos visualizar a distribuição temporal ao longo dos anos de 2003 a 2005 dos casos de candidemia por *C. parapsilosis* nos RNs. Podemos observar que há uma sobreposição dos RNs com candidemia pela *C. parapsilosis* no período de internação, especialmente entre maio de 2004 e junho de 2005, tipificando um surto por este agente

Figura 3 – Distribuição temporal dos 20 recém-nascidos que apresentaram fungemia por *Candida parapsilosis* no período de 2003 a 2005 (Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo, Brasil).

Observação: ↓período da internação em que foi diagnosticada a fungemia

Tabela 4 – Recém-nascidos que apresentaram culturas positivas para *Candida parapsilosis* no período de abril de 2004 a julho de 2005.

Recém-Nascidos	Data de Nascimento	Data da Coleta
R1	29/04/04	16/05/04
R2	22/09/04	29/10/04
R3	25/10/04	21/11/04
R4	10/11/04	21/11/04
R5	15/12/04	19/01/05
R6	19/01/05	27/01/05
R7	16/01/05	11/02/05
R8	23/01/05	13/02/05
R9	26/04/05	02/05/05
R10	08/06/05	24/06/05
R11	26/06/05	22/07/05

Observação: R – recém-nascido;

Tabela 5 – Funcionários que apresentaram culturas positivas para *Candida parapsilosis* no período de março de 2005 a junho de 2005.

Funcionários	Data da Coleta
F1	29/03/05
F2	29/03/05
F3	29/03/05
F4	29/03/05
F5	30/03/05
F6	06/05/05
F7	06/05/05
F8	24/05/05

A figura 4 mostra o número de culturas realizadas das mãos dos profissionais da Saúde, sendo que, 13% das culturas foram positivas para *C. parapsilosis*.

Figura 4 – Resultado das culturas obtidas das mãos dos funcionários.

Observação: Dos 71 funcionários que foram realizadas as coletas de swabs das mãos, 57 apresentaram culturas negativas (79%), 9 apresentaram culturas positivas para *Candida parapsilosis* (13%), 2 com *Candida albicans* (3%), 2 *Rhodotorula rubra* (3%), 1 *Rhodotorula glutinis* (1%) e um com *Trichosporum sp* (1%).

De quinze recém-nascidos infectados, foram isoladas doze cepas de *C. parapsilosis* (80%), duas cepas de *C. tropicalis* (13%) e uma cepa de *C. albicans* (7%), portanto um total de 80% das culturas recuperadas dos RNs foram positivas para *C. parapsilosis* conforme mostra a figura 5.

Figura 5– Resultado das Hemoculturas positivas dos recém-nascidos da Unidade de Terapia Intensiva neonatal, no período de abril de 2004 a julho de 2005.

Observação: ***Candida parapsilosis*** (80%), ***Candida tropicalis*** (13%), ***Candida albicans*** (7%).

5.1. Identificação da *Candida parapsilosis*

As leveduras do gênero *Candida*, foram identificadas inicialmente pela morfologia das colônias, aspecto e variação de cores. Na análise microscópica da colônia, os isolados apresentaram estruturas redondas e/ou ovais em brotamentos (blastoconídios), associados ou não à presença de hifas e pseudo-hifas. As identificações foram feitas também por um segundo método, o ID 32C® (BioMérieux) onde os resultados positivos para *C. parapsilosis* foram confirmados.

A identificação micológica da *C. parapsilosis* dividiu-se em avaliação morfológica, na qual primeiramente plaqueou-se em CHROMagar *Candida* para isolamento de diferentes colônias de leveduras e certificação de isolado puro. Os isolados tinham consistência cremosa e coloração bege. A

micromorfologia dos isolados apresentavam similaridade entre si, com pseudomicélio abundante e ramificado, com presença em alguns campos de pseudomicélio formado por células gigante. Nas regiões de constrições observam-se poucos blastosporos, variando de globosos a ovóides, dependendo do isolado e sempre dispostos em verticilos. A confirmação da micromorfologia inicialmente foi realizada por prova de assimilação e fermentação de fontes de carboidrato e nitrogênio, sem alteração do resultado previsto (Lacaz et al., 2002, Kurtzman e Fell, 1998) e confirmado por Api-ID32.

Após as identificações das espécies de *Candida spp*, todas as amostras positivas para *C. parapsilosis* foram submetidas à extração do DNA, para realização da tipagem molecular.

5.2. Tipagem molecular

O método Pulsed Field Gel Eletrophoresis (PFGE), utilizado para análise das amostras isoladas, apresentou melhor poder discriminatório (maior número e posição de bandas) entre as amostras de *C. parapsilosis* estudadas (RNs e Funcionários), conforme podemos ver na figura 6.

Figura 6 - Perfil das amostras isoladas dos recém-nascidos e dos funcionários– Pulsed Field Gel Eletrophoresis - *Candida parapsilosis*

Observação: Coluna 1: peso molecular PM (*Sacharomyces cerevisiae*), coluna 2: ATCC (22019) *C. parapsilosis*, as colunas 3 a 14 correspondem às hemoculturas dos recém-nascidos; coluna 15 ATCC (22019); colunas 16 a 24 amostras dos funcionários.

A figura 6, PFGE em gel de agarose 2%, dos isolados de *C. parapsilosis*, dos recém-nascidos e culturas positivas das mãos dos funcionários. PM: padrão de Peso Molecular de *Sacharomyces cerevisiae* (Catalog number 170-3605; Bio-Rad Laboratories), ATCC (American Type Culture Collection) de *C. parapsilosis* (ATCC 22019); R1 – R11b correspondem às hemoculturas dos recém nascidos; F1-F8 correspondem às amostras isoladas das mãos dos funcionários.

Os resultados do gel de PFGE apresentaram seis perfis de bandas que foram comparadas com a amostra referência e por meio destes perfis foram identificadas como *C. parapsilosis* (ATCC 22019). A análise visual comparativa do gel possibilitou agrupar os isolados dos Funcionários (F) e os Recém – Nascidos (R) segundo o perfil de bandas. A análise visual revelou que o F1 apresentou similaridade de perfil de bandas com o R1 (F1=R1), o F3b apresentou o perfil de bandas similar com o R2 e

R7(F3b=R2=R7) e o F5 apresentou o perfil de bandas similar aos R6 e R10 (F5=R6=R10). Estes resultados sugeriram que os F1, F3b e F5 podem ter sido os responsáveis pela transmissão para os R1, R2, R7, R6 e R10.

No entanto, o isolado do R3 apresentou similaridade com R5; R4 apresentou similaridade com o R11a (R3=R11a); R8 apresentou similaridade com R9 e R11b (R8=R9=R11b). O que podemos observar da análise destes resultados foi que os três diferentes isolados devem ter sido transmitidos para os recém nascidos por meio de outros focos tais como cateteres e etc.

Foi observado também outro isolado de *Candida parapsilosis* o F1 e F6 (F1=F6) que apresentaram similaridade de bandas, o mesmo foi observado com F2 e F8 (F2=F8), no entanto não foi constatado que estes funcionários seriam o foco de transmissão.

Os isolados F7 e F3a apesar de não terem perfis de bandas similares a nenhuma amostra, estas foram identificadas como *Candida parapsilosis*. Já amostra F4 não apresentou o perfil de bandas de *C. parapsilosis*.

A segunda técnica estudada foi a de RAPD que apresentou menor poder discriminatório entre as amostras, como podemos observar na figura 6.

O método RAPD também utilizados para a análise das amostras isoladas apresentou menor poder discriminatório, como podemos observar na figura 7.

Figura 7 –: Perfil das amostras isoladas dos recém-nascidos e dos funcionários - Gel - *Random Amplified Polymorphic DNA Candida parapsilosis*

Observação: Coluna 1: peso molecular PM (1kb DNA ladder - Invitrogen); a coluna 2 a 10 correspondem às amostras dos funcionários e as colunas 11 a 22 correspondem hemoculturas dos recém-nascidos.

A análise aleatória do polimorfismo genômico do DNA (RAPD) em gel de agarose 2% dos isolados de *C. parapsilosis* dos recém-nascidos e culturas positivas das mãos dos funcionários, com o primer Leg2 (Invitrogen). PM: 1kb DNA ladder (Invitrogen); F1-F8 correspondem amostras isoladas das mãos dos funcionários; R1 –R11b correspondem às hemoculturas dos recém nascidos.

A análise foi realizada com quatro primers diferentes (leg2, oligo1, oligo3 e P5) em gel de agarose. O primer que apresentou melhor poder discriminatório foi o leg 2 (Figura 7). Os resultados foram analisados visualmente, apresentando cinco perfis eletroforéticos. A amostra isolada do funcionário F8 apresentou similaridade com o R4 e R5 (F8=R4=R5), sugerindo que este funcionário possa ter transmitido o agente para o recém-nascido. No entanto, alguns isolados dos funcionários apresentaram similaridade entre si, o F2 com o F7 (F2=F7), F6 com F3a e F5 (F6=F3a=F5), F1 com F3b (F1=F3b). O mesmo ocorreu com os recém-

nascidos apresentando grande similaridade dos isolados entre eles ($R1=R2=R3=R6=R7=R8=R9=R10=R11$), sugerindo ser a mesma cepa.

5.2.1. Comparação dos perfis eletroforéticos pelos métodos de RAPD e PFGE.

Comparando os resultados obtidos a partir dos métodos RAPD e PFGE, e considerando somente os perfis que apresentaram número e posição de bandas iguais, encontramos apenas dois perfis eletroforéticos iguais entre dois recém-nascidos. R2 apresentou perfil eletroforético igual com R7 pelos dois métodos, sendo $R2=R7$ e R6 apresentou perfil eletroforético igual ao perfil de R10 pelos dois métodos, sendo $R6=R10$.

5.2.2. Resultados do seqüenciamento do DNA

Os resultados do seqüenciamento de DNA dos isolados confirmaram a identificação fenotípica (métodos clássicos) e genotípica (tipagem molecular) onde todos os isolados dos RNs foram identificados como *C. parapsilosis*. Apenas uma amostra isolada do funcionário número 5 foi caracterizada pelo seqüenciamento do DNA como *C. orthopsilosis* sendo os demais isolados confirmados *C. parapsilosis*. As seqüências obtidas serão depositadas no banco de dados genômico (GenBank).

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

- Os dados recuperados pelo nosso estudo permitem concluir que:
- Não foi possível definir a fonte da infecção que originou o surto de candidemia no período estudado
- Houve um aumento significativo na incidência da *C. parapsilosis*, causando candidemia na UTI-N no período de 2002 a 2008, observando-se um aumento de 75% na frequência de casos de candidemia, entre os anos de 2003 a 2005.
- As técnicas empregadas para a análise e o sequenciamento do DNA das amostras fúngicas recuperadas dos indivíduos incluídos no estudo permitiram confirmar a ocorrência de um surto de candidemia pela *C. parapsilosis* nos recém-nascidos da UTI-N, no período de 2003 a 2005, porém não se estabeleceu nexo de transmissão das cepas isoladas das mãos dos funcionários para os RNs, uma vez que não houve concordância do material genético entre cepas obtidas dos oito funcionários e cepas obtidas das hemoculturas dos RNs com candidemia.
- O emprego de duas técnicas de análise do DNA fúngico, aqui representadas pelo RAPD e pela PFGE, provou ser relevante para não se afirmar equivocadamente à existência de similaridade entre o material genético das cepas recuperadas nas amostras biológicas, evitando-se estabelecer falsos nexos causais.

7. DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

O levantamento realizado no período de 2002 a 2008 revelou que as diferentes unidades de berçário da UTI-N evoluíram de uma baixa incidência na freqüência de casos de fungemia para um surto. No entanto, a *C. parapsilosis* é mais freqüente em recém-nascidos nas UTI-N e sua incidência está associada ao fato de serem prematuros e apresentarem baixo-peso (Clerihew et al., 2007; Blyth et al., 2009).

Os resultados obtidos demonstraram que houve aumento de 75% da freqüência de casos de candidemia, entre os anos de 2003 a 2005. No entanto, em 2006 observa-se um declínio progressivo de 50% dos casos de infecções por *Candida spp.* Apesar do número de internações na unidade ter diminuído a partir de 2002, houve um aumento no número de casos de infecções fúngicas causadas por leveduras do gênero *Candida*, aumentando assim a incidência em 2003.

Infecções fúngicas invasivas, causadas por leveduras do gênero *Candida*, têm emergido como uma grave ameaça para pacientes hospitalizados a nível mundial nas últimas décadas (Pfaller et al., 2001; Banerjee et al., 1991). Desde 1990, tem se tornado claro que a *Candida spp* permanece como importante causa de infecção nosocomial. A proporção dessas infecções, devido a espécies de *Candida não albicans* está aumentando, cada vez mais (Fridkin e Jarvis, 1996; Pfaller, 1996). Em nosso estudo podemos observar este aumento de infecção por *Candida não albicans*, com a *C. parapsilosis* representando 80% das hemoculturas positivas recuperadas dos RNs.

Alguns autores ressaltam a importância da origem exógena das candidemias, as quais podem ser transmitidas para o paciente através de catéteres, nutrição parenteral e pelas mãos dos profissionais da saúde (Shin et al., 2005; Sanchez et al., 1993; Ruiz-Diez et al., 1997; Clark et al., 2004, Diekema et al., 1997; Weems et al., 1996, Miranda et al., 2008)). Em 1998, Levin et al. relataram o estudo de caso-controle (18 controles) de fungemia por *C. parapsilosis* relacionado ao uso prolongado de catéteres venoso centrais, mostrou que as mãos de três profissionais da saúde tiveram culturas positivas para *C. parapsilosis*. Os cariótipos eletroforéticos mostraram dois perfis iguais entre pacientes e profissionais da saúde, porém foi utilizado apenas o método PFGE para a tipagem molecular. Segundo Miranda et al., (2009) a tipagem molecular dos isolados de *C. parapsilosis* demonstrou similaridade entre os 12 isolados obtidos do sangue dos recém-nascidos e seis pontas de catéteres em um estudo anterior no HC-FMUSP sem qualquer semelhança entre os isolados de sangue e isolados da pele e gastrointestinal. Em nosso estudo foi obtido uma amostra de sangue dos recém-nascidos e uma amostra das mãos dos funcionários durante o surto, para avaliar se as mãos poderiam ter desempenhado o papel de veículo da transmissão da infecção. Os resultados obtidos demonstraram que os isolados das mãos não apresentaram semelhança com os isolados do sangue quando avaliados pelos dois métodos de tipagem (RAPD e PFGE), o que difere dos estudos anteriores com o mesmo objetivo os quais estes indicaram que a transmissão das cepas das leveduras foi veiculada dos

profissionais da saúde para os pacientes (Sanches et al., 1993; Levin et al., 1998).

Em nosso estudo, um maior poder discriminatório foi conseguido através da combinação de dois métodos de tipagem molecular com diferentes mecanismos, tais como, a PCR-RAPD e PFGE. A PFGE apresentou um número de perfis de bandas maior que o número de perfis apresentado pela PCR-RAPD, no entanto, a combinação dos dois métodos apresentou maior poder discriminatório que o PFGE isolado. Segundo Nantel et al., (2006), nenhuma técnica isoladamente pode afirmar a similaridade entre as amostras.

Durante o surto, dentro da nossa unidade, houve vários problemas estruturais, inclusive uma excessiva admissão de pacientes na unidade que pode ter repercutido nas práticas de saúde e que necessitou um longo tempo para serem equacionadas. Como discutido acima, as mãos dos funcionários demonstraram ser a fonte primária de contágio e outras possíveis fontes de contaminação e transmissão, tais como, soluções ou medicações poderiam também levar a um surto monoclonal de *Candida spp.* Assim, embora a transmissão não possa ser plenamente esclarecida, o aumento do número de casos, indica problemas na aplicabilidade dos cuidados de saúde.

Diante dos fatos evidenciados foram reavaliadas práticas de cuidados de saúde na unidade neonatal e avaliadas visitas realizadas à farmácia onde eram produzidas as nutrições parenterais. As seguintes medidas de controle foram aplicadas a partir de abril de 2004: (i) mudanças no manuseio das

NPT pelo pessoal da unidade, (ii) diminuição do número de pacientes internados, a fim de alcançar uma taxa de ocupação mensal de 90%, (iii) aumento da disponibilidade de fornecimentos de aventais, e (iv) fornecimento de soluções anti-sépticas, treinamento de assepsia e lavagens de mãos para os funcionários.

Uma amostra isolada das mãos de um funcionário (F5), identificada como *C. parapsilosis* no início do estudo, após ser submetida ao seqüenciamento genômico, demonstrou pertencer na verdade a espécie *Candida orthopsilosis*. Este dado vem a confirmar o que Tavanti et al. (2005) e Gomez-Lopez et al. (2008) haviam relatado em seus estudos, que os métodos convencionais que não diferenciam a *C. parapsilosis* das duas novas espécies citadas na literatura a *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*.

Os resultados obtidos em nosso estudo demonstraram que os fatores de risco nas infecções fungicas, em recém-nascidos nas UTI-N, entre eles, a prematuridade, baixo peso ao nascer, uso de antibióticoterapia de amplo espectro, uso de cateteres e nutrição parenteral, foram semelhantes em comparação com aqueles descritos em estudos anteriores (Huang et al., 2000; Saiman et al., 2000). Outro problema referente ao cuidado neonatal que foi observado é a permanência prolongada na UTI-N, que também contribui para a ocorrência de candidemia. Em nosso estudo, dez recém-nascidos usavam CVC, no momento da candidemia. A longa permanência no uso do CVC favorece a infecção por fungo. Na moderna terapia intensiva neonatal, usa se frequentemente a introdução do CVC para as alimentações

parenterais e isso favorece o aumento de infecções por *Candida*, principalmente a *C. parapsilosis*.

Infecções sistêmicas por *C. parapsilosis* foram associadas com as taxas significativas de sobrevivência quando comparadas com as infecções causadas por outras espécies de *Candida*. Em nosso estudo, a mortalidade foi de 45%, maior do que o esperado, número significativo entre os casos, e este evento negativo pode ser associado a vários outros fatores, tais como, o local da infecção, tratamento adequado, uso prolongado de cateteres, elementos estes que não foram avaliados no presente estudo. Assim estes resultados devem ser interpretados com cautela. É possível que a predominância de recém-nascidos de muito baixo peso ao nascer possa explicar este achado. Estudos sugerem que a incapacidade da remoção do cateter logo que é diagnosticado a candidemia no recém-nascido é um fator de risco para óbito (Karlłowicz et al., 2000; Benjamin et al, 2006). Assim o atraso na remoção do CVC em nosso estudo também poderia explicar esses achados.

Nossos resultados demonstraram que a incidência de fungemia por *C. parapsilosis* na UTI-N variou muito ao longo de 7 anos na UTI-N do HC-FMUSP. É possível que o aumento das taxas possa ser usado como indicador da necessidade de iniciativas de melhora da qualidade na Unidade de Cuidados Intensivos Neonatais.

8. ANEXOS

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 19.11.08, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0938/08**, intitulado: **"Transmissão horizontal de candidose por cândida parapsilosis em recém-nascidos de baixo peso"** apresentado pelo Departamento de **DERMATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Paulo Ricardo Criado

Pesquisador(a) Executante : Eliete Cristina da Ângela Rodrigues

CAPPesq, 24 de Novembro de 2008

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP:TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Investigação de candidemia em UTI-N.**

2. PESQUISADOR: Prof. Dr. Paulo Ricardo Criado

CARGO / FUNÇÃO: Médico / Dermatologista INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 66343

UNIDADE DO HCFMUSP Departamento de Dermatologia Instituto Central.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO X

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 12 meses.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****1. Desenho do estudo e objetivo(s)**

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa comparar as cepas encontradas no sangue dos Recém-nascidos com as cepas encontradas nas mãos dos atendentes desta UTI - Neonatal. Participando, você estará contribuindo para a descoberta de um novo caminho para o controle das infecções hospitalares.

Antes de tomar uma decisão é importante que você compreenda porque esta pesquisa clínica está sendo realizada e o que ela envolverá. Por favor, leia com atenção este documento, faça as perguntas que desejar e pense bem antes de concordar.

Sinta-se à vontade para perguntar sobre quaisquer dúvidas ou para pedir maiores informações ao seu médico antes de tomar uma decisão sobre sua participação. Se, após a leitura destas informações, você não concordar em participar da pesquisa, não haverá qualquer prejuízo quanto ao seu trabalho neste hospital.

Se você escolher participar, você poderá retirar seu consentimento a qualquer momento e deixará de participar do estudo, sem que haja qualquer prejuízo quanto à continuidade do seu trabalho no hospital, devendo apenas informar ao médico responsável o motivo que o levou a se retirar do estudo.

O objetivo deste estudo é descobrir se há uma transmissão de *Candida parapsilosis* presente no meio ambiente e conseqüentemente nas mãos dos funcionários para os Recém-nascidos de baixo peso.

2. Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros.

Se você decidir participar deste estudo e assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, serão feitas coletas com “swabs” nas regiões interdigitais e subungueais das suas mãos para realização de culturas. Não será feito nenhum outro tipo de coleta.

3. Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço; exames radiológicos

Não será necessária a coleta de sangue, nem outros exames complementares. O único procedimento executado nos funcionários do berçário consistirá na coleta de swabs das regiões entre os dedos das mãos e das unhas, através de um instrumento que se assemelha a um cotonete estéril, o que é indolor e não invasivo.

4. Desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3.

Este tipo de coleta não lhe causará nenhum desconforto ou risco. Será feita uma assepsia no local e passaremos a ponta de algodão do “swabs” em suas mãos.

5. Benefícios que poderão ser obtidos

Não haverá benefício direto ao participante, exceto o diagnóstico de uma candidose cutânea, se existente e o seu tratamento pela equipe de dermatologia do HC-FMUSP, aqui representada pelo pesquisador principal, o Dr. Paulo Ricardo Criado. Eventualmente as leveduras do gênero *Candida* podem ser encontradas saprofiticamente no homem, animais e também no solo, água, vegetais e em diversos ambientes, inclusive os hospitalares, podendo causar doenças nos recém-nascidos de baixo peso devido à imaturidade do sistema imune. A sua participação também estará contribuindo para o estudo desta doença e saber qual o provável meio de transmissão.

6. Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar

Existem outros procedimentos alternativos para o diagnóstico desta doença se você decidir não participar deste estudo. O seu médico poderá informá-los, caso você deseje não participar do estudo.

7. Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas e às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa.

Você tem o direito de questionar o médico responsável pelo acompanhamento do estudo a qualquer momento, no sentido de esclarecer todas as dúvidas decorrentes em questão, sejam elas relacionadas com os riscos, benefícios ou quaisquer outros assuntos ligados a este estudo e com o tratamento da doença que o afete. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos e deveres durante a participação no estudo, você deve esclarecê-los com o seu médico. O principal investigador é o Dr. Paulo Ricardo Criado, que pode ser encontrado no endereço Rua: Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 255 3 andar, tel: 30884894 ou pelo celular 86850247.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ouvídio Pires de Campos, 225 – 5 andar – tel.3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 rama 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

8. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

Você poderá retirar seu consentimento, a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que haja qualquer prejuízo quanto à continuidade de seu trabalho nesta instituição, devendo apenas informar ao médico responsável o motivo que o levou a abandonar o estudo, para que esta informação conste na avaliação global dos resultados obtidos com todos os pacientes.

9. Direito de confidencialidade

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

Em hipótese alguma você terá sua identidade divulgada para outras pessoas ou entidades, além daquelas que participam efetivamente do acompanhamento deste estudo. Estarão, também, mantidas em sigilo todas as informações obtidas e que estejam relacionadas com a sua privacidade.

10. Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Você terá o direito de manter-se informado sobre os dados obtidos pelo estudo a qualquer momento.

11. Despesas e compensações.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12. Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Nós pesquisadores nos comprometemos em utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, no estudo intitulado "Transmissão Horizontal de Candidose por *Candida parapsilosis* em Recém-nascidos de Baixo Peso".

Eu discuti com o Dr. **Paulo Ricardo Criado** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data / /

Assinatura da testemunha Data / /

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

Pesquisador Dr. Paulo Ricardo Criado.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP:TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Investigação de candidemia em UTI-N.

2. PESQUISADOR: Prof. Dr. Paulo Ricardo Criado

CARGO / FUNÇÃO: Médico / Dermatologista INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 66343

UNIDADE DO HCFMUSP Departamento de Dermatologia Instituto Central

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO **X**

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 12 meses.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1. Desenho do estudo e objetivo(s)

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa comparar as cepas encontradas no sangue dos Recém-nascidos com as cepas encontradas nas mãos dos atendentes desta UTI - Neonatal. Participando, você estará contribuindo para a descoberta de um novo caminho para o controle das infecções hospitalares.

Antes de tomar uma decisão é importante que você compreenda porque esta pesquisa clínica está sendo realizada e o que ela envolverá. Por favor, leia com atenção este documento, faça as perguntas que desejar e pense bem antes de concordar.

Você, que é o responsável legal do recém-nascido, deve se sentir à vontade para perguntar sobre quaisquer dúvidas ou para pedir maiores informações ao médico da criança e ao médico investigador antes de tomar uma decisão sobre a participação da criança. Se, após a leitura destas informações,

you não concordar em participar da pesquisa, não haverá qualquer prejuízo quanto ao seu trabalho neste hospital.

Se você escolher participar, você poderá retirar seu consentimento a qualquer momento e deixará de participar do estudo, sem que haja qualquer prejuízo quanto à continuidade do seu trabalho no hospital, devendo apenas informar ao médico responsável o motivo que o levou a se retirar do estudo.

O objetivo deste estudo é descobrir se há uma transmissão de *Candida parapsilosis* presente no meio ambiente e conseqüentemente nas mãos dos funcionários para os recém-nascidos de baixo peso.

2. Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros.

Se você decidir pela participação do menor neste estudo e assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, será utilizada uma amostra do sangue coletado para exames de rotina no berçário e não será feita nenhuma outra coleta.

3. Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço; exames radiológicos

Não será necessária a coleta extra de sangue nem outros exames complementares. O único procedimento executado nos recém-nascidos é coleta de sangue de rotina do berçário, onde utilizaremos uma pequena amostra deste material.

4. Desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3.

Este tipo de coleta causará apenas um pequeno desconforto na hora da punção, podendo aparecer um pequeno hematoma no local.

5. Benefícios que poderão ser obtidos

Haverá benefício direto a criança, uma vez que se estabelecerá o diagnóstico de uma candidose sistêmica, se existente e o propiciará o seu adequado tratamento pela equipe de Pediatria do HC-FMUSP. Eventualmente as leveduras do gênero *Candida* podem ser encontradas saprofiticamente no homem, animais e também no solo, água, vegetais e em diversos ambientes, inclusive os hospitalares, podendo causar doenças nos recém-nascidos de baixo peso devido à imaturidade do sistema imune. A participação

da sua criança também estará contribuindo para o estudo desta doença e saber qual o provável meio de transmissão.

6. Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar.

Existem outros procedimentos alternativos para o diagnóstico desta doença se você decidir não participar deste estudo. O seu médico poderá informá-los, caso você deseje não participar do estudo.

6. Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para o esclarecimento de eventuais dúvidas e às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa.

Você tem o direito de questionar o médico responsável pelo acompanhamento do estudo a qualquer momento, no sentido de esclarecer todas as dúvidas decorrentes em questão, sejam elas relacionadas com os riscos, benefícios ou quaisquer outros assuntos ligados a este estudo e com o tratamento da doença que o afete. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos e deveres durante a participação no estudo, você deve esclarecê-los com o seu médico. O principal investigador é o Dr. Paulo Ricardo Criado, que pode ser encontrado no endereço Rua: Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 3 andar, tel: 30884894 ou pelo celular 86850247.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ouvídio Pires de Campos, 225 – 5 andar – tel.3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 rama 26 – E-mail: cappelq@hcnet.usp.br.

7. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

Você poderá retirar seu consentimento, a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que haja qualquer prejuízo quanto à continuidade de seu trabalho nesta instituição, devendo apenas

informar ao médico responsável o motivo que o levou a abandonar o estudo, para que esta informação conste na avaliação global dos resultados obtidos com todos os pacientes.

8. Direito de confidencialidade

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

Em hipótese alguma você terá a identidade da criança divulgada para outras pessoas ou entidades, além daquelas que participam efetivamente do acompanhamento deste estudo. Estarão, também, mantidas em sigilo todas as informações obtidas e que estejam relacionadas com a privacidade da criança.

8. Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Você terá o direito de manter-se informado sobre os dados obtidos pelo estudo a qualquer momento.

9. Despesas e compensações.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

10. Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Nós pesquisadores nos comprometemos em utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, no estudo intitulado "Transmissão Horizontal de Candidose por

Candida parapsilosis em Recém-nascidos de Baixo Peso".

Eu discuti com o Dr. **Paulo Ricardo Criado** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de

despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

Pesquisador Dr. Paulo Ricardo Criado.

9. REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayats J, Jiménez M, Saballs P, Fridkin SK, Morgan J, Rodríguez-Tudela JL, Warnock DW, Pahissa A. Barcelona Candidemia Project Study Group. Epidemiology and Predictors of Mortality in Cases of Candida Bloodstream Infection: Results from Population-Based Surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol*. 2005; 43:1829-35.

Arendrup MC, Fuusd K, Gahrn-Hansen B, Jensen IM, Knudsen JD, Lundgren B, Schonheyder HC, Tvede M. Seminal surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers isolates with reduced azole susceptibility. *J Clin Microbiol*. 2005; 43:4434-40.

Banerjee SN, Emori TG, Culver DH, et al. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980–1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Am J Med*. 1991; 91:86S-9S.

Benjamin DK, Stoll BJ, Fanaroff AA, McDonald AS, Oh W, Higgins RD, Duara S, Poole K, Laptook A, Goldberg R; National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Neonatal candidiasis among extremely low birth weight infants: risk factors, mortality rates, and neurodevelopmental outcomes at 18 and 22 months. *Pediatrics*. 2006; 117:84-92.

Binelli CA, Moretti ML, Assis RS, Sauaia N, Menezes PR, Ribeiro E, Geiger DCP, Mikami Y, Miyaji M, liveira MS, Barone AA, Levin AS. Investigation of the possible association between nosocomial candiduria and *Candidaemia*. *Clin Microbiol Infect*. 2006; 12:538-43.

Blyth CC, Chen SCA, Slavin MA, Serena C, Nguyen Q, Marriott D, Ellis D, Meyer W, Sorrell TC. Not Just Little Adults: Candidemia Epidemiology, Molecular Characterization, and Antifungal Susceptibility in Neonatal and Pediatric Patients. *Pediatrics*. 2009; 123:1360-1368.

Bonassoli LA, Bertoli M, Svidzinski TIE. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *J Hosp Infect*. 2005; 59:159-62.

Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Frempong T, Isenberg HD. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol*. 1994; 32:452-6.

Branchini ML, Aoki FH, Colombo AL, Taguchi H, Yamamoto K, Miyazi M. Effect of antifungal agents on *Candida spp* and *Pichia anomala* isolated from oropharyngeal candidiasis of AIDS patients in a university hospital in Brazil. *The Brazilian J Infect Dis*. 1998; 2:187-196.

Cartón E, Viudes Á, Permán J. Infection sistêmica nosocomial por leveduras. *Rev Iberoam Micol*. 2001; 18:51–55.

Clark TA, Slavinski SA, Morgan J, Lott T, Arthington-Skaggs BA, Brandt ME, Weeb MC, Flowers RH, Fridkin SK, Hajjeh RA. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. *J. Clin Microbiol*. 2004; 42:4468-72.

Clemons KV, Feroze F, Holmberg K, Stevens DA, Comparative Analysis of Genetic Variability among *Candida albicans* Isolates from different geographic Locales by three Genotypic Methods. *J Clin Microbiol*. 1997; June: 1332-1336.

Clerihew L, Lamagni TL, Brocklehurst P, McGuire W. *Candida parapsilosis* infection in very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2007; 92:127-129.

Colombo AL, Nucci M, Salomão R, Branchini, Richtmann, Derossi A, Wey SB. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diag Microbiol Infect Dis*. 1999; 34:281-6.

Costa SF, Marinho I, Araujo EAP, Marique AEI, Medeiros EAS, Levin AS. Nosocomial fungemia: a 2-year prospective study. *Journal of hospital infection*. 2000; 45:69-72.

Deak T, Beuchat LR. Comparison of the SIM, API 20 C and ID 32 C systems for identification of yeasts isolated from fruit juice concentrates and beverages. *J Food Prot*. 1993; 56:585-92.

Diekema DJ, Pfaller MA. Nosocomial candidemia: an ounce of prevention is better than a pound of cure. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004; 25:624-626.

Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, Wenzel RP, Pfaller MA. An outbreak of *Candida parapsilosis* prosthetic valve endocarditis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1997; 29:147-53.

Edmond MB, Wale E, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections in United State hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis*. 1999; 29:239-44.

Edmond MB, Wisplinghoff H, Bischoff T, et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 2004; 39:309-318.

Emori TG; Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Rev*. 1993; 428-442.

Fridkin SK, Jarvis RW. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev*. 1996;9(4):499-511.

Fridkin SK, Kaufman D, Edwards JR, Shetty S, Horan T, National Nosocomial Infections Surveillance System Hospitals. Changing incidence of *Candida* bloodstream infections among NICU patients in the United States: 1995-2004. *Pediatrics*. 2006; 117:1680-7.

Girão E, Levin AS, Basso M, Gobara, S Gomes, LB, Medeiros, EAS. and Costa, SF. Seven-year trend analysis of nosocomial candidemia and antifungal (fluconazole and caspofungin) use in Intensive Care Units at a Brazilian University Hospital Medical. *Mycology*. 2008; 46:6, 581-588

Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo D, Rodriguez B, Almirante A, Pahissa JL, Rodriguez-Tudela M, Cuenca-Estrella and the Barcelona Candidemia Project Study Group Prevalence and Susceptibility Profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: Results from Population-Based Surveillance of Candidemia in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008, 51(4):1506–1509.

Guimarães, M. et al. Pneumonia nosocomial. In: Hinrichsen, S. L., Doenças Infecciosas e Parasitárias. Ed. Medsi/Guanabara-Koogan; Rio de Janeiro, 1^a ed. 2005; 487-488.

Gutierrez J, Lozano C, Coronilla J, Nogales C. Evaluation of the ABT 32 C, Automicrobic system and API 20 C using clinical yeast isolates. *Ann Biol Clin*. 1994; 50: 443-6..

Hong GS; Guarro J, Gené J & Figueras MJ. Atlas of Clinical fungi.2.ad. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000

Huang YC, Lin TY, Lien RI, Chou YH, Kuo CY, Yang PH, Hsieh WS. Candidaemia in Special Care Nurseries: Comparison of Albicans and Parapsilosis Infection. *J Infect*. 2000; 40:171-175.

Huang YC, Su LH, Wu TL, Lin TY. Genotyping analysis of colonizing *Candida* isolates from very-low-birth weight infants in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect*. 2004; 58:200-3.

Jarvis WR; Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. *Clin Infect Dis*. 1995; 20:1526-1530.

Jarvis WR. The epidemiology of colonization. *Infect Control Hosp. Epidemiol*. 1996; 17:47-52.

Karlowicz MG, Hashimoto LN, Kelly RE, Buescher ES. Should central venous catheters be removed as soon as candidemia is detected in neonates? *Pediatrics*. 2000; 106:E63.

Kurtzman CP, Fell JW. The yeasts. A taxonomic study Elsevier S, Amsterdam; 1998.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Vaccari EMH, Melo NT. *Tratado de Micologia Médica Lacaz*. 9a ed. São Paulo: Sarvier; 2002,

Lacerda, R.A. Produção científica nacional sobre infecção hospitalar e a contribuição da enfermagem: ontem, hoje e perspectivas. **Rev Latino-Am Enfermagem**, 2002; 10 (1): 55-63.

Lee B, Cheung P. Comparative study of mortality and morbidity in premature infants (birthweight ,1250 g) with candidemia or candidal meningitis. *Clin Infect Dis* 1998;27: 559—565.

Levin AS, Costa SF, Mussi NS; Basso M, Sinto SI, Machado C, Geiger DC; Villares MCB, Schreiber AZ, Barone AA, Branchini MLM. *Candida parapsilosis* Fungemia Associated with Implantable and Semi-Implantable Central Venous Catheters and the Hands of Healthcare Workers. *Diagn Microbiol Infect. Dis.*1998; 30:243-249.

Linder N, Levit O, Klinger G, Kogan I, Levy I, Shalit I, Ashkenzi S, Sirota L. Risk factors associated with candidemia in the neonatal intensive care unit: a case-control study, *Journal of Hospital Infection.* 2004; 57, 321-324.

Lunel FMV, Meis JFGM, Voss. A Nosocomial fungal infections: candidemia. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999; 34: 213-220.

Lupetti A, Tavanti A, Davini P, Ghelardi E, Corsini V, Merusi I, Boldrini A, Campa M, Senesi S. Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:2363-9.

Luz, M.T. As instituições médicas no Brasil. Instituições e estratégia de hegemonia. Rio de Janeiro (RJ): GRAAL, 1979.

Makhoul I, Kassis I. Review of 49 neonates with acquired fungal sepsis: further characterisation. *Pediatrics* 2001;107: 61—66.

Marko, M. A., Chipperfield, R. & Birnbom, H. C. *Anal. Biochem.* 121, 382 (1982)

Miranda LN, van der Heijden IM, Costa SF, Sousa AP, Sienra RA, Gobara S, Santos CR, Lobo RD, Pessoa VP Jr, Levin AS. *Candida* colonisation as a source for candidaemia. *J Hosp Infect.* 2009; **72**:9-16.

Morgan J, Meltzer MI, Plikaytis BD et al. Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-

based candidemia surveillance. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2005; 6: 540-547.

Mortimer R. and Schild D. *Microbiol. Rev.* 49:181 (1985).

Nantel A. The long hard road to a completed *Candida albicans* genome. *FungalGenet Biol.* 2006; 43:311-5.

Odds FC. *Candida and Candidosis.* Leicester, University Press, 1979.

Pfaller MA. Epidemiological typing methods for mycoses. *Clin. Infect. Dis.* 1992; 14(suppl):S4-S10.

Pfaller MA. Nosocomial fungal infections: Epidemiology of candidiasis. *J Hosp Infect.* 1995; 30 (suppl):329 -338.

Pfaller MA. Epidemiology of fungal infections: the promise of molecular typing. *Clin Infect Dis.* 1996; 20:1535-9,

Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Messer SA, Houston A., Coffman, Hollis RJ. Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in North America and Latin America, 1997–1998. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44:747–751.

Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, et al. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:3254-9.

Pfaller MA, Wenzel RP. The epidemiology of fungal infections. *Candida*. In: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA (eds). *Clinical Mycology*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2003. p. 3-19. .

Powell HL, Sand CA, Rennie RP. Evaluation of CHROMagar *Candida* for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998; 32:201-4.

Rivalier E & Seydel S. Nouveau procedé culture sur lames gélosées applique a l'étude microscope des champignons de teignes. *Ann Parasitol Hum Comp* 1932;10:444-452.

Rodriguez D, Almirante B, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Sanchez F, Gene A, Xercavins M, Fontanals D, Rodriguez-Tudela JL, Warnock DW, Pahissa A - Barcelona Candidemia Project Study Group. Candidemia in Neonatal Intensive Care Units Barcelona, Spain. *Pediatr Infect Dis J*. 2006; **25**:224-229.

Ruiz-Diez B, Martinez V, Alvarez M, Rodriguez-Tudela JL, Martinez-Suarez JV. Molecular tracking of *Candida albicans* in a neonatal intensive care unit: long-term colonizations versus catheter-related infections. *J Clin Microbiol*. 1997; **35**:3032-6.

Sader HS, Pignatari AC. Epidemiologia Molecular no Âmbito Hospitalar. In: Rodrigues EAC. Infecção Hospitalar – *Prevenção e Controle*. São Paulo: Sarvier; 1997, p. 549-560.

Saiman L, Ludington E, Pfaller MA, Rangel-Frausto S, Wiblin RT, Dawson J, Blumberg HM, Patterson JE, Rinaldi M, Edwards JE, Wenzel RP, Jarvis W. Risk factors for candidemia in neonatal intensive care unit patients. *Pediatr Infect Dis J*. 2000; **19**:319-324.

Saiman L, Ludington E, Pfaller M, Rangel-Frausto S, Wiblin T, Dawson J, Blumberg HM, Patterson JE, Rinaldi M, Edwards JE, Wenzel RP, Jarvis W, The National Epidemiology of Mycosis Survey Study Group. Risk factors for candidemia in neonatal intensive care unit patients. *Pediatr Infect Dis J*. 2001; **19**:1119-24.

Sanchez V, Vazquez JA, Barth-Jones D, Dembry L, Sobel JD, Zervos MJ. Nosocomial acquisition of *Candida parapsilosis*: an epidemiologic study. *A J Med* 1993; **94**:577-82.

Sandven P. Epidemiology of candidemia. *Rev Iberoamer Micol*. 2000; **17**:73-81.

Shin JH, Og YG, Cho D, Kee SJ, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Molecular epidemiological analysis of bloodstream isolates of *Candida albicans* from a university hospital over a five-year period. *J Clin Microbiol*. 2005; **43**:546-54.

Soll DR. High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1992; 5: 183-203.

Stoll B, Gordon T, Korones S. 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* 1996; 129:63—71.

Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J Clin Microbiol.* 1998; 36:329-34.

Tavanti A, Davidson AD, Gow N A R, Maiden M C J and Odds F C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To Replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. *Journal of Clinical Microbiology.* 2005; 43(1): 284—292.

Traoré O, Springthorpe VS, Sattar SA. A quantitative study of the survival of two species of *Candida* on porous and non-porous environmental surfaces and hands. *J Appl Microbiol.* 2002; 92:549-555.

Traver C. and Davis R. California Institute of Technology-U.S. Congress. Office of Tecnology Assessment. Mapping our genes the genomic projects: how big. how fast? OTA-BA-3. Washington, D.C. U.S. Government Printing Office (1988).

Van Asbeck EC, Huang YC, Markham AN, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. *Mycopathologia.* 2007; 164:287-293.

Vogelstein, B & Gillespie, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 615. 1979.

Vrione G. & Matsiota-Bernard. Molecular Typing of *Candida* Isolates from Patients Hospitalized in an Intensive Care Unit. *Journal of Infection.* 2001: 42, 50-56.

Weems JJ, Chamberland ME, Ward J, Willy M, Padhye AA, Solomon SL. *Candida parapsilosis* fungemia associated with parenteral nutrition and

contaminated blood pressure transducers. *J Clin Microbiol.* 1987; **25**:1029-1032.

Weems JJ, Chamberland ME, Ward J, Willy M, Padhye AA, Solomon SL, Welbel SF, Mcneil MM, Kuykendall RJ, Lott TJ, Pramanik A, Silberman R, Oberle AD, Bland LA, Aguerro S, Arduino M, Crow S, Jarvis WR. *Candida parapsilosis* bloodstream infections in neonatal intensive care unit patients: epidemiologic and laboratory confirmation of a common source outbreak. *Pediatr Infect Dis J.* 1996; **15**:998-1002.

Wenzel RP. Nosocomial candidemia: Risk factors and attributable mortality. *Clin Infect Dis.* 1995; **20**:1531-1534.

Zaoutis TE, Heydon K, Localio R, Walsh TJ, Chris Feudtner. Outcomes attributable to neonatal candidiasis. *Clin Inf Dis.* 2007; **44**:1187–1193.

Bibliografia Consultada

Aoki FH, Imai T, Tanaka R, Mikami Y, Taguchi H, Nishimura NF, Nishimura K, Miyaji M, Schreiber AZ, Branchimi MLM. New primer pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotype A or B prepared on the basis of random amplified polymorphic DNA fingerprint pattern analyses. *J Clin Microbiol.* 1999; **37**:315-20.

Baker CJ. Nosocomial infections in the NICU: causes and cures. [Topic Symposium: Infections in the NICU: State of the Art 2000]. Program and abstracts of the Pediatric Academic Societies and the American Academy of Pediatrics Year 2000 Joint Meeting; May 12-16, 2000; Boston, Massachusetts.

Baley JE, Kliegman RM, Fanaroff AA. Disseminated fungal infections in very low-birth-weight infants: clinical manifestations and epidemiology. *Pediatrics.* 1984; **73**:144–152.

Barnett JA, Payne RW, Yarrow DY. Characteristics and Identification, 2a ed. Cambridge: *Cambridge University Press.* 1990, p.79-695.

Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol.* 2002; **40**:1244-8.

Boyce JM. It is time for action: improving hand hygiene in hospitals. *Ann Intern Med.* 1999;130:153-155.

Chen KW, Lo HJ, Lin YH, Li SY. Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of *Candida albicans* clinical isolates in Taiwan. *J Med Microbiol.* 2005; 54:249-58.

Chu G, Vollrath D, Davis RW. Separation of large DNA molecules by contourclamped homogeneous electric fields. *Science.* 1986; 234:1582-5.

Coleman DC, Rinaldi MG, Haynes KA, Rex JH, Summerbel RC, Anaisse EL, Sullivan DJ. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Medical Mycology.* 1998; 36(suppl1):156-165.

Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouer AS, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, Wannock D, Morgan J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:2816-23.

Gales AC, Mamizuka EM. Tipagem epidemiológica de microorganismos. In: Levy CE (coord.). *Manual de Microbiologia Clínica Aplicada ao Controle de Infecção Hospitalar.* 2a ed. São Paulo: Associação Paulista de Estudos e Controle de Infecção Hospitalar; 2004. p 158-68.

Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections. *Am J Infect Control.* 1988; 16:128-40.

Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial Infections *Am J Infect Control.* 1998; 16(3).

Gil-Lamaignere C, Roilides E, Hacker J, Müller FMC. Molecular typing for fungi-a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. *Clin Microbiol Infect.* 2003; 9: 172-85.

Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* 2003; 37:1172-7.

Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8:462-78.

Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial infections in pediatric patients. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1987; 6: 344-351.

Kaufmann ME. Field Gel Electrophoresis. In: Woodford N, Johnson AP. *Methods in molecular medicine: molecular bacteriology: protocols and clinical applications*. Totowa, NJ, 1996. v. 15, p. 33-4.

Kaufman D, Fairchild KD. Clinical Microbiology of Bacterial and Fungal Sepsis in Very-Low-Birth-Weight Infants. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17:638–680.

Marais E, Stewart R, Duse AG, Rosekilly IC, Jong G, Aithma N. *Candida parapsilosis* detected in TPN using the BacT/Alert system and characterized by randomly amplified polymorphic DNA. *J Hosp Infect.* 2004; 56:291-6.

Marco F, Lockhart SR, Pfaller MA, et al. Elucidating the origins of nosocomial Melo ASA, Almeida LP, Colombo L.; Briones MRS. Evolutionary distances and identification of *Candida* species in clinical isolates by Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Mycopathologia*. 1998; 142: 57-66.

Pfaller MARN, Jones GV. Doern AC, Fluit J, Verhoef HS, Sader SA, Messer A, Houston S, Coffman RJ. Hollis, et al. International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species in the European SENTRY program: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999; 35:19–25.

Posteraro B, Bruno S, Boccia S, Ruggiero A, Sanguinetti M, Spica VR, Ricciard G, Fadda G. *Candida parapsilosis* bloodstream infection in pediatric oncology patients: results of an epidemiologic investigation. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004; 25:641-5.

Rentz AM, Halpern MT, Bowden R. The impact of candidemia on length of hospital stay, outcome, and overall cost of illness. *Clin Infect Dis.* 1998; 27:781-8.

Rho J, Shin JH, Song JW, Park MR, Kee SJ, Jang SJ, Park YK, Suh SP, Ryang DW. Molecular investigation of two consecutive nosocomial clusters of

Candida tropicalis using pulsed-field gel electrophoresis. *J Microbiol.* 2004; 42:80-6.

Saunders NA, Clewley JP. DNA amplification. In: Woodford N, Johnson AP. *Methods in molecular medicine: molecular bacteriology: protocols and clinical applications*. Totowa, NJ, 1996;15:63-79.

Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome sized DNAs by pulsed field electrophoresis. *Cell.* 1984; 37:67-75.

Shin HJ, Kee SJ, Shin MG, KIM SH, Shin DH, Lee SK, Suh SP, Ryang DW. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:1244-8.

Shin JH, Shin DH, Song JW, Kee SJ, Suh SP, Ryang DW. Electrophoretic karyotype analysis of sequential *Candida parapsilosis* isolates from patients with persistent or recurrent fungemia. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:1258-63.

Uden V & Buckley HR. Genus 2. *Candida* Berkout apud Lodder J. In: *The Yeasts*. Amsterdam, North – Holland 1970, 893-1087.

Webb MC, Flowers RH, Fridkin SK, Hajjeh RA. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:4468-72.

Zancopé-Oliveira RM, James MJ, Derossi AP, Sampaio JL, Muniz MM, Li RK, Nascimento AS, Peralta JM, Reiss E. Strain characterization of *Candida parapsilosis* fungemia by molecular typing methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000; 1:514-20.

10. APÊNDICE

Tabela 6 – Dados recuperados dos prontuários dos recém-nascidos com candidemia

RN	IG	PN	TP	Sexo	DN	UI	D	DTD	DI
1	28 5/7 sem	620	cesárea	F	29/04/2004	EBEN	óbito	03/06/2004	34
2	36 1/7 sem	me ma	cesárea	F	22/09/2004	EBEA	óbito	23/11/2004	61
3	29 6/7 sem	1.100	cesárea	M	25/10/2004	EBEN	alta	31/12/2004	66
4	27 2/7 sem	1.140	cesárea	F	10/11/2004	EBEN	óbito	23/12/2004	43
5	28 1/7 sem	1.180	cesárea	F	15/12/2004	UBER	óbito	29/01/2005	44
6	26 sem	630	cesárea	F	19/01/2005	EBEN	óbito	26/02/2005	37
7	26 3/7 sem	940	cesárea	M	16/01/2005	UBER	óbito	28/02/2005	42
8	30 5/7 sem	1.670	cesárea	F	23/01/2005	EBEN	alta	08/03/2005	45
9	32 2/7 sem	1.220	cesárea	F	26/04/2005	UBER	alta	28/06/2005	62
10	29 4/7 sem	1.570	cesárea	F	08/06/2005	UBER	alta	23/07/2005	45
11	28 4/7 sem	780	cesárea	F	26/06/2005	EBEI	óbito	02/08/2005	36
12	-	1.100	cesárea	M	25/05/2005	UBER	alta	09/08/2005	74
13	-		cesárea	M	04/12/2003	UBEI		16/02/2004	72
14	-	1.290	cesárea	M	16/11/2004	UBER	alta	05/01/2005	49
15	31 sem	1.640	cesárea	M	29/11/2004	UBER	alta	20/01/2005	51
16	33 4/7 sem	1.770	cesárea	F	29/04/2005	UBER	alta	06/06/2005	37
17	27 3/7 sem-	740	cesárea	F	06/01/2005	UBER	Óbito	18/01/2005	12
18	26 sem-	680	cesárea	M	05/09/2004	UBER	alta	14/10/2004	39
19	26 3/7sem-	650	cesárea	F	01/05/2004	UBER	Óbito	04/06/2004	33
20	27 sem-	830	cesárea	M	24/09/2004	UBER	óbito	14/10/2004	20

Observação: RN – recém-nascidos; RG – registro geral; IG – idade gestacional; PN – peso ao nascer; TP – tipo de parto; M sexo masculino; F – sexo feminino; DN – data de nascimento; UI – unidade de internação; D – destino; DTD – data destino

Tabela 6 – Dados recuperados dos prontuários dos recém-nascidos com candidemia (continuação)

RN	Apgar 1'	Apgar 5'	Apgar 10'	CVCdi	CVCdr	cvcd	npti	nptt	nptd	HC1t
1	2	6	7	03/05/2004	16/05/2004	13	01/05/2004	16/05/2004	15	16/05/2004
2	7	8	8	13/10/2004	29/10/2004	16	29/09/2004	29/10/2004	30	29/10/2004
3	8	9	9	27/10/2004	21/11/2004	24	28/10/2004	21/11/2004	23	21/11/2004
4	9	9	9	18/11/2004	21/11/2004	03	11/11/2004	21/11/2004	10	21/11/2004
5	-	10	10	22/12/2004	19/01/2005	27	17/12/2004	19/01/2005	32	19/01/2005
6	1	6	7	20/01/2005	27/01/2005	07	10/01/2005	27/01/2005	17	27/01/2005
7	0	6	6	20/01/2005	02/02/2005	12			0	11/02/2005
8	3	7	9	31/01/2005	13/02/2005	13	24/01/2005	13/02/2005	19	13/02/2005
9	6	8	10			0	28/04/2005	02/05/2005	4	02/05/005
10	7	8	9	10/06/2005	24/06/2005	14	11/06/2005	24/06/2005	13	24/06/2005
11	3	7	9	01/07/2005	22/07/2005	21	30/06/2005	22/07/2005	22	22/07/2005
12	5	7	9	27/05/2005	14/06/2005	17	27/05/2005	14/06/2005	17	14/06/2005
13										24/12/2003
14	7	10	10	19/11/2004	29/11/2004	10	19/11/2004	29/11/2004	10	29/11/2004
15	8	9	10	18/12/2004	24/12/2004	06	18/12/2004	24/12/2004	06	21/12/2004
16	8	9	10	06/05/2005	19/05/2005	13	09/05/2005	03/06/2005	24	12/05/2005
17	4	7	10	08/01/2005	18/01/2005	10	08/01/2005	18/01/2005	10	17/01/2005
18	1	3	6	07/09/2004	15/09/2004	08	07/09/2004	15/09/2004	8	15/09/2004
19	3	7	10	03/05/2004	21/05/2004	18	03/05/2004	21/05/2004	18	21/05/2004
20	4	10	10	25/09/2004	14/10/2004	19	26/09/2004	09/10/2004	13	13/10/2004

Observação: DI – dias de internação; CVCdi – data da introdução do CVC; CVCdr – data da retirada do CVC; CVCd – dias com CVC; npti – início da nutrição parenteral; nptt – retirada da nutrição parenteral; nptd – dias com a npt; HC1 – primeira hemocultura positiva; Apgar – índice de Apgar.