



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



ILMD  
INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
Fiocruz Amazônia

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ**  
**INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONDIÇÕES DE VIDA E SITUAÇÕES**  
**DE SAÚDE NA AMAZÔNIA**

**THAIS MOREIRA GAMA**

**MICROBIOTA ORAL E FUNGEMIA: ANÁLISE DA POSSÍVEL RELAÇÃO EM**  
**PACIENTES NEONATAIS E PEDIÁTRICOS INTERNADOS EM UTI**

**Manaus - AM**

**2022**



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



ILMD  
INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
Fiocruz Amazônia

**THAIS MOREIRA GAMA**

**MICROBIOTA ORAL E FUNGEMIA: ANÁLISE DA POSSÍVEL RELAÇÃO EM  
PACIENTES NEONATAIS E PEDIÁTRICOS INTERNADOS EM UTI**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Saúde Pública, área de concentração Determinantes Socioculturais, Ambientais e Biológicos do Processo Saúde-Doença-Cuidado na Amazônia.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. ANI BEATRIZ JACKISCH MATSUURA**

**Manaus - AM**

**2022**

## FICHA CATALOGRÁFICA

G184m

Gama, Thais Moreira

Micobiota oral e fungemia: análise da possível relação em pacientes neonatais e pediátricos internados em UTI. / Thais Moreira Gama. - Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2022.

137 f.

Dissertação (Mestrado em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2022.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ani Beatriz Jakisch Matsuura.

1. Fungemia 2. Tratamento intensivo neonatal I. Título

CDU 576.8(043.3)

CDD 579.374

22. ed.



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



ILMD  
INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
FioCruz Amazônia

**THAIS MOREIRA GAMA**

**MICROBIOTA ORAL E FUNGEMIA: ANÁLISE DA POSSÍVEL RELAÇÃO EM  
PACIENTES NEONATAIS E PEDIÁTRICOS**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Saúde Pública, área de concentração Determinantes Socioculturais, Ambientais e Biológicos do Processo Saúde-Doença-Cuidado na Amazônia.

**Aprovada em:** 08 de abril de 2022.

**Banca Examinadora**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ani Beatriz Jachisck Matsuura  
Instituto Leônidas e Maria Deane - ILMD/FIOCRUZ

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Shirley Maria de Araújo Passos  
Universidade do Estado do Amazonas – UEA

Prof<sup>o</sup>. Dr. Fernando José Herkrath  
Instituto Leônidas e Maria Deane - ILMD/ FIOCRUZ

Dedico este trabalho a cada recém-nascido e criança hospitalizada em Unidade de Terapia Intensiva, especialmente aos envolvidos desta pesquisa, cujas contribuições serão perpetuadas em melhorias na assistência à saúde e no cuidado integral.

Também dedico aos meus familiares, orientadora, amigos, pois foram essenciais para conclusão desta caminhada árdua, porém, transformadora.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus. Por conceder sabedoria, inteligência e perseverança para conduzir esta pesquisa e as demais atividades do mestrado.

À minha amada família, por todo suporte e palavras de apoio. Sem vocês, eu não chegaria a este momento, mais uma vitória por vocês.

À Dr<sup>a</sup> Ani Matsuura, uma inspiração como profissional na área acadêmica e científica. Grata pela orientação humanizada, ética e por todo aprendizado repassado a mim.

As amizades conquistadas em sala de aula e laboratório, foram apoio emocional. Obrigada a todos que deixaram este percurso repleto de bons momentos.

Ao Márcio Jacaúna, meu companheiro nesta trajetória, desde a inscrição para o processo seletivo. Meu ombro amigo e incentivador, esta conquista é nossa.

À Fiocruz Amazônia e PPGVIDA, juntamente com seu corpo docente e funcionários. Grata por realizar o mestrado acadêmico nesta instituição renomada, que me permitiu desenvolver profissionalmente, bem como, potencializar competências para desafios futuros.

À Fundação de Amparo e Pesquisa (FAPEAM) pelo investimento concedido.

À Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas (FGV) pela orientação e apresentação às Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) das unidades hospitalares.

Ao laboratório Reunidos, em especial ao farmacêutico Kléber, pelo fornecimento das amostras. Ao Dr. Antônio Alcirley pelas contribuições nas análises estatísticas deste estudo.

As unidades hospitalares da SES-AM e seus funcionários, grata pelo espaço cedido. Aos familiares que me permitiram realizar o estudo. E principalmente, aos recém-

nascidos e crianças, este trabalho possui a finalidade de melhorar a situação clínica de pacientes futuros, sem vocês não seria possível.

Deste modo, posso afirmar que após esta imersão em Unidades de Terapia Intensiva, minha concepção sobre a vida e relação profissional-paciente mudou.

Gratidão a todos!

*“Àquele que é capaz de fazer infinitamente mais do que tudo o que pedimos ou pensamos, de acordo com o seu poder que atua em nós, a Ele seja a glória na igreja e em Cristo Jesus, por todas as gerações, para todo o sempre! Amém!”*

*Efésios 3:20-21*

## RESUMO

**Objetivo:** Verificar a relação da micobiota presente na cavidade oral de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva neonatal e pediátrica (UTIN e UTI-ped) de Maternidades e Hospitais Infantis Públicos/Privado de Manaus e a ocorrência de fungemia. **Métodos:** Trata-se de um estudo realizado em 04 unidades hospitalares (maternidades e hospitais infantis), cujo público-alvo foram neonatos, lactentes e crianças internadas em unidades de terapia intensiva entre julho e novembro de 2021. Com abordagem descritiva e longitudinal, o perfil epidemiológico e clínico foi investigado por meio de prontuários médicos. As leveduras presentes na região orofaríngea foram identificadas através de metodologia convencional e molecular, bem como, utilizou-se a técnica Multilocus Sequence Typing (MLST) para análise e correlação dos genótipos de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* isolados da cavidade oral e de hemoculturas provenientes de pacientes infantis com fungemia. **Resultados:** Participaram da pesquisa 107 pacientes infantis. Em UTIN observou-se que a maioria dos pacientes neonatos eram prematuros, de baixo peso, sexo masculino, com idade gestacional média de 33,9 semanas, nascidos de parto cesariana e um percentual de óbitos de 12%. Na UTI pediátrica (lactentes e crianças) houve predominância do gênero masculino, raça/cor parda, idade média de 02 meses e 03 anos, respectivamente, cujo motivo de internação mais frequente foi a pneumonia. A espécie *C. albicans* foi a levedura mais isolada da cavidade oral, visto que em UTIN *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. haemulonis* foram de maior ocorrência e em UTI-ped houve isolamento majoritário de *C. albicans* e *C. tropicalis*. De modo geral, 05 pacientes apresentaram fungemia, sendo 04 neonatos com idade média de 28 dias de vida, idade gestacional média de 31,5 semanas (pré-termo precoce), sexo feminino, raça parda e peso médio de 1339 g, na qual sepse, prematuridade e pneumonia foram os motivos de internação mais relatados. *Candida albicans* foi a levedura mais isolada de hemoculturas positivas, seguida de *C. tropicalis* e *Cyberlindnera fabianni*. Ademais, o genótipo mais comum de *C. albicans* foi o DST435, tanto em mucosa oral quanto em corrente sanguínea e para *C. tropicalis* identificou-se o DST147. E ao correlacionar leveduras da cavidade oral e corrente sanguínea por meio da técnica MLST, constatou-se 02 pacientes com DSTs idênticos de *C. albicans* em ambos os sítios, dado que, um DST identificado configura provavelmente como novo genótipo. **Conclusão:** Observou-se perfis epidemiológicos distintos para cada faixa-etária, embora os motivos de internação, comorbidades e uso de dispositivos hospitalares apresentarem similaridades. A espécie *C. albicans* foi a levedura predominante na região orofaríngea e de hemoculturas, assim como, identificou-se através do MLST diversidade genética na região oral de pacientes infantis críticos. Por fim, dois neonatos apresentaram genótipos de *C. albicans* idênticos em cavidade oral (colonização prévia) e corrente sanguínea, tal fato representa uma evidência de que a cavidade oral pode servir como fonte para o acometimento de fungemia.

**Palavras-chave:** Unidade de Terapia Intensiva Neonatal; Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica; Fungemia; Cavidade oral; Tipagem de Sequência Multilocus.

## ABSTRACT

**Objective:** To verify the relationship between the mycobiota present in the oral cavity of patients hospitalized in Neonatal and Pediatric Intensive Care Units (NICU and ICU-ped) of Maternity Hospitals and Public/Private Children's Hospitals in Manaus and the occurrence of fungemia. **Methods:** It is treated of a study performed at four hospital units (maternity and children's hospitals), whose target public were neonates, infants and hospitalized children in intensive care units from July to November 2021. Utilizing a descriptive and longitudinal approach, the Epidemiological and clinical profile was investigated with consulting medical records. The yeasts present in the oropharynx were identified by means of conventional and molecular methodology, just as The *Multilocus Sequence Typing* (MLST) technique was used for analysis and correlation of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* genotypes isolated stemming the oral cavity and blood cultures from children with fungemia. **Results:** 107 child patients participated in the research. In the NICU, it was observed that most newborn patients were premature, low weight, male, with a mean gestational age of 33.9 weeks, born by cesarean section and a percentage of deaths was 12%. In the pediatric ICU (infants and children) there was a predominance of males, mixed race/color, mean age of 02 months and 03 years, respectively, whose most frequent reason for hospitalization was pneumonia. The species *C. albicans* was the most isolated yeast from the oral cavity, since in NICU *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. haemulonis* were more frequent and in the ped-ICU there was a majority isolation of *C. albicans* and *C. tropicalis*. In general, 05 patients presented fungemia, being 04 neonates with a mean age of 28 days of life, mean gestational age of 31.5 weeks (early preterm), female, mixed race and mean weight of 1339 g, in which sepsis, prematurity and pneumonia were the most reported reasons for hospitalization. *Candida albicans* was the preponderant isolated yeast from positive blood cultures, followed by *C. tropicalis* and *Cyberlindnera fabianni*. Furthermore, the most common genotype of *C. albicans* was STD435, both in the oral mucosa and in the bloodstream, and STD147 was identified for *C. tropicalis*. Therefor when correlating yeasts from the oral cavity and bloodstream through the MLST technique, it was found 02 patients with identical STDs of *C. albicans* at both sites, since an identified STD is likely to be a new genotype. **Conclusion:** Different epidemiological profiles were observed for each age group, although the reasons for hospitalization, comorbidities and use of hospital devices were similar. The species *C. albicans* was the predominant yeast in the oropharyngeal region and blood cultures, as well as genetic diversity was identified through the MLST in the oral region of critically ill children. Finally, two neonates had identical *C. albicans* genotypes in the oral cavity (previous colonization) and bloodstream, this fact represents evidence that the oral cavity can serve as a source for fungemia involvement.

**Key words:** Neonatal Intensive Care Unit; Pediatric Intensive Care Unit; Fungemia; Oral cavity; Multilocus Sequence Typing.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos microrganismos notificados como agentes etiológicos de IPCSL associados a CVC em pacientes de UTI neonatal. Brasil, 2018.....	21
Figura 2. Distribuição dos principais microrganismos notificados como agentes etiológicos de IPCSL associada a CVC em pacientes neonatos hospitalizados em UTI, por região geográfica. Brasil, 2016.....	22
Figura 3. Distribuição dos microrganismos notificados como agentes etiológicos de IPCSL associados a CVC em pacientes de UTI pediátrica. Brasil, 2018. ....	27
Figura 4. Distribuição dos principais microrganismos notificados como agentes etiológicos de IPCSL associada a CVC em pacientes hospitalizados em UTI pediátrica, por região geográfica. Brasil, 2016. ....	27
Figura 5. Leveduras isoladas da cavidade oral de pacientes internados em UTIN e UTI-ped de unidades hospitalares estudadas em Manaus – AM, entre os meses de julho e novembro de 2021. (A) Meio CHROmagar: colônias esverdeadas, opacas, com bordas delimitadas e em meio Sabouraud: colônias brancas, opacas e com bordas delimitadas; (B) Meio CHROmagar: crescimento de colônias azuis, de aspecto metalizado, halo azulado; (C) Meio CHROmagar: colônias brancas com centro rosado, com bordas delimitadas e aspecto opaco .....	62
Figura 6. Gel de agarose dos isolados clínicos provenientes da cavidade oral de pacientes internados em UTIN e UTI-ped de 04 unidades hospitalares localizadas em Manaus – AM, nos meses de julho e novembro de 2021. Em sequência: Marcador Ladder 100bp (M), <i>Cyberlindnera fabianni</i> (1), <i>Candida duobushaemulonii</i> (2), <i>Candida parapsilosis</i> (3), <i>Candida parapsilosis</i> (4), <i>Candida thasaenensis</i> (5), <i>Candida haemulonis</i> (6), ZO-FPS2 (não amplificado), <i>Candida parapsilosis</i> (8) e controle positivo (9).....	63
Figura 7. Isolados de <i>C. orthopsilosis</i> (A), <i>C. albicans</i> (B) e <i>C. tropicalis</i> (C) em meio CHROmagar.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 8. . Gel de agarose de um isolado de <i>C. albicans</i> amplificado para os sete genes estudados pela técnica MLST provenientes de um paciente internado em UTIN e UTI-ped de uma unidade hospitalar localizada em Manaus – AM, nos meses de julho	

e novembro de 2021. Marcador Ladder (M); gene AAT1a (A); gene MPIb (B); gene AAC1 (C); gene ADP1 (D); gene SYA1 (E); gene VPS13 (F) e gene ZWF1b (G).....75

Figura 9. Gel de agarose de um isolado de *C. tropicalis* amplificado para os seis genes estudados pela técnica MLST provenientes de um paciente internado em UTIN e UTI-ped de uma unidade hospitalar localizada em Manaus – AM, nos meses de julho e novembro de 2021. Marcador Ladder (M); gene SAPT4 (A); gene XYR1 (B); gene SAPT2 (C); gene ZWF1a (D); gene ICL1 (E) e gene MDR1 (F).....76

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Lista de fragmentos de genes que foram amplificados no ensaio do MLST para <i>C. albicans</i> com as sequências dos respectivos primers. ....	51
Quadro 2. Lista de fragmentos de genes que foram amplificados no ensaio do MLST para <i>C. tropicalis</i> com as sequências dos respectivos primers. ....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil epidemiológico e clínico de pacientes internados em UTIN e UTI-ped de 04 unidades hospitalares localizadas em Manaus – AM, durante os meses de julho a novembro de 2021 .....	58
Tabela 2. Diagnóstico clínico dos pacientes hospitalizados em UTIN e UTI-ped de 04 unidades hospitalares localizadas em Manaus – AM, durante os meses de julho a novembro de 2021. ....	59
Tabela 3. Doenças de base de pacientes hospitalizados em UTIN e UTI-ped de 04 unidades hospitalares localizadas em Manaus – AM, durante os meses de julho a novembro de 2021. ....	60
Tabela 4. Tratamento antimicrobiano de pacientes hospitalizados em UTIN e UTI-ped de 04 unidades hospitalares localizadas em Manaus – AM, durante os meses de julho a novembro de 2021. ....	61
Tabela 5. Hospitais infantis e maternidades estudadas em Manaus – AM entre julho e novembro de 2021, pacientes internados em UTI neo e UTI-ped e suas respectivas faixas etárias, além de espécies isoladas da cavidade oral .....	64
Tabela 6. Unidades hospitalares estudadas em Manaus – AM, entre os meses de julho e novembro de 2021 e suas respectivas condutas em relação aos cuidados bucais	66
Tabela 7. Perfil epidemiológico e clínico de pacientes com fungemia internados em 02 unidades hospitalares localizadas em Manaus – AM, entre os meses de julho e novembro de 2021. ....	68
Tabela 8. Motivo de internação dos pacientes com fungemia internados em 02 unidades hospitalares localizadas em Manaus – AM, entre os meses de julho e novembro de 2021. ....	68
Tabela 9. Uso de antibióticos em pacientes com fungemia em 02 unidades hospitalares localizadas em Manaus – AM, entre os meses de julho e novembro de 2021 .....	69
Tabela 10. Pacientes internados em UTIN e UTI-ped com fungemia entre os meses de julho e novembro de 2021 de 02 unidades hospitalares localizadas em Manaus-AM, suas respectivas faixas etárias, espécies isoladas de hemoculturas, antifúngicos de escolha, duração do tratamento e desfecho.....	69

Tabela 12. Isolados da cavidade oral e corrente sanguínea dos pacientes casos e controles (sem fungemia) internados em UTIN e UTI-ped de 02 unidades hospitalares localizadas em Manaus – AM, entre os meses de julho e novembro de 2021 .....	72
Tabela 13. Unidades hospitalares e os respectivos crescimentos microbianos de pacientes internados em UTIN e UTI-ped de 04 unidades hospitalares localizadas em Manaus – AM, entre os meses de julho e novembro de 2021.....	73
Tabela 14. Genes sequenciados, alelos encontrados, alelo mais comum, quantidade de alelos diferentes e os respectivos tamanhos e amplicons dos isolados de <i>C. albicans</i> proveniente de pacientes internados em UTIN com diagnóstico de fungemia, entre julho e novembro de 2021.....	76
Tabela 15. Genes sequenciados, alelos encontrados, alelo mais comum, quantidade de alelos diferentes e tamanho dos amplicons dos isolados de <i>C. tropicalis</i> proveniente de um paciente internado em UTI-ped com diagnóstico de fungemia, em agosto de 2021 .....	78
Tabela 16. Paciente 01, infantil, internada em UTI-ped no hospital infantil localizado em Manaus- AM no ano de 2021, suas respectivas coletas em cavidade oral e sangue, espécies isoladas, alelos correspondentes a cada gene e genótipos de <i>C. tropicalis</i> .....	79
Tabela 17. Paciente 02, neonato, internado em UTIN no hospital infantil localizado em Manaus- AM no ano de 2021, faixa etária, respectivas coletas em cavidade oral e sangue, espécies isoladas, alelos correspondentes a cada gene e genótipos de <i>C. albicans</i> .....	799
Tabela 18. Paciente 04, neonato, internado em UTIN no hospital infantil localizado em Manaus- AM no ano de 2021 respectivas coletas em cavidade oral e sangue, espécies isoladas, alelos correspondentes a cada gene e genótipos de <i>C. albicans</i> .....	80
Tabela 19. Paciente 05, internado em UTIN no hospital infantil localizado em Manaus- AM no ano de 2021, respectivas coletas em cavidade oral e sangue, espécies isoladas, alelos correspondentes a cada gene e genótipos de <i>C. albicans</i> .....	810
Tabela 20. Pacientes controles, neonatos, sem quadro de infecção fúngica invasiva em UTI neonatal localizado em Manaus – AM no ano de 2021, coletas em cavidade oral, espécies isoladas, alelos correspondentes a cada gene e genótipos de <i>C. albicans</i> .....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAT1 – Asparato aminotransferase  
ACC1 – Acetil coenzima A carboxilase  
ADP1 – Permease ATP-dependente  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
CCIH – Comissão de Controle de Infecção Hospitalar  
CVC – Cateter venoso central  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
DST – Diploid Sequence Type  
et al. – e colaboradores  
ICL1 – Isocitrato-liase  
ICS – Infecção de Corrente Sanguínea  
IFI – Infecção fúngica invasiva  
IG – Idade gestacional  
ILMD – Instituto Leônidas e Maria Deane  
IPCS – Infecções Primárias de Corrente Sanguínea  
IPCSL - Infecções Primárias de Corrente Sanguínea Laboratorialmente Confirmadas  
IRAS – Infecção Relacionada à Assistência à Saúde  
MDR1 – Proteína de resistência a múltiplas drogas  
MLST – Multilocus Sequence Typing  
MPIb – Manose fosfato isomerase  
pb – pares de base  
PCR – Reação em cadeia de polimerase  
PFGE – Pulsed field gel electrophoresis  
SAPT2 – Protease aspártica secretada 2  
SAPT4 – Protease aspártica secretada 4  
SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único  
SYA1 – Alanil-RNA sintetase  
UTIN – Unidade Intensiva Neonatal  
UTI-ped – Unidade Intensiva Pediátrica  
VPS13 – Proteína vacuolar  
XYR1 – Xilose redutase I ou II  
ZWF1 – Glicose-6-fosfato desidrogenase  
ZWF1a – Putativa glicose-6-fosfato desidrogenase

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	7
2 JUSTIFICATIVA .....	10
3 OBJETIVOS .....	12
3.1 Objetivo Geral .....	12
3.2 Objetivos Específicos .....	12
4 REVISÃO DE LITERATURA .....	13
4.1 INFECÇÃO FÚNGICA INVASIVA EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL E PEDIÁTRICA .....	13
4.2 CANDIDEMIA .....	16
4.2.1 EPIDEMIOLOGIA .....	17
4.2.2 GÊNERO <i>CANDIDA</i> .....	18
4.2.3 ESPÉCIES <i>CANDIDA ALBICANS</i> E <i>NÃO-ALBICANS</i> .....	19
4.3 CANDIDEMIA EM PACIENTES NEONATOS .....	21
4.4 CANDIDEMIA EM PACIENTES PEDIÁTRICOS .....	25
4.5 MICROBIOTA ORAL DE NEONATOS E CRIANÇAS .....	29
4.5.1 MICROBIOTA ORAL E <i>CANDIDA</i> .....	31
4.6 CAVIDADE ORAL E UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA .....	32
4.7 MICROBIOTA ORAL E FUNGEMIA (CANDIDEMIA) .....	36
4.8 TIPAGEM DE SEQUÊNCIA MULTILOCUS (MLST) .....	38
4.8.1 USO DE MLST PARA TIPAGEM DE <i>CANDIDA</i> .....	39
4.8.1.1 MLST E <i>CANDIDA ALBICANS</i> .....	40
4.8.1.2 MLST E <i>CANDIDA TROPICALIS</i> .....	42
5 ESTRATÉGIAS METODOLÓGICAS .....	44
5.1 TIPO DE PESQUISA .....	44

5.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO E POPULAÇÃO DE INTERESSE .....	44
5.3 PLANO DE RECRUTAMENTO E NÚMERO DE SUJEITOS DA PESQUISA ..	44
5.3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO: .....	45
5.3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO: .....	45
5.4 PLANO DE COLETA DE DADOS .....	45
5.5 AMOSTRAS .....	46
5.5.1 COLETA DAS AMOSTRAS .....	46
5.6 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS.....	47
5.7 TIPAGEM MOLECULAR POR SEQUENCIAMENTO DE MULTILOCUS (MLST) DE <i>CANDIDA</i> .....	50
5.7.1 EXTRAÇÃO DO DNA DAS AMOSTRAS ESTUDADAS .....	50
5.7.2 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DOS GENES SELECIONADOS PARA O ESTUDO DO MLST .....	50
5.7.3 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DOS FRAGMENTOS DOS GENES ESCOLHIDOS .....	53
5.7.4 IDENTIFICAÇÃO DOS SÍTIOS POLIMÓRFICOS.....	54
5.7.5 INTRODUÇÃO DAS SEQUÊNCIAS NO WEBSITE OFICIAL DO MLST PARA COMPARAÇÃO COM A BASE DE DADOS .....	54
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	55
5.9 ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS DA PESQUISA.....	55
5.10. ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS.....	56
6 RESULTADOS .....	57
6.1 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E CLÍNICO DOS PACIENTES INTERNADOS EM UTIN E UTI-PED .....	57
6.2 CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA ORAL DE PACIENTES INTERNADOS EM UTIN E UTI-PED.....	62
6.3 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E CLÍNICO DOS PACIENTES INTERNADOS EM UTIN E UTI-PED COM FUNGEMIA.....	67

6.4 ISOLADOS DE HEMOCULTURAS E CAVIDADE ORAL DOS PACIENTES COM FUNGEMIA, TRATAMENTO, PACIENTES CONTROLES.....	69
6.5 UNIDADES HOSPITALARES: CRESCIMENTO MICROBIANO EM CAVIDADE ORAL DE PACIENTES INTERNADOS EM UTI.....	72
6.6 TÉCNICA MLST: GENÓTIPOS DAS ESPÉCIES DE <i>CANDIDA</i> ISOLADAS DA CAVIDADE ORAL E CORRENTE SANGUÍNEA DE PACIENTES COM CANDIDEMIA.....	74
6.7 TÉCNICA MLST: POSSÍVEL RELAÇÃO ENTRE GENÓTIPOS DAS ESPÉCIES <i>C. ALBICANS</i> E <i>C. TROPICALIS</i> DA CAVIDADE ORAL E CORRENTE SANGUÍNEA.....	78
7 DISCUSSÃO .....	82
8 CONCLUSÃO.....	94
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
APÊNDICE A .....	111
APÊNDICE B .....	113
APÊNDICE C .....	115
APÊNDICE D .....	116
ANEXO A.....	117

## 1 INTRODUÇÃO

O cuidado integral e adequado a recém-nascidos e crianças hospitalizadas em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal e Pediátrica (UTIN/UTI-ped) tem sido um dos desafios para reduzir os índices de mortalidade infantil no Brasil. Tal fato, justifica-se pela vulnerabilidade dos mesmos em adquirir doenças, procedimentos invasivos e pelo aparecimento de microrganismos resistentes nestes ambientes, uma vez que infecções fúngicas sistêmicas apresentam um crescimento significativo como causa de óbitos em pacientes infantis.

Pacientes pediátricos e principalmente neonatais hospitalizados são considerados uma população suscetível a fungemia, pois apresentam singularidades inerentes nesta fase da vida. A candidemia em recém-nascidos é conhecida como a terceira causa de sepse tardia em UTIN, a nível mundial, apresentando mortalidade de 15% a 59%, bem como, pacientes pediátricos onde a taxa global de mortalidade intra-hospitalar varia de 15,8% a 47%, especialmente na América Latina com elevado percentual de 45%. No entanto, pesquisas nos Estados Unidos e União Europeia observaram um declínio na incidência de sepse fúngica nestes pacientes devido a estudos epidemiológicos e implementação de medidas preventivas, porém, afirmam que a evolução para óbito ainda é um fator crítico (GONDIM et al., 2009; MOTTA et al., 2017; PANA et al., 2017; WALSH et al., 2019).

A espécie *Candida albicans*, importante agente de fungemia, é considerada um patógeno potencial em ambientes nosocomiais, pois demonstra predomínio de 60% em isolados positivos de hemocultura. Entretanto, as espécies não-*albicans* tem emergido no cenário mundial, a saber: *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (XAVIER et al., 2008).

Concomitantemente, a cavidade oral de pacientes que estão internados em UTI e sob terapia medicamentosa prolongada, apresentam suscetibilidade a alterações orais e predisposição a infecções fúngicas oportunistas. Durante o período de internação, há alteração na composição da microbiota oral, com

predomínio de microrganismos anaeróbios gram-negativos e leveduras (principalmente gênero *Candida*). A colonização e infecção por fungos na cavidade bucal são reconhecidas por serem possíveis fatores predisponentes ao desenvolvimento de fungemia, tal fato, deve-se a provável disseminação no trato gastrointestinal, que por sua vez, atinge a via hematogênica. Em mucosa oral de neonatos críticos a colonização ocorre em 50% na primeira semana de hospitalização, e em crianças a presença de superfícies dentais e biofilme favorecem essa interação (STRAMANDINOLI et al., 2009; SIMÕES et al., 2013; ARAUJO et al., 2013; TULIO et al., 2018).

Em estudo elaborado por Batista et al. (2014) durante o período de 6 meses, em UTIN de um hospital público de São Paulo, observou-se uma população de 125 recém-nascidos, dentre os quais, 12 pacientes apresentaram colonização oral persistente e suspeita clínica de sepse. Através do processo de genotipagem por PFGE, encontrou-se concordância entre as espécies de leveduras da mucosa bucal e no sangue em 6 recém-nascidos que apresentaram, simultaneamente, colonização oral e septicemia e por fim, 4 dos pacientes que apresentaram leveduras em concordância, foram a óbito.

Conforme avança a biologia molecular, técnicas de genotipagem estão sendo aperfeiçoadas para caracterização e conhecimento acerca das estruturas genéticas dos microrganismos. Estes métodos são importantes para entendimento das relações genéticas, similaridade entre isolados, origem das cepas (endógena ou exógena) e transmissão das infecções (WU et al. 2015). A técnica de genotipagem Multilocus Sequence Typing (MLST) atende a esse propósito. O MLST é uma ferramenta da epidemiologia molecular, baseada no sequenciamento de DNA, especificamente na análise do polimorfismo de nucleotídeos. Tal procedimento apresenta alta resolutividade, elevado índice de discriminação entre cepas. Essa técnica é eficiente para a tipagem molecular de *C. albicans* e de espécies não-*albicans*, pois compreende a dinâmica e a epidemiologia entre as espécies, sobretudo em ambientes hospitalares (CLIFF et al., 2008; TSAI et al., 2015).

Baseado na relevância do tema, o presente estudo tem como objetivo verificar a relação da microbiota presente na cavidade oral de pacientes

internados em UTI neonatal e pediátrica de maternidades e hospital público infantil de Manaus, associada à ocorrência de fungemia, através da técnica molecular Multilocus Sequence Typing (MLST).

## 2 JUSTIFICATIVA

A fungemia representa um dos principais problemas de saúde pública em nível de atenção terciária, sendo um assunto de interesse global devido às graves implicações aos pacientes e instituições, sendo as espécies de *Candida* as principais responsáveis pela morbidade e mortalidade de pacientes infantis. Este público apresenta maiores riscos às infecções fúngicas em razão dos inúmeros fatores endógenos e exógenos associados ao ambiente hospitalar.

Segundo dados da ANVISA (2016) a *Candida* foi o principal agente de infecção primária da corrente sanguínea em pacientes pediátricos internados em UTI na região Norte do Brasil. Outrossim, em 2018, o mesmo foi notificado como patógeno responsável pela candidemia em pacientes neonatais e pediátricos, a nível nacional. Diante disso, é importante os estudos epidemiológicos regionais que abordem esta problemática no estado do Amazonas, a fim de propor estratégias e medidas preventivas para melhorar as ações de saúde locais.

A microbiota oral destes pacientes apresenta elevada colonização e diversidade de microrganismos, principalmente leveduras de *Candida albicans* e o notável crescimento das espécies *Candida* não-*albicans*, visto que há intrínseca relação aos processos de patogenicidade. A cavidade bucal é considerada um fator de risco primário para uma possível complicação sistêmica, deste modo, ressalta-se a importância de estudos que abordem a microbiota oral para fins de prevenção, diagnóstico, tratamento e monitoramento das infecções orais que possam acometer pacientes hospitalizados.

Com intuito de elucidar as similaridades e prováveis correlações das *Candida* encontradas na cavidade oral e na corrente sanguínea de pacientes acometidos por fungemia optou-se pela técnica molecular nomeada Multilocus Sequence Typing (MLST). Essa técnica permite determinar a diversidade genética e é uma ferramenta reprodutível e com alto poder discriminatório, amplamente utilizado em pesquisas sobre infecções nosocomiais, podendo-se comparar as informações obtidas com os demais estudos a nível mundial.

A literatura apresenta escassez de estudos longitudinais que visem uma possível concordância de infecções orais associadas à fungemia. Há possibilidade de um envolvimento dinâmico entre os objetos de estudo, entretanto, as evidências são insuficientes para comprovar uma possível contribuição ou evolução para o agravamento da doença.

Portanto, esta pesquisa apresenta como proposta a compreensão desta possível relação, a fim de subsidiar conhecimento sobre a problemática. Além de contribuir para qualidade da atenção à saúde e com a perspectiva da importância de equipes multidisciplinares, com ênfase em medidas preventivas para o controle e monitoramento da cavidade oral que levem para a diminuição da mortalidade em UTIN e UTI-ped.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Verificar a relação da microbiota presente na cavidade oral de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva neonatal/pediátrica e a ocorrência de fungemia.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil epidemiológico/clínico de recém-nascidos e crianças internadas em UTI e determinar a microbiota presente na cavidade oral.
- Determinar os genótipos das espécies de *Candida* isoladas da cavidade oral e corrente sanguínea de pacientes que apresentarem candidemia;
- Correlacionar as espécies de *Candida* ou outras espécies de fungos encontradas na cavidade oral com as isoladas da corrente sanguínea.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 INFECÇÃO FÚNGICA INVASIVA EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL E PEDIÁTRICA

Infecção fúngica invasiva é conceituada como infecção por fungos patogênicos em tecidos corpóreos profundos. Apresenta notoriedade global devido aos números crescentes de casos, distribuição epidemiológica, taxa significativa de óbitos e letalidade em pacientes infantis nos últimos anos. Em ambiente hospitalar, especificamente nas Unidades de Terapia Intensiva, duplica-se o risco do acometimento destas infecções em comparação as enfermarias médicas, visto que a UTI é uma unidade de assistência, na qual é oferecido o cuidado a pacientes críticos, que apresentam risco de morte, porém vistos como recuperáveis (ANTUNES, 2004; MORAIS, 2010).

As Unidades de Terapia Intensiva neonatal e pediátrica direcionam o atendimento ao público infantil. A UTIN é um serviço em ambiente hospitalar, onde a assistência é voltada ao atendimento de recém-nascidos em condições clínicas graves, com idade entre 0 (zero) a 28 (vinte e oito) dias de vida. E UTI-ped é destinada aos pacientes com idade de 29 (vinte e nove) dias a 14 (quatorze) ou 18 (dezoito) anos com casos de alta complexidade. As internações nestas unidades intensivas infantis, aumentam em cinco vezes o risco de uma infecção hospitalar, também denominada Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS) (BRIXNER, 2011; BRASIL, 2012; BRASIL, 2017).

O termo IRAS de acordo com Maciel e Cândido (2010, p.35) é “aquela adquirida após admissão do paciente e cuja manifestação ocorreu durante a internação ou após a alta, podendo estar relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares”. As infecções sistêmicas de etiologia fúngica são responsáveis por uma parcela significativa de casos adquiridos em ambientes nosocomiais.

As principais manifestações clínicas da Infecção fúngica invasiva (IFI) correspondem a febre, leucocitose, fungemia, abscessos cutâneos relacionados a inserção do cateter, sepse, choque séptico, infecção do músculo cardíaco (VIANI, 2007).

A fungemia é considerada uma das principais causas de infecção sistêmica oportunista em pacientes neonatais e pediátricos internados em UTI, na qual 15% das doenças relacionadas aos cuidados advém de fungos. Caracterizada pelo predomínio de fungos viáveis na corrente sanguínea, o gênero *Candida* destaca-se representando cerca de 70% a 90% das infecções, seguida de *Aspergillus* com 10% a 20%. Sobretudo, apresenta recorrência em ambientes nosocomiais e está atrelada no comprometimento da sobrevivência de recém-nascidos e crianças, visto que, em pacientes infantis a taxa de mortalidade pode aproximar-se de 50% (RAO; ALI, 2005; DELALOYE; CALANDRA, 2014).

Dado que sepse é uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada, ocasionada por um processo infeccioso de etiologia microbiana e atinge pacientes imunodeprimidos, que apresentam comorbidades e hospitalizados em UTI. Dessa forma, a condição é reconhecida como um desafio e um agravante, devido à dificuldade diagnóstica, similaridade com outras infecções, inúmeros fatores inerentes ao hospedeiro/microrganismo e tratamento inespecífico (BOECHAT; BOECHAT, 2010; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011).

A sepse é recorrente em pacientes infantis, sendo uma das principais causas de mortalidade e morbidade, essencialmente em países de baixa e média renda. Conforme um estudo exploratório de Fleischmann-Struzeket et al. (2018) estimou-se a incidência de 3 milhões de casos de sepse em neonatos e 1,2 milhão em crianças no mundo. Constatou-se que, 48 de 100.000 crianças foram acometidas por sepse, 22 de 100.000 foram diagnosticadas com sepse grave, e 2.202 neonatos de 100.000 nascidos vivos com sepse. Além disso, foi exposta a dificuldade da realização de levantamentos, pois os dados são insuficientes e incompletos.

A origem dos microrganismos em pacientes neonatais pode ser atribuída a: infecção no útero, aquisição da flora materna ou colonização pós-natal do ambiente hospitalar. A sepse pode ser classificada em precoce (quando dentro de 48 a 72 horas de vida houver a infecção, sendo vinculado à transmissão materna) ou tardia (ocorre após 72 horas de vida, e está ligada a fatores pós-natais e aos procedimentos na UTI). Os principais microrganismos hospitalares responsáveis pela sepse precoce são: *Streptococcus agalactiae* (GBS), *Escherichia coli* e *Candida* spp. E pela sepse tardia: bactérias Gram-negativas, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase* negativa e *Candida* spp. (SILVEIRA; PROCIANOY, 2012; SHANE, 2017).

Em relação aos pacientes pós-neonatais e pediátricos, as doenças de base apresentam relação direta para o acometimento de sepse. Verificou-se que 40 a 49% das crianças com sepse grave apresentavam comorbidades subjacentes, tais como: infecções respiratórias do trato inferior, doenças diarreicas, malária, pneumonia, gastroenterite, meningite, doenças infecciosas bacterianas e fúngicas (HARTMAN, 2013; KISSOON; UYEKI, 2019).

A *Candida* spp. é a causa mais frequente de sepse ou choque séptico em recém-nascidos, principalmente com peso extremamente baixo. Pacientes diagnosticados com candidemia que desenvolvem sepse grave ou choque séptico estão no intervalo percentual de 8% a 30% e 23% a 38%, respectivamente (DELALOYE; CALANDRA, 2014).

Diante deste cenário, o ambiente de terapia intensiva neonatal e pediátrico deve ser compreendido como um ecossistema microbiano complexo. São de interesse de pesquisadores e comissões de infecção hospitalar, estudos que abordem principalmente o fungo *Candida* spp. – considerado o patógeno dominante das infecções fúngicas invasivas – sobretudo, a origem das fontes de contaminação, diagnóstico, tratamento, a implementação de ações que venham contribuir na melhora da qualidade de vida destes pacientes hospitalizados.

## 4.2 CANDIDEMIA

Candidemia é uma infecção fúngica invasiva, na qual espécies do gênero *Candida* são encontradas na corrente sanguínea, que resulta na disseminação destas leveduras aos demais órgãos. O termo pode ser definido como isolamento de *Candida* em hemocultura, a partir de sítio normalmente estéril associado a um sinal de infecção, porquanto a candidemia é a manifestação mais comum da candidíase invasiva (BONATTI et al., 2009; CUENCA-ESTRELA, 2012).

As manifestações clínicas geralmente são inespecíficas. A infecção pode ocasionar quadros febris, sepse fúngica, choque séptico, comprometimento sistêmico, especialmente em pacientes internados em UTI. Estas infecções são de difícil diagnóstico, além de gerarem maiores gastos médicos, apresentarem altos índices de morbimortalidade e prolongar a internação em ambiente hospitalar (EPELBAUM; CHASAM, 2017).

A candidemia pode ser classificada em primária ou secundária, conforme origem da infecção. Considera-se primária quando há positividade de *Candida* spp. em hemocultura, porém, não há sinal de infecções em outras áreas do corpo, como exemplo o uso do cateter intravascular. E secundária – prognóstico ruim – leveduras estão presentes em outros locais do organismo ou ambiente e há disseminação para o sangue, como exemplo: contaminação das mãos da equipe hospitalar, dispositivos, feridas cirúrgicas, infecção do trato urinário (KLOTZ et al., 2007, MEYER et al., 2013).

Quanto à patogênese da *Candida*, a transmissão pode ter origens distintas. Referente a via endógena (mais frequente), sabe-se que 70 a 80% das leveduras colonizam o trato gastrointestinal, conforme ocorre algum distúrbio há o crescimento de *Candida*, e por meio da translocação ou microinvasões, os fungos podem atingir os capilares mesentéricos disseminando-se na corrente sanguínea. Enquanto a via exógena ocorre através das mãos dos profissionais, dispositivos (CVC, sondas) e infusões contaminadas (COLOMBO et al., 2003).

Em relação ao diagnóstico, é utilizada a hemocultura que tem por finalidade o isolamento de leveduras viáveis na corrente sanguínea para confirmação da infecção e advém da coleta de sangue venoso, quando há suspeita clínica ou sepse. No entanto, apresenta baixa sensibilidade, na qual 30% ou 50% dessas infecções não produzem hemoculturas positivas, e o tempo de incubação leva em torno de até 36 horas. Portanto, há um elevado número de falsos negativos, uma vez que, a sobrevivência destes pacientes depende da rápida identificação do microrganismo envolvido (QUINDÓS et al., 2014).

#### 4.2.1 EPIDEMIOLOGIA

A incidência global da candidemia varia entre 2 a 7 casos de 1.000 internações, onde a mortalidade bruta representa uma porcentagem de aproximadamente 50%, elevando substancialmente os custos hospitalares. Nos Estados Unidos, durante 20 anos, constatou-se um crescimento de 207% dos casos atribuídos à candidemia, além da *Candida* spp. ser considerada o quarto microrganismo mais isolado em hemoculturas. Contudo, na Europa, a levedura encontra-se entre a 6ª e 10ª posição dos isolados de sangue (MARTIN, 2003; PFALLER; DIEKEMA, 2007; MEAN et al., 2008; ARNOLD et al., 2010).

Em países do continente asiático - China, Hong Kong, Índia, Cingapura, Taiwan e Tailândia - uma vigilância laboratorial de grande escala foi realizada por Tan et al. (2015), no período de 01 ano, somando um total de 25 hospitais. Neste trabalho identificou-se 1601 episódios de IFI entre 1,2 milhões de altas, onde verificou-se uma incidência geral de 1,22 episódios por 1000 altas. Além disso, notou-se uma correlação moderada entre a incidência e internação em UTIs ( $R^2 = 0,47$ ).

No Brasil e América Latina, conforme estudos, há uma limitação de trabalhos sobre o perfil epidemiológico desta infecção na atenção terciária, em comparação aos demais países. Somente no Brasil, estimou-se no ano de 2011, um número aproximado de 2.816.298 pessoas afetadas por candidemia em pacientes hospitalizados e candidíase não-invasiva, cuja incidência é maior e

varia entre 1,27 a 2,49 casos de 1000 admissões, quando comparado aos Estados Unidos (0,28 a 0,96 por 1.000 admissões) e Europa (0,17 a 0,76 por 1.000 admissões). Ademais, apresenta uma taxa bruta de 40% a 60% de mortalidade em UTI (PEREIRA et al., 2010; WILLE et al., 2013; GIACOMAZZI et al., 2016; BARROS, 2018).

Um dos trabalhos multicêntricos mais renomados em âmbito nacional, foi realizado por Colombo et al. (2006) onde efetuou-se uma vigilância prospectiva de candidemia no Brasil, em 11 centros médicos localizados em 9 grandes cidades brasileiras. Houve um total de 712 casos de candidemia durante 21 meses, na qual constatou-se uma incidência geral de 2,49 casos de 1.000 internações e 0,37 casos de 1.000 pacientes/dia. O estudo enfatiza a importância de pesquisas voltadas para epidemiologia, principalmente conhecer as diferenças territoriais relacionadas a prevalência de candidemia.

Em relação ao Amazonas, estudos foram desenvolvidos em Manaus no ano de 2013 em 11 hospitais públicos e privados. Côrrea (2014) verificou uma incidência de 2,31 casos de candidemia por 1000 internações e 0,61 casos por 1000 pacientes/dia, além de uma taxa de mortalidade de 37,21%. Nesse mesmo estudo Pereira (2015) observou que dos 85 casos de infecção fúngica invasiva por *Candida* em 81 pacientes ocorridos no período, 72,8% (n=59) dos pacientes tinham até 1 ano de idade.

#### 4.2.2 GÊNERO *CANDIDA*

O gênero *Candida* é considerado um dos principais fungos de importância médica devido sua patogenicidade. Presente em inúmeros ecossistemas, como solo, alimentos, água, participa da microbiota de homens e animais, e compreende um total de 200 espécies. São classificadas taxonomicamente no reino Fungi, divisão Eumycota, subdivisão Deuteromycotina, classe Blastomycetes, família Cryptococcacea (SIDRIN; ROCHA, 2004; OLIVEIRA, 2014). Microscopicamente apresenta-se na forma leveduriforme (chamada de

blastoconídeo) ou no formato de pseudo-hifas ou podem ser hifas verdadeiras (maior aderência). Macroscopicamente, as colônias são cremosas, branco-amareladas e de aspecto liso ou rugoso (LACAZ et al., 2002).

As espécies de *Candida* apresentam relação de comensalismo com o ser humano. Colonizam o trato gastrointestinal, participam da microbiota vaginal, da uretra, pulmões e cavidade oral. Contudo, quando há um desequilíbrio dessa relação harmônica com seu hospedeiro, o fungo apresenta patogenicidade, por isso é considerado oportunista (ALONSO-VALLE et al., 2003).

Esta transformação dá-se por fatores intrínsecos do hospedeiro como: idade extrema, imunossupressão, doenças de base (câncer, diabetes mellitus, HIV), colonização em sítios anatômicos, além da quebra de barreiras anatômicas (cirurgias invasivas, uso de cateter central, pós-operatório). E também por fatores de virulência do próprio fungo, a saber: capacidade de adesão, biofilme, formação de tubos germinativos e a produção de enzimas extracelulares. Portanto, a *Candida* spp. através da invasão tecidual, indução de estados de hipersensibilidade ou por produção de toxinas, propicia o adoecimento no homem (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; SIMÕES et al., 2013).

Logo, os fungos de interesse médico, podem induzir uma gama de respostas do hospedeiro que resultam desde colonização, infecção, sepse, choque séptico, distúrbios de hipersensibilidade, reações tóxicas e até óbitos.

#### 4.2.3 ESPÉCIES *CANDIDA ALBICANS* E NÃO-*ALBICANS*

Conforme a literatura, cerca de 17 espécies de *Candida* ocasionam candidemia. *Candida albicans* (principal levedura patogênica oportunista) é considerada um patógeno potencial em ambientes nosocomiais, pois demonstra predomínio de 60% em isolados positivos de hemocultura. Entretanto, as espécies não-*albicans* tem emergido no cenário mundial como importantes agentes de fungemia, tal fato pode ser explicado devido ao uso profilático de antifúngicos em pacientes críticos. As espécies não-*albicans* mais recorrentes

são: *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (XAVIER et al., 2008; LEPAK et al., 2011).

É de extrema importância a identificação destas leveduras para administração do tratamento, uma vez que fungemia por espécies *C. não-albicans* são mais difíceis de serem tratadas devido à resistência inata ou adquirida aos antifúngicos. Interessante acrescentar que existem fatores que contribuem na distribuição espacial destas espécies, como geografia, idade do paciente e uso de antifúngicos (AREDRUP, 2010).

A espécie *C. glabrata* é predominante no hemisfério norte e em pacientes de idade avançada, sendo inerentes das mucosas vaginal e gastrointestinal. Está associado a longo tratamento com antibióticos, uso de dispositivos, ventilação mecânica e prematuridade, além de apresentar reduzida sensibilidade aos derivados azólicos (PFALLER; DIEKEMA, 2007; MORACE et al., 2011). Enquanto *C. parapsilosis* é frequentemente encontrada no hemisfério Sul, possui alta prevalência em crianças, pacientes neonatais com baixo ou extremo baixo peso e indivíduos internados em UTI. A transmissão desta espécie é predominantemente horizontal e está associada a fatores exógenos, visto que as fontes de contaminação conhecidas em ambiente intensivo são: superfícies dos dispositivos hospitalares, cateteres venosos centrais, mãos dos profissionais de saúde e fluidos médicos (TROFFA; GÁCSEK; NOSANCHUK, 2008).

A infecção por *C. tropicalis* é precedida por colonização prévia (juntamente com *C. albicans*) e ocorre quando há inibição da flora bacteriana devido ao uso de antibióticos, afeta principalmente pacientes com câncer, crianças com doenças hematológicas internadas em UTI. Os fatores de virulência desta espécie são: adesão, síntese de biofilme e atividade hemolítica (NEGRI et al., 2010).

*C. krusei* é reconhecida como levedura eventual de infecções nosocomiais, que afeta pacientes idosos, com doenças hematológicas ou transplantados e apresenta frequência baixa em neonatos. É importante devida atenção a esta espécie, pois, possui resistência ao fluconazol (BONATTI et al., 2009).

### 4.3 CANDIDEMIA EM PACIENTES NEONATOS

A Unidade de Terapia Intensiva Neonatal é o ambiente crítico com a maior incidência de candidemia. Em recém-nascidos, representa a terceira causa de sepse tardia em UTIN (apresenta taxa de mortalidade bruta entre 15% a 59%), prejuízo no neurodesenvolvimento, insuficiência cardíaca em bebês com baixo peso e demais complicações (GODIM et al., 2009).

A candidemia atinge principalmente recém-nascidos pré-termos, com peso abaixo de 1.500 g. Para constatar tal afirmação, verificou-se a incidência desta infecção invasiva em recém-nascidos de muito baixo peso (1.500 g) que resultou no percentual de 2,6% a 13,2%, e em bebês com peso extremamente baixo (1.000g) notou-se uma taxa de 6,6% a 26,0%. Ademais, recém-nascidos estão suscetíveis a apresentar sintomatologia inespecífica ou mínima de infecção, visto que, a meningite é vista frequentemente em associação à candidemia (MCCARTY; PAPPAS, 2015).

De acordo com o boletim da Anvisa (2018), no Brasil, a *Candida* spp. foi o fungo responsável pela fungemia ou Infecções Primárias de Corrente Sanguínea (IPCS), associados ao Cateter venoso central (CVC) em UTI neonatal, na qual as espécies não-*albicans* apresentaram predomínio sobre as espécies *albicans* (Figura 1). Na região Norte, segundo Anvisa (2016), *Candida* spp. foi o segundo microrganismo mais notificado nas UTINS, atrás somente da bactéria *K. pneumoniae* (Figura 2).

UTI	Microrganismo identificado em IPCSL	Número
UTI neonatal	Acinetobacter spp.	244
UTI neonatal	Candida albicans	303
UTI neonatal	Candida não-albicans	459
UTI neonatal	Complexo Burkholderia cepacia	156
UTI neonatal	Enterobacter spp.	473
UTI neonatal	Enterococcus faecalis	178
UTI neonatal	Enterococcus faecium	13
UTI neonatal	Enterococcus spp.	63
UTI neonatal	Escherichia coli	220
UTI neonatal	Klebsiella pneumoniae	1353
UTI neonatal	Outras enterobactérias (Proteus, Morganella, Citrobacter, entre outros)	169

visualizar os dados.

UTI

- UTI adulto
- UTI neonatal
- UTI pediátrica

Figura 1. Distribuição dos microrganismos notificados como agentes etiológicos de IPCSL associados a CVC em pacientes de UTI neonatal. Brasil, 2018.

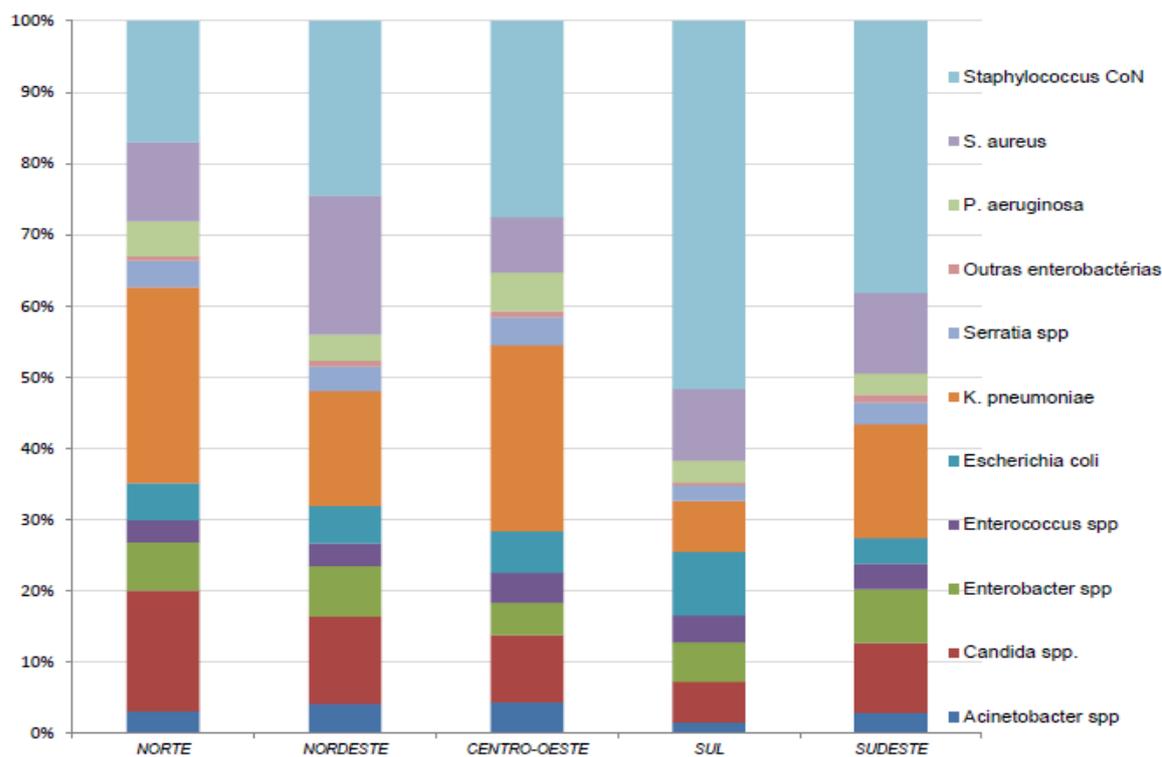


Figura 2. Distribuição dos principais microrganismos notificados como agentes etiológicos de IPCSL associada a CVC em pacientes neonatos hospitalizados em UTI, por região geográfica. Brasil, 2016.

Atualmente as espécies fúngicas patogênicas predominantes em pacientes recém-nascidos são *C. albicans* e *C. parapsilosis*, os quais representam 80% a 90% das candidemias neonatais (CHITNIS et al., 2012). Benjamim et al. (2006) realizou um estudo multicêntrico, na qual participaram 4.579 bebês, 307 obtiveram *Candida* spp. isoladas do sangue, destes 42,9% foi representada por *C. albicans* e 19% por *C. parapsilosis*. Além disso, neste estudo, o número de óbitos e o comprometimento no sistema nervoso, foi observado em 73% dos bebês com peso extremamente baixo, diagnosticados com candidemia, o que confirma informações citadas anteriormente.

No entanto, sabe-se que espécies não-*albicans* estão em ascensão como responsáveis pela IFI. Segundo estudo de Juyal et al. (2013) foram incluídos um total de 132 neonatos internados em unidades intensivas. Verificou-se que as espécies não-*albicans* foram correspondentes a 80,30% dos casos, onde as

espécies mais isoladas foram: *C. parapsilosis* (25,0%) e *C. tropicalis* (21,97%), enquanto 19,70% dos casos foram causados por *C. albicans*.

Em consonância, Giusiano et al. (2004) realizaram uma pesquisa sobre o perfil de leveduras isoladas em duas UTINS na Argentina. O trabalho resultou em 92 cepas isoladas de vários sítios anatômicos, sendo 25 leveduras da corrente sanguínea, 20 em cateteres venosos, 23 aspirações suprapúbicas e 24 em *swab* retais. As cepas de *C. albicans* e *C. parapsilosis* foram isoladas em corrente sanguínea e apresentaram a mesma frequência (36%), *C. parapsilosis* também foi encontrada em cateter venoso central (50%) e *C. tropicalis* (54,2%) foi a levedura mais frequente associada à colonização do trato gastrointestinal.

Espécies menos frequentes de *Candida* não-*albicans*, na maioria das vezes estão envolvidas em surtos. O trabalho de Kaur et al. (2020) no hospital de atendimento terciário na Índia, durante 01 ano, apurou um crescimento de isolados positivos, que afetou significativamente o grupo infantil (82/186, 44%). Destes, 74,7% eram neonatos, visto que o surto de candidemia por *C. krusei* foi confirmado. Tais cepas estavam relacionadas ao ambiente e as mãos dos profissionais de saúde, logo, verificaram que houve quebra nos padrões de biossegurança.

Dentre os antifúngicos mais usados, Anfotericina B é a opção escolhida em casos de candidemia em neonatos. Contudo, a demora no início do tratamento pode influenciar no prognóstico e aumentar o risco de mortalidade e como medida profilática o Fluconazol é o medicamento escolhido, pois apresenta eficácia e poucos efeitos adversos (MOREIRA, 2005).

Recém-nascidos apresentam singularidades inerentes nesta fase da vida, a saber: barreiras anatômicas imaturas (pele e mucosa). Portanto, compreende-se a vulnerabilidade destes à colonização e infecção pela espécie *Candida*. O conhecimento dos fatores de risco é primordial para o estabelecimento de estratégias para prevenção da candidemia em neonatos. Esses fatores de risco geralmente são: baixo peso, prematuridade, doenças subjacentes, colonização por microrganismos, uso de antibióticos de largo espectro, tempo de internação, sistema imunológico deficiente, uso de cateter venoso central, ventilação

mecânica, cateter umbilical e nutrição parenteral (COUTO; CARLOS; MACHADO et al., 2011; CHERMONT et al., 2015).

Outrossim, é importante citar os fatores externos como causa de candidemia neonatal, como: mãos dos profissionais, dispositivos hospitalares, assepsia insatisfatória dos instrumentais cirúrgicos e uso prolongado do ventilador mecânico (ARIFF et al., 2011).

O uso do cateter venoso central está associado à colonização por *C. parapsilosis*. Esta levedura tem como característica a persistência em ambiente hospitalar, formação de biofilme em superfícies, soluções parenterais, além de estar presente nas superfícies corpóreas, como as mãos dos profissionais. Logo, entende-se que um período prolongado em UTIN, implica no aumento de procedimentos invasivos e no manejo deste bebê, sendo assim, explica-se o fato dos episódios de candidemia por esta espécie (VAN ASBECK et al., 2007; TROFA; GÁCSÉR; NOSANCHUK et al., 2008).

De acordo com o trabalho de Ingram et al. (2019) no Hospital del Niño, Panamá, foi realizado um estudo de caso-controle, retrospectivo, em bebês após 48 horas de internação e verificou os fatores de risco para a candidemia. Durante o período da pesquisa 141 pacientes desenvolveram a infecção. Das espécies fúngicas, a *C. parapsilosis* causou 66 (49%) episódios de candidemia, *C. albicans* com 44 (33%) episódios e *C. tropicalis* com 11 (8%). Ademais, identificaram como fatores de riscos mais recorrentes a hospitalização por mais de sete dias, uso de cateter umbilical, cirurgia abdominal e tratamento com antibiótico.

Em um estudo de caso-controle realizado por Soares, Oliveira e Carneiro (2013) em um hospital de ensino na região Norte do Brasil, resultaram em 36 casos de candidemia neonatal. Constatou-se que, os principais fatores de riscos foram o uso de cateter venoso central, nutrição parenteral prolongada e a antibioticoterapia prévia com uso de três ou mais antibióticos, dado que, o intervalo de tempo entre a internação e o diagnóstico, deu-se em 17 dias, e o tempo médio de internação foi de 56 dias. As espécies mais isoladas foram *C. albicans* (27,8%) e *C. parapsilosis* (25%).

Interessante observar que nos últimos anos houve uma diminuição de casos de candidemia em recém-nascidos. Este cenário pode ser atribuído aos inúmeros estudos que abordaram a infecção fúngica invasiva e os fatores de risco associados, os quais auxiliaram as comissões de infecção hospitalar na elaboração de protocolos e estratégias para prevenção, bem como, capacitação dos profissionais quanto a biossegurança, manejo dos neonatos, evolução dos tratamentos antifúngicos e afins.

Segundo pesquisa de coorte realizado por Aliaga et al. (2014), examinaram-se 709.325 dados de recém-nascidos em 322 UTIN's geridas pelo Grupo Medical Pediatrix de 1997 a 2010, nos Estados Unidos. Observou-se um decréscimo quanto à incidência anual de candidíase invasiva, na qual houve a diminuição de 3,6 episódios por 1000 doentes para 1,4 episódios entre todos os lactentes. Sendo assim, os pesquisadores atribuem esta alteração ao uso empírico de fluconazol e a diminuição de antibióticos de largo espectro.

#### 4.4 CANDIDEMIA EM PACIENTES PEDIÁTRICOS

Candidemia em crianças (acima de 28 dias) é considerada um problema expressivo no cuidado intensivo. Estudos afirmam que *Candida* spp. nos Estados Unidos e Europa, é o quarto patógeno comum em infecções da corrente sanguínea, visto que, a taxa de mortalidade varia entre 10% a 47%, a nível global. Tais fatos estão associados a fatores de riscos cirúrgicos, comorbidades, dispositivos hospitalares e uso de medicamentos de alto risco em pacientes pediátricos (ZAOUTIS et al., 2005).

Tsai et al. (2017) executaram uma pesquisa no centro médico em Taiwan, com duração de 13 anos (2003-2015) em pacientes menores de 18 anos. Participaram da pesquisa 262 crianças, que resultou em 319 isolados de *Candida* spp., e observaram que a mortalidade foi elevada na última década, onde o percentual de óbitos, neste estudo, foi de 35,1%, apresentando concordância com a taxa citada anteriormente, e além disso, a remoção tardia

do cateter, candidemia de ruptura e o choque séptico foram importantes na falha do tratamento.

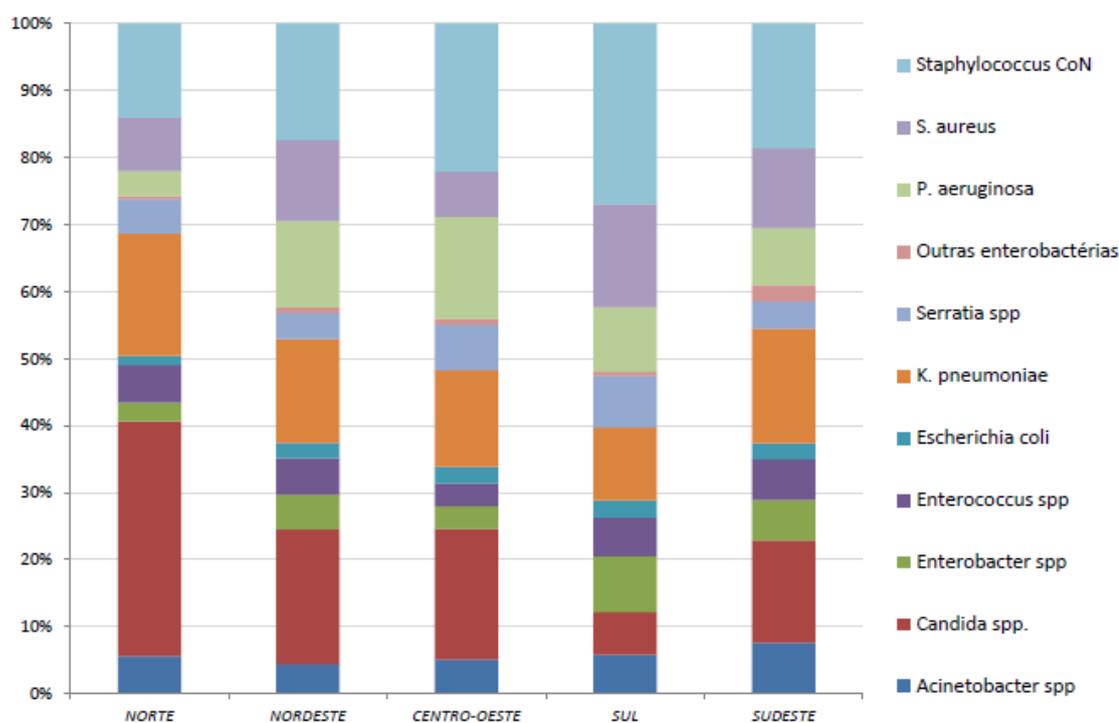
Nucci et al. (2013) elaboraram o primeiro estudo multicêntrico, focado na vigilância laboratorial, na América Latina. Do qual constataram um crescente número de crianças, não apenas neonatos acometidos por candidemia. Dos resultados, aproximadamente 45% dos episódios de candidemia ocorreram em crianças, destes, 23,7% eram recém-nascidos e lactentes (menores de 1 ano) e crianças mais velhas na faixa entre 1 a 18 anos, representando 20,5%.

Uma significativa parcela dos trabalhos voltados à fungemia, tem como ênfase a população neonatal e adulta. Nota-se que há uma quantidade restrita de informações quando se trata de pacientes pediátricos. De acordo com Yapar et al. (2011) existem diferenças fisiológicas e anatômicas importantes em crianças, os quais influenciam diretamente na vulnerabilidade a infecções e conseqüentemente na escolha do tratamento antifúngico, uma vez que é necessário pensar sobre toxicidade dos medicamentos, farmacocinética e dosagem.

Em relação as espécies fúngicas, no Brasil, conforme o boletim da Anvisa (2018), o patógeno *Candida* spp. (semelhante aos neonatos) é o fungo predominante em infecções de corrente sanguínea associados ao uso de CVC em UTI pediátrica, dado que há um maior número de espécies *C. não-albicans* em detrimento das espécies *C. albicans* (Figura 3). Na região Norte, segundo Anvisa (2016), a espécie *Candida* foi o agente etiológico mais isolado de hemoculturas positivas (Figura 4).

UTI	Microrganismo identificado em IPCSL	Número
UTI pediátrica	Acinetobacter spp.	120
UTI pediátrica	Candida albicans	126
UTI pediátrica	Candida não-albicans	234
UTI pediátrica	Complexo Burkholderia cepacia	100
UTI pediátrica	Enterobacter spp.	146
UTI pediátrica	Enterococcus faecalis	89
UTI pediátrica	Enterococcus faecium	17
UTI pediátrica	Enterococcus spp.	20
UTI pediátrica	Escherichia coli	60
UTI pediátrica	Klebsiella pneumoniae	384
UTI pediátrica	Outras enterobactérias (Proteus, Morganella, Citrobacter, entre outros)	59

Figura 3. Distribuição dos microrganismos notificados como agentes etiológicos de IPCSL associados a CVC em pacientes de UTI pediátrica. Brasil, 2018.



Fonte: GVIMS/GGTES/ANVISA, 2016

Figura 4. Distribuição dos principais microrganismos notificados como agentes etiológicos de IPCSL associada a CVC em pacientes hospitalizados em UTI pediátrica, por região geográfica. Brasil, 2016.

No Brasil, as espécies mais isoladas em pacientes pediátricos são *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. (OLIVEIRA et al., 2014). Com o propósito de verificar o aumento de espécies *C. não-albicans* como agentes de fungemia, Oliveira et al. (2014) no Hospital Infantil em São Paulo, realizou uma

pesquisa em pacientes com idades entre 5 a 11 anos, no período de 04 (quatro) anos. O isolamento de *C. não-albicans* foi maior do que o verificado para *C. albicans*, as leveduras mais isoladas foram: 24,03% de *C. tropicalis*, 22,11% *C. parapsilosis*, 5,8% de *Pichia anômala*, 4,8% de *C. guilliermondii*, 2,88% de *C. krusei*, 1,92% de *C. glabrata* e 0,96% de *C. pararugosa*.

*Candida guilliermondii* é um dos componentes da microbiota humana. Esta levedura tem sido raramente associada a infecções humanas, o que pode estar relacionado à sua baixa patogenicidade (Pasqualloto; Antunes; Severo, 2006). No entanto, em uma pesquisa de Medeiros et al. (2007) foi o patógeno responsável por um pseudo-surto de candidemia em um hospital universitário no Brasil, acometendo 43% de 149 amostras, com a maioria dos casos ocorrendo em pacientes pediátricos, sem óbitos. Descobriu-se que as cepas eram similares e tinham relação com o ambiente, originadas de uma fonte comum.

O perfil destes pacientes suscetíveis a candidemia, são crianças que recebem tratamentos de alta complexidade como: quimioterapia por malignidade, transplante de células-tronco hematopoiéticas pediátricas (TCTH), imunomodulação e terapia para uma condição autoimune, além da terapia para crianças com imunodeficiência (IDP) e internações em unidade de terapia intensiva (UTI) (PANA, 2017).

Rosanova et al. (2018) em seu trabalho sobre candidemia, verificou que 97% dos pacientes pediátricos apresentaram as seguintes comorbidades subjacentes, a saber: doenças hematológicas (neutropenia, linfoma, leucemia e tumores sólidos), infecções no trato gastrointestinal (gastroquise, enterite), cardiopatias, câncer, além da imunodeficiência. E dentre os fatores de riscos, o uso de cateter venoso central (87,9%) e cirurgia prévia (66,7%) foram os mais prevalentes.

Em contrapartida, no estudo de Motta et al. (2017) em um hospital pediátrico em Curitiba, verificou que a doença de base mais prevalente foi a insuficiência renal aguda, e dentre os fatores, a ventilação mecânica e diálise foram associadas ao maior número de óbitos. Nesta pesquisa participaram 65

pacientes infantis, entre idades de 0 a 18 anos, destes, 58,5% eram crianças maiores de 1 ano e 41,5% eram crianças maiores de 2 anos, onde (15,4%) estavam em idade pré-escolar, uma vez que, a taxa de mortalidade foi de 32%.

Blyt et al. (2009) conduziram um estudo em que caracterizaram o perfil dos pacientes pediátricos acometidos pela IFI. Verificaram a malignidade hematológica e a neutropenia como doenças subjacentes mais frequentes. O dispositivo de acesso vascular foi associado a candidemia em 70% das crianças internadas, *C. albicans* e *C. parapsilosis* foram as espécies mais isoladas, 95% dos isolados foram suscetíveis ao fluconazol e maior parte dos pacientes receberam como tratamento anfotericina B.

A maioria dos isolados de *Candida*, em crianças, são suscetíveis ao fluconazol ou anfotericina B lipossomal. Por fim, algumas precauções como o tratamento antifúngico adequado, retirada do cateter venoso central depois de 48 horas após o diagnóstico, somado a hemocultura de controle a cada 72 horas são recursos úteis para a diminuição da mortalidade (FILIOTI; SPIROGLOU; ROILIDES, et al. 2007).

#### 4.5 MICROBIOTA ORAL DE NEONATOS E CRIANÇAS

Para compreensão acerca da micologia oral de pacientes infantis hospitalizados, é importante discorrer brevemente sobre o processo de formação e composição normal da microbiota da cavidade bucal de neonatos, lactentes e crianças. Ademais, demonstrar como a espécie *Candida* está envolvida neste contexto.

Microbiota, refere-se a um ecossistema complexo e diversificado, onde há colonização por comunidades de microrganismos em sítios anatômicos. Compreende um número expressivo de bactérias, espécies fúngicas, vírus e protozoários, que em condições de equilíbrio, não oferecem riscos à saúde do indivíduo. Fornece alguns benefícios (comensalismo) ao organismo do hospedeiro, como estimulação do sistema imunológico, impede a colonização de

microrganismos exógenos e contribui na síntese de vitaminas. Todavia, abriga microrganismos potencialmente patogênicos (MOURÃO; MAGALHÃES; MENDES, 2004).

A colonização das superfícies corpóreas, inicia-se no momento do nascimento. O contato do recém-nascido com microrganismos da mãe por meio do canal do parto vaginal ou cesáreo, dieta, exposição a antibióticos, manejo e cuidado são fatores determinantes para o desenvolvimento da microbiota, em especial, da cavidade oral. Certos estudos afirmam que antes do nascimento, a região bucal é estéril e após horas subsequentes ao parto, verifica-se uma colonização inicial com a participação de microrganismos aeróbios ou facultativos, devido ao contato maternal, pele, aleitamento e ao ambiente. Porém, outros trabalhos sugerem que tal colonização tem origem pré-natal, e que pode ser influenciada por espécies presentes na placenta (MORENO et al., 2017; TUOMINEN et al., 2019).

É fato que o desenvolvimento de micro habitats na região oral de recém-nascidos proporciona as bases à saúde bucal do indivíduo na fase adulta. O microbioma oral de neonatos é submetida a uma sucessão ecológica de microrganismos, onde nota-se um processo gradual de colonização e substituições de espécies em boca, até a fase infantil, visto que, os gêneros bacterianos predominantes em recém-nascidos são *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Veillonella*, advindos da região vaginal e leite materno. Com 01 ano de idade há constituição de colônias complexas e microrganismos anaeróbios, na qual "colonizadores tardios" como *Actinomyces*, *Porphyromonas*, *Abiotrophia* e *Neisseria* estão presentes. E por fim, em microbiomas mais maduros acrescenta-se as espécies *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Rothia*, *Treponema* e *Streptococcus mutans* (DZIC et al., 2018; NOGACKA et al., 2018; SULYANTO et al., 2019).

A microbiota oral é acometida por alterações regulares durante todas as fases da vida. Nos primeiros meses após o nascimento, microrganismos colonizam primeiramente os tecidos moles presentes em boca e conforme a erupção dentária (surgimento de tecidos duros), iniciada aos 06 a 08 meses de vida, há um aumento significativo na diversidade e riqueza dos microrganismos,

principalmente na faixa etária de 02 anos (idade na qual a composição da comunidade microbiana bucal converge para um perfil semelhante aos de adultos). Referente a crianças mais velhas, fatores como: dentes permanentes, ocorrência de doenças orais (cárie e gengivite), extrações dentárias, aparelho ortodôntico, restaurações, cálculos dentários, afetam diretamente a colonização e ecossistema do microbioma oral (SILVA, 2016; GOMES; NELSON, 2017; SULLYANTO et al., 2019).

O sistema estomatognático é constituído por diversas estruturas, compreendendo regiões específicas que abrigam um nicho ecológico singular, tais comunidades polimicrobianas podem se agregar e formar biofilme. Biofilme é conceituado como uma matriz extracelular em que microrganismos organizados se aderem às superfícies por meio de proteínas ou polissacarídeos produzidos pelos mesmos, e proporciona o equilíbrio desse ecossistema. No entanto, a desregulação dos fatores que determinam esta relação benéfica, ocasiona alteração da homeostase microbiana e, por conseguinte o desencadeamento de doenças orais, visto que, o biofilme também é considerado como possível reservatório de agentes patogênicos orais, tais como *Streptococcus mutans* e *Candida* (STRUZYCKA, 2014; NASRY et al. 2016).

#### 4.5.1 MICROBIOTA ORAL E *CANDIDA*

Como supracitado, espécies fúngicas estão inseridas na cavidade oral. Uma parcela dos fungos encontrados em boca são saprófitos, e proporcionam a regulação da microbiota bucal. Auxiliam na nutrição, proteção a carcinogênese e resistência à colonização por agentes patogênicos, contudo, o conhecimento sobre a distribuição e perfil destes microrganismos na cavidade oral e sua relevância clínica é ínfimo, dado que, há poucos trabalhos que tratem sobre microbiota oral (MUNGUIA-PÉREZ et al., 2012; JÚNIOR; IZABEL, 2019).

Ghannoum et al. (2010) realizaram um estudo com a finalidade de conhecer as espécies fúngicas mais predominantes na cavidade oral de indivíduos saudáveis. Segundo resultados, os componentes fúngicos mais

isolados foram *Candida* (75%), *Cladosporium* (65%), *Aureobasidium* (50%), *Aspergillus* (35%), *Fusarium* (30%) e *Cryptococcus* (20%), visto que, estes 03 últimos gêneros não são colonizadores habituais, podendo ter origem na inalação de partículas encontradas no ambiente ou por ingestão de água ou alimentos.

A respeito do gênero *Candida*, sabe-se que tal fungo é encontrado em equilíbrio nos diversos ecossistemas e reside substancialmente na cavidade oral. Tais microrganismos, estão co-agregados a bactérias no biofilme, colonizam estruturas (língua, mucosa jugal, palato, tonsilas, cáries, canais radiculares, bolsas periodontais e biofilme gengival) (PEIXOTO et al., 2010).

A espécie *C. albicans* é reconhecida pela elevada virulência, adaptação e associação a doenças bucais. Entretanto, espécies como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. dubliniensis* podem ser isoladas de infecções orais ou em condições normais. Estas podem atuar como patógenos oportunistas, e predispor infecções agudas ou crônicas, dependendo do estado fisiológico do hospedeiro e virulência do microrganismo.

Araújo-Passos (2009) num estudo com pacientes que acessavam as Unidades Básicas de Saúde/SEMSA na cidade de Manaus/AM, determinou a prevalência das diferentes espécies de *Candida* presentes na cavidade oral de usuários ou não de prótese dentária. Em 50% dos pacientes avaliados a *Candida* esteve presente na cavidade oral. Nos 188 pacientes que utilizavam prótese dentária, foi observada uma prevalência de 75% para o gênero *Candida* e dos 406 pacientes que não utilizavam prótese, obteve-se um percentual de 38,4% para levedura. A espécie mais prevalente foi *C. albicans* seguida pela *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr* e *C. glabrata*.

#### 4.6 CAVIDADE ORAL E UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA

A cavidade oral é composta por inúmeros microrganismos comensais, todavia, um possível desequilíbrio microbiológico ou fatores patológicos, fisiológicos, imunológicos, mecânicos, ou até mesmo ambientais, como a

internação em UTI, aumentam a colonização e a suscetibilidade de multiplicação de leveduras ou bactérias nos tecidos, instalando-se a infecção (SCHERMA et al., 2004).

A região orofaríngea e sua respectiva microbiota, pode sofrer influências de fatores externos (tabagismo, alcoolismo, internação em ambientes hospitalares, uso prolongado de antibióticos) e intrínsecos, como (idade e imunidade) quando relacionado ao indivíduo. A desregulação dos fatores que auxiliam na simbiose entre microrganismos e estruturas bucais, pode desencadear doenças, a saber: temperatura, reações de oxirredução, ph e nutrientes (NASRY et al., 2016).

Batista et al. (2014) afirma que durante o período de internação e intubações em indivíduos hospitalizados, a microbiota oral bacteriana gram-negativa e fúngica aumentam consideravelmente. Em concordância Túlio et al. (2018) expõe os microrganismos gram-negativos, mais encontrados no sistema estomatognático de internados, especificamente no biofilme bucal, sendo: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Haemophilus influenza*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus hemolyticus*, *Escherichia coli* e *Enterobacter* spp. Em relação aos fungos, o predomínio do gênero *Candida* é substancial.

A infecção fúngica oral mais recorrente em pacientes internados em UTI, é denominada candidíase oral. Esta população apresenta maior propensão a doença, ocasionada principalmente pela espécie *Candida albicans*, devido aos fatores como imunossupressão, higienização deficiente, fluxo salivar diminuído, idade extrema, e antibioticoterapia, na qual aumentam a patogenicidade destas leveduras presentes em boca.

Candidíase pseudomembranosa é a manifestação clínica mais comumente relatada nestes indivíduos, conhecida popularmente como “sapinho”. É caracterizada pela presença de placas brancas amolecidas (massa na qual encontra-se hifas, leveduras, células epiteliais descamadas e fragmentos de tecido necrótico desordenados) com aspecto de “queijo cottage ou leite coalhado”, ligeiramente elevadas, uma vez que, são destacáveis pela raspagem

com uma compressa de gaze seca ou abaixador de língua. Quando há sintomatologia, sensação de queimação e halitose são comuns, visto que, acomete a mucosa jugal, palato, língua, e afeta principalmente neonatos, lactentes, pacientes imunossuprimidos e com uso de antibioticoterapia de amplo espectro (NEVILLE, 2009).

Outra forma da infecção é a candidíase eritematosa (pode-se estabelecer como sequela da candidíase pseudomembranosa), apresenta-se como eritema difuso, em que a mucosa passa a ser seca e brilhante. Frequentemente o sítio anatômico acometido é o dorso da língua, associada à perda das papilas filiformes, gerando placas e úlceras superficiais, bastante dolorosas (SIMÕES et al. 2013).

O diagnóstico é clínico e pode ser realizado através de: meios de culturas, caracterização morfológica, bioquímica, fisiológica e técnicas moleculares. Ademais, os tratamentos habitualmente escolhidos são a adequação bucal, eliminação dos fatores de risco, antifúngicos tópicos (Miconazol e Nistatina) ou sistêmicos (Anfoterecina B e derivados azólicos) (MILSOP; FAZEL, 2016).

#### 4.6.1 CIRURGIÃO-DENTISTA E OS CUIDADOS ORAIS EM UTI

A atenção integral por meio de uma equipe multiprofissional para o atendimento de pacientes internados em unidades de terapia intensiva, mostrou-se eficiente para proporcionar qualidade de vida, bem como, prevenir infecções advindas do meio hospitalar. Contudo, a inserção do cirurgião-dentista ainda é deficiente, apesar das evidências constatarem que a higiene oral é imprescindível para melhoria da condição sistêmica e diminuição de doenças na cavidade bucal (SANTOS et al., 2017).

Indivíduos hospitalizados em unidades intensivas apresentam-se debilitados, fazendo uso de inúmeros medicamentos e em total dependência em relação aos cuidados, sobretudo, a higiene oral. Nota-se um número expressivo de pacientes com condições orais pré-existentes (cárie, doença periodontal,

fratura dentária, ausência de dentes), acrescidos da intubação orotraqueal associada à ventilação mecânica, logo, submetendo o indivíduo a permanecer com boca aberta e conseqüentemente desidratando a mucosa bucal. Ademais, condições como: halitose, saburra lingual, xerostomia, hipossalivação, úlceras traumáticas, candidíase, principalmente em neonatos (atentar as mamas da mãe para que não haja infecção cruzada), podem aparecer durante o tempo de internação (SANTOS et al., 2017; SALDANHA et al., 2015; BATISTA et al., 2014).

A literatura aponta a presença de patógenos respiratórios agressivos como: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, em até 72 horas da entrada na UTI, no biofilme oral presente em dentes e mucosas. Tais patógenos podem alcançar os pulmões ou por meio da secreção oral envolvida no tubo orotraqueal ou pela modificação da microbiota normal da orofaringe e por fim, ocasionar a pneumonia nosocomial. Desse modo, a higienização bucal adequada minimiza este quadro clínico, pois reduz significativamente o biofilme e, por conseguinte, evidencia a importância do dentista na sobrevivência dos pacientes (BATISTA et al., 2014; MORAIS et al., 2010).

As unidades hospitalares utilizam alguns métodos para cuidados orais, todavia, não há padronização. O cirurgião-dentista, dependendo da situação clínica do paciente, pode optar por algumas substâncias químicas para realizar a higienização bucal, dentre os produtos, tem-se: gluconato de clorexidina a 0,12%, o qual minimiza a formação de biofilme e ácidos por um período prolongado devido à substantividade; água bicarbonatada (alcalinizante) substância importante em quadros de ulcerações e no combate a fungos e bactérias; solução enzimática à base de lactoperoxidase apresenta função antimicrobiana e hidratante; e peróxido de hidrogênio a 15% com efeito inibitório sobre cepas de *C. albicans*, uma vez que essas substâncias podem ser manipuladas por meio de gaze ou swab de espuma. Porquanto, a escovação com dentifrícios, ainda segue sendo a conduta eficaz para diminuição da placa e para hidratação dos lábios e mucosas pode-se utilizar lanolina e saliva artificial, concomitantemente (PADOVANI et al., 2012).

Em suma, o profissional da área odontológica tem como atributos a promoção de saúde, prevenção, orientação aos demais profissionais, identificação de danos causados por procedimentos invasivos, interpretar exames complementares, diagnósticos, estabelecimento de tratamentos específicos como: higiene bucal associados ao uso de antissépticos, saliva artificial, antifúngicos intrabucais e aplicação de laser de baixa potência em lesões (aftas, úlceras). (BATISTA et al., 2014; GAETTI-JARDIM et al., 2013)

#### 4.7 MICROBIOTA ORAL E FUNGEMIA (CANDIDEMIA)

A afirmação acerca da candidemia ser adquirida através da via endógena é frequente na literatura. (COLOMBO et al., 2006). Barros et al. (2018) considera a cavidade oral como início e parte integrante deste trato e reforça que a boca é uma porta de entrada para fungos patogênicos e oportunistas. Desta forma, suspeita-se que a colonização/infecção por *Candida* no sítio bucal, contribui à colonização da mucosa gastrintestinal e subsequente infecção fúngica sistêmica, através dos capilares mesentéricos.

Entende-se por colonização fúngica a relação simbiótica do fungo com o hospedeiro, onde tais microrganismos residem em tratos internos com aberturas externas (trato digestivo e região bucal). Além disso, sabe-se que a colonização predispõe a infecção fúngica invasiva (MONTAGNA et al., 2010; Yu et al., 2013).

A partir disso, a literatura constata que cavidade oral, é um dos principais sítios de colonização por *Candida*, além do trato gastrointestinal, variando entre 20% a 55%. Cerca de 10% a 50% dos neonatos críticos apresentam colonização na primeira semana em ambiente hospitalar e conforme o decorrer das semanas de hospitalização, mais de 64% estão colonizados. (KUZUCU et al. 2008; BORGES et al., 2009). Contudo, Ingram et al. (2019) entende esta colonização como fator de risco independente para candidemia. Uma vez que, nas duas primeiras semanas de vida, a colonização ocorre, majoritariamente, no trato gastrointestinal e respiratório, isto se deve à transmissão vertical associada ao parto.

Porém, Batista et al. (2014) em seu estudo, afirma que  $\frac{3}{4}$  dos neonatos internados já apresentam colonização oral no primeiro mês de vida, e enfatiza que a colonização oral aumenta suscetibilidade para infecções fúngicas invasivas, dado que o gênero *Candida* é predominante entre os demais fungos, apresentando incidência de 1,6% a 16%, onde a taxa de mortalidade é alarmante, com um percentual de 25% a 60%.

Foi realizada uma pesquisa por Borges et al. (2009) em UTIN brasileira, por meio de coletas semanais de mucosa oral e perianal. De um total de 114 neonatos internados, 19,3% estavam colonizados por *Candida*, na qual 31,1% ocorreram em mucosa bucal. E um estudo epidemiológico realizado por Tinoco-Araújo et al. (2013), onde houve coleta na cavidade oral de 65 recém-nascidos prematuros hospitalizados em UTIN, manifestando alterações na mucosa bucal, resultou na colonização de *Candida spp.* em 52 pacientes (aproximadamente 80%) sendo um número bastante elevado, onde o mesmo salienta que o diagnóstico precoce de candidíase oral previne uma possível candidemia.

A colonização/infecção por *Candida* na mucosa bucal pode apresentar relação com a candidemia. Tal hipótese é evidenciada pela propagação dos patógenos para região faríngea e gastrointestinal, na qual ocorre a disseminação para corrente sanguínea e posteriormente propicia adesão nos órgãos, uma vez que as leveduras podem alcançar a faringe e propiciar perfuração, estenose e sangramento. Além disso, secreções produzidas em boca podem contaminar dispositivos como sondas e também chegar ao trato gastrointestinal (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

A epidemiologia molecular é uma ótima ferramenta para estudos que objetivam a caracterização genética, obter conhecimento sobre as similaridades entre as espécies e a origem das infecções nosocomiais

Há indícios sobre a colonização/infecção por *Candida* na cavidade oral estar associada ao acometimento de fungemia, todavia, a literatura cita que não há dados consistentes para tal afirmação. Para Junior e Izabel (2019) é imprescindível mais estudos longitudinais com metodologia rigorosa, tamanho amostral significativo e utilização da biologia molecular, para esclarecer esta

relação de causa-efeito, a fim de proporcionar novas abordagens terapêuticas, e conseqüentemente obter um cuidado integral ao indivíduo.

#### 4.8 TIPAGEM DE SEQUÊNCIA MULTILOCUS (MLST)

Conforme avança a biologia molecular, técnicas de genotipagem estão sendo desenvolvidas para caracterização e conhecimento acerca das estruturas genéticas dos microrganismos. Estes métodos são importantes para entendimento das relações genéticas, similaridade entre isolados, origem das cepas (endógena ou exógena) e transmissão das infecções (WU et al. 2015).

A ferramenta de tipagem (digitação) de sequência multilocus, é uma técnica biomolecular, baseada no polimorfismo de nucleotídeos “single-nucleotide polymorphisms (SNPs)” de isolados microbianos, associada à bioinformática. Foi introduzido pelo estudo comandado por Maiden et al. (1998) que desenvolveram e validaram esta metodologia através da identificação de linhagens virulentas de *Neisseria Meningitidis*. Estudaram 11 *housekeeping genes* (genes de limpeza com aproximadamente 450 a 500 pares de base, que são expressos constantemente, sendo estáveis) de 107 isolados. Em seus resultados, observaram que havia uma correlação significativa entre os fatores de virulência e os genes estudados, e como novidade as sequências poderiam ser adicionadas em um banco de dados global, onde o endereço virtual naquela época era “World Wide Web site”.

Urwin e Martin (2003) discorreram em uma importante revisão sobre o uso global da MLST, e delineararam o processo desta técnica, que se dá primeiramente pela coleta de dados, que inclui: amostra dos isolados microbianos, isolamento do DNA (métodos de extração), ampliações dos genes alvos pela técnica da PCR, purificação dos produtos da PCR, reações de sequenciamento utilizando primers internos, determinação das sequências dos nucleotídeos. Posteriormente há análise de dados, por meio da realização da montagem de dados de sequência, investigação do banco de dados MLST para sequência de alelos e identificação de DST (alelos novos são verificados, encaminhados a curadoria e caso aceitos, são incluídos ao site MLST).

Cada sequência de nucleotídeos (respectivo a um gene) é inserida individualmente no banco de dados e comparada com os dados registrados no website, se corresponder a uma sequência idêntica, será fornecido um número de alelo e assim respectivamente. Com a sequência alélica informada, estes números serão reinseridos no banco de dados, e um número de cepa/genótipo será fornecido, ou seja, o produto final é o tipo de sequência diploide (DST). As sequências obtidas serão disponibilizadas na forma de Cromatogramas, a fim de identificar a heterozigiosidade dos SNPs, presente nos genes. E conforme as cepas são identificadas, as estirpes mais similares são organizadas em conjuntos de isolados, denominados Clusters ou Clados (representadas por um dendograma), por meio do software eBurst, que analisa o conjunto de dados alélicos e unifica isolados que apresenta um único gene diferente – cluster clonal (ODDS, JACOBSEN; 2008).

#### 4.8.1 USO DE MLST PARA TIPAGEM DE *CANDIDA*

Para estudo do gênero *Candida*, a técnica MLST fornece informações precisas sobre: identificação dos agentes patogênicos e suas respectivas cepas, fontes anatômicas, características genotípicas, variabilidade genética entre as espécies (estruturas subpopulacionais), proporciona estabilidade genômica e poder discriminatório entre as estirpes (evidências de semelhanças). Ademais, as informações do MLST para epidemiologia molecular da *Candida*, têm como função confirmar estudos anteriores e refinar as informações de dados filogenéticos (ODDS, JACOBSEN; 2008).

A fim de verificar as similaridades entre as cepas de *Candida* encontradas na cavidade oral e corrente sanguínea, a pesquisa utilizará a técnica MLST para determinar os polimorfismos das sequências de DNA dos isolados e assim caracterizá-los. Até o presente momento, a tecnologia MLST desenvolveu esquema para as seguintes espécies: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* e *C. krusei.*, apesar da *C. parapsilosis* ser um agente etiológico importante nos casos de candidemia, tal levedura apresenta escassez de polimorfismos alélicos, logo, torna-se inviável para realização do MLST.

Neste estudo, será feito o MLST de *C. albicans* e *C. tropicalis*, pois são fungos responsáveis por uma parcela significativa das infecções orais e da corrente sanguínea em pacientes infantis, além de serem comumente isoladas da região bucal e de hemoculturas.

#### 4.8.1.1 MLST E *CANDIDA ALBICANS*

*C. albicans* é um fungo diploide, apresenta reprodução clonal e elevada heterogozidade, com aproximadamente 62.000 SNPs em seu genoma, na qual a identificação dos SNPs heterozigóticos auxilia na diferenciação das cepas, possuindo alta plasticidade genômica. Para chegar ao consenso de quantos *housekeeping genes* seriam necessários para discriminar as estirpes de *C. albicans*, estudos realizados por Bougnox et al. (2002) e Tavanti et al. (2003), manusearam até 10 fragmentos em seus respectivos isolados. Ambos os pesquisadores em 2003, constataram que uma combinação de 07 fragmentos de genes, com sequências de DNA de regiões de 300 a 400 pb, seriam suficientes para uma eficiente diferenciação em genótipos únicos, sendo: AAT1 (Asparato aminotransferase), ACC1 (Acetil coenzima A carboxilase), ADP1 (Permease ATP-dependente), MPIb (Manose fosfato isomerase), SYA1 (Alanil-RNA sintetase), VPS13 (Proteína vacuolar) e ZWF1 (Glicose-6-fosfato desidrogenase). O endereço eletrônico com o banco de dados de *C. albicans*, encontra-se (<https://pubmlst.org/calbicans/>) (MATTA, 2009; DADAR et al., 2018).

Cepas de *C. albicans* estão organizadas em múltiplos clados maiores e menores, somando um total de 17 clados. Epidemiologicamente, as estirpes de *C. albicans* estão inseridas frequentemente no clado 1, sendo predominantes em grande parte do globo. Outrora, o clado 2 é encontrado majoritariamente no Reino Unido, enquanto o clado 4 está presente no Oriente médio e África, clado 11 na Europa Continental e referente aos clados 14 e 17, predominam na região do Pacífico (ODDS et al. 2007).

Su et al. (2018) realizaram um estudo inédito, que possuía a finalidade de constatar se cepas colonizadoras e patogênicas de *Candida albicans* possuíam

homologia entre si, por meio da técnica MLST, em neonatos internados em UTIN. Foram isoladas 48 amostras de 12 recém-nascidos com sepse fúngica, oriundas da faringe, ânus e pele, que resultou em 05 cepas patogênicas (DST1867, DST2551, DST2552, DST2937 e DST2945) e 36 de neonatos saudáveis, gerando 09 genótipos de colonização. Por fim, verificaram elevada diversidade em ambos os genótipos de colonização e infecção, onde todas as cepas eram distintas entre os dois grupos, contudo, alguns isolados patogênicos apresentaram uma relação genética altamente homóloga com certos isolados de colonização, sugerindo que tal similaridade poderia advir do mesmo ancestral.

Em consonância Song et al. (2014) também utilizou a tipagem MLST para investigar a clonalidade de *Candida albicans*, recuperadas em um período de 08 anos (2005-2012), isoladas de recém-nascidos em UTIN. Um total de 43 isolados (originadas de sangue, urina e outros) foram estudados, na qual 25 tipos de DSTs foram identificados, destes, 10 DSTs foram homólogos para 28 isolados. Utilizaram o MLST e PFGE para confirmar se tais cepas eram homólogas e como resultado, 22 isolados (51,2%) compartilharam oito genótipos, sugerindo cepas clonais, visto que os óbitos ocorreram em pacientes que estavam colonizados ou infectados por genótipos homólogos. Além disso, salientou-se que MLST é uma ótima ferramenta para genotipar cepas provenientes de pacientes internados em ambiente intensivo.

E Tsai et al. (2015) pesquisaram em um centro médico de Taiwan, as características clínicas e moleculares de candidemia em pacientes pediátricos, durante 09 anos. Houve 79 episódios de candidemia por *C. albicans*, em 76 pacientes pediátricos (51,9% UTI-ped e 30,4% UTIN). De um total de 72 isolados, identificaram-se 53 DSTs, na qual DST693 e DST1849 apresentaram maior recorrência, sendo (22,2%) das cepas do clado 1, seguidos do (13,9%) clado 4 e (9,7%) clado 3.

Cliff et al. (2008) executaram uma pesquisa a fim de verificar a prevalência da colonização de *Candida* em UTI. Constatou-se que 79% dos pacientes apresentaram colonização, visto que a boca foi o sítio anatômico mais colonizado em comparação as outras áreas como virilha e dedos, além de *C. albicans* ser a espécie mais isolada da cavidade oral. MLST foi a técnica escolhida para o

estudo da epidemiologia molecular, e foram identificados 34 DSTs, visto que o DST69, incluído no Clado 1, foi a estirpe de *C. albicans* mais comumente encontrada no estudo. Outrossim, McManus et al (2012) verificaram no banco de dados MLST para *C. albicans* que isolados da cavidade oral, esôfago e sangue de pacientes do Brasil, Holanda, Hong Kong e Irlanda eram pertencentes ao genótipo DST444.

#### 4.8.1.2 MLST E *CANDIDA TROPICALIS*

*Candida tropicalis* está presente na cavidade oral e é um dos principais responsáveis pela candidemia. O primeiro estudo para tipagem de *Candida tropicalis* foi realizado por Tavanti et al. (2005) que optaram por 06 *housekeeping genes* para diferenciação das estirpes, sendo: ICL1 (Isocitrato-liase), MDR1 (Proteína de resistência a múltiplas drogas), SAPT2 (Protease aspártica secretada 2), SAPT4 (Protease aspártica secretada 4), XYR1 (D-Xilose redutase I ou II) e ZWF1a (Putativa glicose-6-fosfato desidrogenase). Foram testadas 106 amostras e o sistema diferenciou 87 tipos de sequências diploides, convergindo em 3 cladros e desta forma, verificaram que os fragmentos de genes escolhidos apresentavam satisfatória discriminação genotípica. Para ter acesso ao banco de dados de *C. tropicalis* MLST, é preciso acessar o website (<http://pubmlst.org/ctropicalis/>) (ALANIO et al. 2017).

O estudo de Wu et al. (2019) analisou o padrão global de variação genética da *C. tropicalis* em 16 países, representando 5 continentes. Os dados das sequências de DNA foram extraídos do banco de dados MLST de *Candida tropicalis* resultando no total de 875 isolados, e constatou-se que houve um total de 633 tipos de DSTs e 280 dos 2.677 (10,5%) nucleotídeos eram polimórficos. Além disso, 336 cepas compartilharam genótipos similares (93 DSTs). Concluíram que variações genéticas estavam associadas a nível local e regional e relataram que menos de 10% dos países estão representados no banco de dados, devendo haver um esforço para maiores registros epidemiológicos desta espécie.

Na América do Sul, Magri et al. (2013) realizaram o primeiro estudo de caracterização molecular de *C. tropicalis* por meio do MLST. Utilizaram isolados de *C. tropicalis* de pacientes adultos e pediátricos internados em UTI diagnosticados com candidemia, em dois hospitais de ensino em São Paulo. De 61 isolados, 48 eram advindos da corrente sanguínea e 13 das pontas do cateter, resultando em 39 DSTs, visto que os DST 124, DST 139, DST 203 já eram registrados no website, e o genótipo mais frequente foi o DST 232, o qual era mais prevalente em crianças.

## 5 ESTRATÉGIAS METODOLÓGICAS

### 5.1 TIPO DE PESQUISA

Trata-se de um estudo observacional, longitudinal e descritivo.

### 5.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO E POPULAÇÃO DE INTERESSE

A pesquisa foi realizada em 04 unidades hospitalares, sendo a unidade A um hospital infantil público com UTI pediátrica e está localizada na zona leste de Manaus; unidade B uma maternidade pública com duas UTIs neonatais e está localizada na zona centro-sul de Manaus; unidade C um hospital infantil público com duas UTIs pediátricas e está localizado na zona oeste de Manaus; e unidade D um hospital-maternidade privado com UTI neonatal/pediátrica localizada na zona centro-sul de Manaus.

A coleta foi realizada durante um período de quatro meses, conforme os critérios do Ministério da Saúde (BRASIL, 2012), em todos os pacientes neonatais (04 primeiras semanas de vida ou até 28º dia, sendo pré-termo com idade gestacional (IG): <36 semanas; a termo com IG: 37 a 40 semanas, e pós-termo com IG: 42 semanas) e pediátricos (lactentes a partir do 29º dia após o nascimento até 365 dias e crianças de 01 ano a 12 anos) que deram entrada em UTI neonatal e pediátrica, respectivamente, nas unidades hospitalares envolvidas no estudo.

### 5.3 PLANO DE RECRUTAMENTO E NÚMERO DE SUJEITOS DA PESQUISA

Entraram no estudo todos os recém-nascidos e crianças que atenderam aos critérios de inclusão (item 5.3.1). As unidades hospitalares desta pesquisa, somaram um total de 48 leitos de UTI neonatal/pediátrica. Portanto, a partir do número de leitos, média de tempo de internação e período da pesquisa, estimou-

se um número de 100 pacientes infantis internados em UTIN e UTI-ped para compor este estudo.

#### 5.3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

Os pacientes foram incluídos no estudo mediante os seguintes critérios: Aceite dos familiares ou responsáveis legais em participar da pesquisa mediante a concordância do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE); paciente estar internado em Unidade de Terapia Intensiva neonatal e pediátrica; apresentar faixa etária de até 12 anos. E um mesmo paciente foi considerado como novo caso quando houve uma nova hemocultura positiva após 30 dias do primeiro caso detectado.

#### 5.3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

Foram excluídos para coleta na cavidade oral recém-nascidos com prematuridade extrema (<28 semanas).

#### 5.4 PLANO DE COLETA DE DADOS

Os dados foram levantados junto ao Serviço de Arquivo Médico e Estatísticas (SAME) de cada uma das Unidades participantes do estudo, conforme autorização para utilização dos mesmos. Tais autorizações foram fornecidas tanto pela Secretaria Estadual de Saúde, e diretores de cada uma das Unidades.

Para caracterizar o perfil epidemiológico e clínico de pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal e Pediátrica, as informações clínicas foram extraídas de prontuários médicos, por meio de um formulário de coleta de dados (Apêndice C), e incluiu: idade, gênero, naturalidade, tipo de instituição, setor, período de internação hospitalar antes da candidemia, doenças subjacentes, cirurgia nos últimos 30 dias, presença de um cateter intravenoso ou

qualquer outro dispositivo artificial no momento da internação e evolução (alta ou óbito).

Os responsáveis dos pacientes encaminhados à UTI neonatal ou UTI pediátrica foram abordados pelo pesquisador, a fim de obter autorização para as coletas na cavidade bucal, bem como a permissão para uso dos fungos isolados do paciente durante o período de internação na UTI para os estudos de caracterização dos mesmos, através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

As coletas foram realizadas nas Unidades hospitalares, durante o período determinado para o estudo, a partir da entrada de novos pacientes internados em UTIN/UTI-ped que atenderam aos quesitos de inclusão do estudo.

## 5.5 AMOSTRAS

No estudo utilizou-se os fungos da mucosa bucal para determinar os microrganismos residentes. Os pacientes foram acompanhados enquanto estavam internados em UTI para observar a suspeita de fungemia. O procedimento de coleta de sangue foi feito conforme rotina da unidade hospitalar.

Para observar e correlacionar os genótipos de leveduras da cavidade oral e corrente sanguínea, por meio da técnica molecular de Multilocus Sequence Typing (MLST), foram manuseadas as cepas de *Candida* previamente isoladas das coletas da cavidade oral (coleta feita pela pesquisadora) e de hemocultura (coleta feita pelos profissionais das UTIs).

### 5.5.1 COLETA DAS AMOSTRAS

A própria pesquisadora realizou uma coleta inicial em cavidade oral - antes da equipe de assistência hospitalar efetivar profilaxia com digluconato de clorexidina 0,12% - em áreas de mucosa jugal, língua e palato duro. O material foi coletado com a utilização de *swab's* estéreis, por meio de movimentos de

fricção, após isso, estes dispositivos foram levados ao laboratório do Instituto Leônidas e Maria Deane - FIOCRUZ.

Coletou-se as amostras de sangue a partir de um vaso sanguíneo periférico, em pacientes que apresentaram sinais e sintomas clínicos de sepse, somado a suspeita de fungemia clínica pela equipe médica, mas estes procedimentos foram realizados pelos enfermeiros da UTIN e UTI-ped das Maternidades/Hospitais infantis e a hemocultura feita pelo laboratório responsável no atendimento de cada unidade hospitalar.

Quando a hemocultura destes pacientes se apresentava positiva para *Candida*, a pesquisadora retornava a UTI neonatal ou UTI pediátrica e realizava uma segunda coleta em mucosa oral com *swab* estéril, para observar possíveis alterações da microbiota bucal. Para realização da genotipagem pela técnica MLST, foi necessário que o paciente apresentasse hemocultura positiva para *Candida* e tivesse sido submetido a duas coletas em mucosa oral para poder correlacionar os genótipos de *Candida* encontradas na cavidade oral com as isoladas da corrente sanguínea. Para cada caso positivo de candidemia houve dois controles, que foram pacientes com data de admissão e perfil clínico similares. Assim houve uma segunda coleta da cavidade oral do paciente com candidemia e dois pacientes controle sem candidemia para cada caso positivo. Esse procedimento foi proposto para verificar uma possível existência de associação causal entre a composição ou mudança da microbiota oral e o desenvolvimento da candidemia.

## 5.6 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

Realizou-se as análises no Laboratório de Biodiversidade em Saúde/Micologia do ILMD-Fiocruz. Após a coleta em cavidade oral, os espécimes clínicos foram semeados em uma placa de Petri contendo meio de cultura CHROmagar<sup>TM</sup> *Candida* (BD, Paris, França) e outra com meio Sabouraud (Difco) através da rotação do *swab* na placa contendo o meio de cultura, por

meio da técnica de esgotamento e foram incubados em estufa bacteriológica a 28°C por 48 horas e, após este período, ocorreu a leitura das placas.

Os isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* foram identificados pela observação da morfologia e pigmentação das colônias após o crescimento nas placas com meio de cultura CHROmagar™ *Candida* (BD, Paris, França). Nesse meio, *C. albicans* apresenta colônia na cor verde, *C. tropicalis* na cor azul acinzentado e *C. krusei* na cor rosa e rugosa. As demais espécies de *Candida* são de cor branca à malva. Essas espécies não identificadas pela macromorfologia foram sequenciadas no Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM) no INPA, utilizando a região ITS, conforme Taverna et al. (2013) e detalhado no item 5.6.1.2.

As cepas isoladas das hemoculturas realizadas pelo Laboratório que atende à unidade hospitalar foram levadas também para o Laboratório de Biodiversidade em Saúde/Micologia do ILMD-Fiocruz. E realizou-se a análise de pureza e confirmação das espécies previamente identificadas, através do cultivo em CHROMagar™ *Candida* ou pelo sequenciamento.

## 5.6.1 SEQUENCIAMENTO DAS LEVEDURAS

### 5.6.1.1 EXTRAÇÃO DO DNA

A levedura não identificada no meio cultura CHROmagar™ *Candida* foi transferida com auxílio de alça bacteriológica descartável para microtubo contendo 1mL do meio líquido YPD (1% extrato de levedura; 2% glicose; 2% peptona) e foi incubado a 28°C durante 16 a 24 horas. A extração deu-se através da utilização do Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Germany). Após centrifugar a 8000 rpm (5200 RCF) por 1 minuto e desprezar o sobrenadante, foi acrescido ao microtubo 180 µL de tampão de lise (ATL) e pérolas de vidro lavadas em ácido. As células foram rompidas com choque mecânico através de maceração durante 2 minutos e depois procedeu-se a extração genômica com adição de Proteinase K overnight a 56°C. Posteriormente a este período, foi adicionado 200 µL de tampão de guanidina (AL) e feita agitação a frio em vórtex

por 15s para posterior incubação por 10 min a 72 °C, em termobloco. Em seguida, foi adicionado o mesmo volume, 200 µL, desta vez de etanol e feita a homogeneização em agitador. A mistura será transferida para as colunas de sílica e centrifugada a 8000 rpm (5200 RCF) por 1 min. O material foi transferido para um novo tubo da coluna e 500 µL do primeiro tampão de lavagem foram adicionados à coluna (AW1), para em seguida, ser centrifugado por 1 min a 8000 rpm (5200 RCF). Novamente procedeu-se a troca do tubo da coluna e 500 µL do segundo tampão de lavagem (AW2) foram adicionados à coluna de sílica, e centrifugado a 14000 rpm (15900 RCF) por 3 min. O DNA foi recuperado com 100 µL de tampão de eluição (AE) próprio do kit, após centrifugação a 8000 rpm (5200 RCF) por 1 min. A coluna foi desprezada e o filtrado armazenado a -20 °C.

#### 5.6.1.2 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DOS GENES, SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE

Foram utilizados os primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3 ') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3 ') para a amplificação da região ITS. As reações foram realizadas em um volume de 25 µL contendo: 10,2 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura, 2,5 mM de solução tampão, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5,0 mM de dNTP, 0,5 µM de cada primer, 0,3 U Taq DNA polimerase e 30 ng de DNA. As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 55°C por 1 min, 72°C por 2 min e uma extensão final a 72°C por 10 min (Taverna et al, 2013).

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain em tampão TBE 1x, juntamente com marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen™) e corante 6x Orange Loading Dye, visualizados em um transiluminador de luz UV.

A purificação do DNA amplificado foi feita de acordo com protocolo do kit de purificação de DNA (PROMEGA). As reações de sequenciamento foram feitas utilizando-se o kit "BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems) de acordo com instruções do fabricante. Os produtos da PCR foram sequenciados na direção forward e reverse utilizando os mesmos primers da

amplificação inicial. A eletroforese capilar foi realizada em sequenciador ABI 3130 Genetic Analyzer.

A similaridade das sequências foi obtida usando a ferramenta de alinhamento de sequência do Fungal Biodiversity Centre no site da CBS ([cbs.knaw.nl/collections/BioloMICSSequences.aspx](http://cbs.knaw.nl/collections/BioloMICSSequences.aspx)) (Holanda).

## 5.7 TIPAGEM MOLECULAR POR SEQUENCIAMENTO DE MULTILOCUS (MLST) DE *CANDIDA*

Foi feito o MLST de *Candida albicans* e *C. tropicalis*.

### 5.7.1 EXTRAÇÃO DO DNA DAS AMOSTRAS ESTUDADAS

A extração de DNA foi feita conforme o item 5.6.1.1.

### 5.7.2 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DOS GENES SELECIONADOS PARA O ESTUDO DO MLST

Essa etapa compreendeu a amplificação dos “housekeeping genes” de cada espécie de *Candida* selecionada. Para *C. albicans*, foram estudados 7 genes, sendo: AAT1, ACC1, ADP1, MPIb, SYA1, VPS13 e ZWF1, conforme a metodologia descrita nos trabalhos de Bougnoux et al. (2002), Bougnoux et al. (2003). Referente a *C. tropicalis*, foram analisados 6 genes: ICL1, MDR1, SAPT2, SAPT4, XRY1, ZWF1a, de acordo com estudo de Tavanti et al. (2005). As sequências dos “primers” utilizados na amplificação de cada um dos fragmentos estão descritas nos quadros 1 e 2.

Quadro 1. Lista de fragmentos de genes que foram amplificados no ensaio do MLST para *C. albicans* com as sequências dos respectivos primers.

<b>Gene</b>	<b>Produto do gene</b>	<b>Primers</b>	<b>Tamanho do Aplicon (pb)</b>
AAT1a	Asparato Aminotransferase	Fwd 5'-ACTCAAGCTAGATTTTTTGGC -3 ' Rev, 5'-CAGCAACATGATTAGCCC -3 '	478
AAC1	Acentilcoenzima Acarboxilase	Fwd,5'GCAAGAGAAATTTTAATTCAATG-3 ' Rev, 5'-TTCATCAACATCATCCAAGTG-3	519
ADP1	Permease ATPdependente	Fwd 5'-GAGCCAAGTATGATTTG -3 ' Rev, 5'-TTGATCAACAAACCCGATAAT -3 '	537
MPib	Manose Fosfato Isomerase	Fwd 5'-ACCAGAAATGGCCATTGC-3 ' Rev, 5'-GCAGCCATGCATTCAATTAT -3 '	486
SYA1	Alanil –RNA Sintetase	Fwd 5'-AGAAGAATTGTTGCTGTTACTG -3 ' Rev, 5'-GTTACCTTTACCACCAGCTTT -3 '	543
VPS13	Proteína Vacuolar	Fwd, 5'-TCGTTGAGAGATAATCGACTT -3 ' aRev 5'-ACGGATGGATCTCCAGTCCC-3'a	741
ZWF1	Glicose-6-fosfato desidrogenase	Fwd 5'-GAGCCAAGTATGAATGATTTG-3 ' Rev, 5'-TTGATCAACAAACCCGATAAT-3'	702

Quadro 2. Lista de fragmentos de genes que foram amplificados no ensaio do MLST para *C. tropicalis* com as sequências dos respectivos primers.

<b>Gene</b>	<b>Produto do gene</b>	<b>Primers</b>	<b>Tamanho do Aplicon (pb)</b>
ICL1	Isocitrato-liase	Fwd 5'- CAACAGATTGGTTGCCATCAGAGC-3' , Rev, 5'- CGAAGTCATCAACAGCCAAAGCAG-3' ,	447
MDR1	Proteína de resistência a múltiplas drogas	Fwd, 5'-TGTTGGCATTACCCCTTCCT-3' , Rev, 5'-TGGAGCACCAAACAATGGGA-3' ,	425
SAPT2	Protease aspártica secretada 2	Fwd 5'-CAACGATCGTGGTGCTG-3' , Rev, 5'-CACTGGTAGCTGAAGGAG-3' ,	525
SAPT4	Protease aspártica secretada 4	Fwd 5'- TGCTTCTCCTACAACCTTCACCTCC-3' , Rev, 5'- ATTCCCATGACTCCCTGAGCAACA-3' ,	390
XRY1	D-Xilose redutase I ou II	Fwd 5'-AGTTGGTTTCGGATGTTG-3' , Rev, 5'-TCGTAAATCAAAGCACCAGT-3' ,	370
ZWF1a	Putativa glicose-6-fosfato desidrogenase	Fwd, 5'-GGTGCTTCAGGAGATTTAGC-3' , Rev 5'ACCTTCAGTACCAAAAGCTTC-3' <sup>a</sup>	520

A amplificação dos fragmentos pela PCR foi feita com volume final de reação de 30 µl contendo ~40 ng de DNA genômico e as seguintes concentrações finais de reagentes: 17,5 µl água ultrapura, 2,5 µl solução tampão a 10X sem MgCl<sub>2</sub>, 1,0 µl de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM, 0,5 µl de dNTPs a 10 mM, 1 µl de cada primer forward e reverse a 5 mM e 0,5 U de Taq DNA polimerase. As condições da reação de PCR implicaram na desnaturação por 3 minutos a 94 °C seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, hibridização por 1 minuto a 52°C, extensão por 1 minuto a 72°C e extensão final por 10 minutos a 72°C. Após essa etapa foi feita a purificação dos produtos de PCR por PEG 8000 (Polietilenoglicol).

### 5.7.3 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DOS FRAGMENTOS DOS GENES ESCOLHIDOS

O sequenciamento foi realizado no Laboratório Temático de Biologia Molecular no INPA. Foram utilizados os fragmentos descritos no item 5.7.2, após a amplificação e purificação dos produtos de PCR. A reação de sequenciamento foi realizada de acordo com as instruções do fabricante do Kit BigDye<sup>®</sup> Terminator V3.1. Seu volume final foi de 10 µl contendo ~5 a 20 ng de produto amplificado e as seguintes concentrações finais de reagentes: 3,5 µl água ultrapura, 2,0 µl do primer específico a 3,3 mM, 0,5 µl de BigDye a 2,5x, 2,0 µl de tampão a 5x e 2 µl de produto amplificado. As condições da reação de sequenciamento foi a desnaturação por 1 minuto a 95 °C seguido de 20 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 segundos, hibridização a 55 °C por 15 segundos e extensão a 60 °C por 2 minutos seguidos de 10 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 segundos, hibridização a 55 °C por 15 segundos e extensão a 60 °C por 3 minutos, com extensão final a 72 °C por 7 minutos. Após esse procedimento realizou-se a purificação da reação de sequenciamento e a eletroforese capilar foi realizada no sequenciador ABI 3130 Genetic Analyzer.

#### 5.7.4 IDENTIFICAÇÃO DOS SÍTIOS POLIMÓRFICOS

As sequências obtidas foram disponibilizadas na forma de cromatogramas, a fim de identificar a heterozigidade presente nos genes estudados. Para isso, alinhou-se utilizando o Programa Sequencher 5.4.6. Os sítios heterozigóticos foram substituídos pelas letras K, M, S, R, Y e W padronizadas pelo sistema internacional de códigos IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Cada uma dessas letras corresponde a uma heterozigose. Quando a sequência apresenta uma heterozigose envolvendo as bases G+T=K / A+C=M / C+G=S / A+G=R / C+T=Y e A+T=W. As sequências Forward e Reverse foram alinhadas gerando uma sequência consenso que foi analisada no site <https://pubmlst.org/calbicans/> e <http://pubmlst.org/ctropicalis/> para que fossem identificados os alelos para cada um dos genes (essas combinações foram depositadas nesse banco de dados) e gerar os DSTs, conforme está detalhado no item 4.7.5.

#### 5.7.5 INTRODUÇÃO DAS SEQUÊNCIAS NO WEBSITE OFICIAL DO MLST PARA COMPARAÇÃO COM A BASE DE DADOS

Cada cepa foi caracterizada quanto aos DSTs que resultaram da combinação dos alelos obtidos dos genes estudados de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Sequências foram copiadas e adicionadas ao site oficial do MLST (<https://pubmlst.org/calbicans/>) e (<http://pubmlst.org/ctropicalis/>) onde houve a possibilidade de introduzir a sequência de um determinado gene por vez de cada isolado para a verificação do alelo correspondente àquela sequência. A finalidade foi comparar com a base de dados do MLST via internet, e após ter todos os alelos definidos, incluiu-se novamente no site MLST afim de determinar o genótipo/DST da cepa isolada e desta forma, realizou-se a comparação entre as cepas de *Candida* da cavidade oral e corrente sanguínea, afim de verificar a possível relação.

A análise das sequências foi realizada pelo sistema Jalview do website que fornece o número do DST e, se a sequência corresponde a alguma já

existente na base de dados de maneira idêntica ou similar a um determinado perfil alélico. Desta maneira, se nosso alelo não for encontrado na base de dados do MLST para *C. albicans* e *C. tropicalis*, é importante retornar ao cromatograma para verificar se houve algum erro durante a análise da leitura visual ou se a diferença encontrada é real.

Os novos alelos encontrados poderão ser adicionados ao banco de dados do website depois do envio das sequências e cromatogramas aos responsáveis pela base de dados que assinalarão estas sequências como sendo novos genótipos. O DST é determinado pela combinação dos alelos encontrados para cada gene analisado.

## 5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados apurados foram registrados em uma planilha de coleta desenvolvida no programa Microsoft Excel®, contendo as variáveis. Posteriormente foram analisados no software estatístico R na versão 4.0.2, usando o Rstudio versão 1.1.4, com pacotes diversos (tidyverse, gtsummary e gt). Para as variáveis numéricas foram utilizadas como medidas resumo a média ou mediana e para as variáveis categóricas foram utilizados as frequências e os percentuais.

As distribuições de frequências das características clínicas e epidemiológicas foram apresentadas na forma de tabelas.

## 5.9 ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS DA PESQUISA

Este trabalho foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos do Hospital Universitário Getúlio Vargas (HUGV) e está aprovado com o CAAE- Certificado de Apresentação para Apreciação Ética N. 47110821.2.0000.9167. A coleta de dados respeitou os preceitos éticos recomendados internacionalmente, no que diz respeito à pesquisa com seres

humanos e o disposto na Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), assim como o disposto na Resolução 510/CNS/2016.

Quanto aos participantes da pesquisa, os responsáveis legais foram apresentados ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice A), onde foram convidados a permitirem a participação dos menores voluntariamente neste estudo, se concordarem e derem seu consentimento por escrito, assinando duas vias do TCLE.

#### 5.10. ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

Os isolados originais foram repicados em duplicata em tubos de ensaio com meio de cultura Ágar Sabouraud glicose 2% e armazenados no Laboratório de Biodiversidade em Saúde/Micologia do ILMD-Fiocruz para preservação durante o período do estudo. Os responsáveis assinaram um Termo de Consentimento livre e Esclarecido para Biorrepositório (Apêndice B) para permitir o armazenamento das amostras.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E CLÍNICO DOS PACIENTES INTERNADOS EM UTIN E UTI-PED

Entre os meses de julho a novembro de 2021, participaram da pesquisa um total de 107 pacientes dos quais obtiveram-se dados de prontuário para descrição do perfil epidemiológico e clínico, sendo 61 (57,01%) recém-nascidos da UTI neonatal, 22 (20,56%) lactentes e 24 (22,43%) crianças da UTI pediátrica. As unidades hospitalares foram designadas como A (hospital infantil público), B (maternidade pública), C (hospital infantil público) e D (hospital infantil/maternidade privada).

Referente à UTI neonatal (Tabela 1), a média de idade para os recém-nascidos internados, no momento da avaliação, foi de 11 dias com idade gestacional de 33,9 semanas (pré-termo moderado), onde constatou-se um predomínio de pacientes do sexo masculino (54%), sendo 71% (43/61) da raça/cor parda e 29% (18/61) da cor branca, com peso médio de 2000 g e quanto ao parto, 66% nasceram de parto cesárea, enquanto 34% foram de parto normal. Identificou-se também, que 80% dos neonatos fizeram uso de ventilação mecânica, 57% de nutrição parenteral, 41% cateter umbilical e 33% precisaram ser intubados. Concernente à evolução, o percentual de óbitos foi de 12%.

Para a UTI pediátrica (Tabela 1), constataram-se dois grupos com faixas etárias distintas: pós-neonatal ou lactente (>29 a 365> dias de vida) e infantil (01 a 12 anos). Sobre o perfil de lactentes hospitalizados, no momento da coleta, notou-se uma idade média de 02 meses, sendo, em sua maioria, do gênero masculino (55%), onde na variável raça/cor, percebeu-se a predominância de pardos 77,3% (17/22), seguida da cor branca 22,7% (5/22) e com peso médio de 4.800 kg. Quanto a necessidade de dispositivos clínicos, observaram-se: ventilação mecânica (77%), intubação (55%), nutrição parenteral e cateter umbilical (9,1%), concomitantemente. Foram a óbito 26% destes pacientes.

Em relação às crianças (01 a 12 anos), estas apresentaram uma idade média de 03 anos, com percentual de 67% para o sexo masculino, peso médio

15.500 kg e quanto a raça/cor 95,8% (23/24) eram pardas e 4,2% (1/24) eram da raça branca. Sobre o uso de dispositivos hospitalares, 88% dos pacientes necessitaram de intubação e ventilação mecânica, seguido da nutrição parenteral (8,3%). Nesse grupo de pacientes 17% foram a óbito.

Salienta-se que, até o encerramento da pesquisa, 08 pacientes neonatos e pediátricos ainda continuaram hospitalizados, logo, impossibilitou-se o desfecho sobre a evolução destes.

Tabela 1. Perfil epidemiológico e clínico de pacientes internados em UTIN e UTI-ped de 04 unidades hospitalares localizadas em Manaus – AM, durante os meses de julho a novembro de 2021

Variáveis	Fase		
	Neonatal, n = 61 <sup>1</sup>	Pós-neonatal, n = 22 <sup>1</sup>	Infantil, n = 24 <sup>1</sup>
<b>Idade (dias)</b>	11 (7-16)	60 (1-6)	1095 (730-2190)
<b>Sexo</b>			
F	28 (46%)	10 (45%)	8 (33%)
M	33 (54%)	12 (55%)	16 (67%)
<b>Peso (kg)</b>	2.0 (0.8)	4.8 (2.2)	15.5 (6.7)
<b>Evolução</b>			
Alta	50 (88%)	14 (74%)	19 (83%)
Óbito	7 (12%)	5 (26%)	4 (17%)
Indefinido	4	3	1
<b>Idade Gestacional (semanas)</b>	33.9 (4.3)	36.7 (4.5)	NA (NA)
<b>Parto</b>			
Cesárea	40 (66%)	6 (86%)	0 (NA%)
Normal	21 (34%)	1 (14%)	0 (NA%)
<b>Cateter Umbilical</b>			
Sim	25 (41%)	2 (9.1%)	0 (0%)
Não	36 (59%)	20 (91%)	24 (100%)
<b>Nutrição Parenteral</b>			
Sim	35 (57%)	2 (9.1%)	2 (8.3%)
Não	26 (43%)	20 (91%)	22 (92%)
<b>Ventilação Mecânica</b>			
Sim	49 (80%)	17 (77%)	21 (88%)
Não	12 (20%)	5 (23%)	3 (12%)
<b>Intubação</b>			
Sim	20 (33%)	12 (55%)	21 (88%)
Não	41 (67%)	10 (45%)	3 (12%)

<sup>1</sup> Median (25%-75%); n / N (%); Mean (SD)

Os motivos de internação mais observados na UTI neonatal foram a prematuridade com 70% dos casos, seguidos da sepse (46%), pneumonia (21%) e malformação congênita (13%). No que se refere a UTI pediátrica, os diagnósticos clínicos mais presentes nos prontuários para os lactentes foram a pneumonia (36%), sepse (32%), insuficiência respiratória (23%) e prematuridade (14%). E quanto as crianças, observou-se pneumonia (42%), leucemia (21%), neuropatia (21%) e sepse (12%). Na tabela 2, encontra-se todos os diagnósticos clínicos relatados durante o período do estudo.

Tabela 2. Diagnóstico clínico dos pacientes hospitalizados em UTIN e UTI-ped de 04 unidades hospitalares localizadas em Manaus – AM, durante os meses de julho a novembro de 2021.

(continua)

Motivo de internação	Fase		
	Neonatal, n = 61 <sup>1</sup>	Pós-Neonatal, n = 22 <sup>1</sup>	Infantil, n = 24 <sup>1</sup>
Prematuridade	43 (70%)	3 (14%)	0 (0%)
Sepse	28 (46%)	7 (32%)	3 (12%)
Pneumonia	13 (21%)	8 (36%)	10 (42%)
Insuficiência respiratória	0 (0%)	5 (23%)	1 (4.2%)
Leucemia	0 (0%)	1 (4.5%)	5 (21%)
Neuropatia	0 (0%)	0 (0%)	5 (21%)
Bronquite aguda	0 (0%)	2 (9.1%)	0 (0%)
Síndrome de Guillan Barre	0 (0%)	0 (0%)	2 (8.3%)
Hidrocefalia	1 (1.6%)	0 (0%)	1 (4.2%)
Convulsão	1 (1.6%)	1 (4.5%)	1 (4.2%)
Empiema pleural	0 (0%)	1 (4.5%)	0 (0%)
Insuficiência renal	1 (1.6%)	1 (4.5%)	1 (4.2%)
Dismotilidade gástrica	1 (1.6%)	0 (0%)	0 (0%)
Intolerância alimentar	1 (1.6%)	0 (0%)	0 (0%)
Síndrome de down	1 (1.6%)	2 (9.1%)	1 (4.2%)
Choque séptico	1 (1.6%)	1 (4.5%)	0 (0%)
Cianose	2 (3.3%)	1 (4.5%)	0 (0%)
Desconforto respiratório	1 (1.6%)	1 (4.5%)	0 (0%)
Hipoglicemia	3 (4.9%)	0 (0%)	0 (0%)
Hipotermia	2 (3.3%)	0 (0%)	0 (0%)
Sífilis congênita	4 (6.6%)	0 (0%)	0 (0%)
Asfixia ao nascer	2 (3.3%)	0 (0%)	0 (0%)
Anemia	3 (4.9%)	0 (0%)	1 (4.2%)
Microcefalia	1 (1.6%)	2 (9.1%)	1 (4.2%)
Epilepsia	0 (0%)	1 (4.5%)	0 (0%)
Endocardite	0 (0%)	1 (4.5%)	0 (0%)
Pericardite aguda	0 (0%)	0 (0%)	1 (4.2%)
Síndrome leucostática	0 (0%)	0 (0%)	1 (4.2%)
Depressão neonatal	3 (4.9%)	0 (0%)	0 (0%)

Tabela 3. Diagnóstico clínico dos pacientes hospitalizados em UTIN e UTI-ped de 04 unidades hospitalares localizadas em Manaus – AM, durante os meses de julho a novembro de 2021.

	(conclusão)		
<b>Hemorragia</b>	1 (1.6%)	1 (4.5%)	0 (0%)
<b>Icterícia</b>	7 (11%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Miocardiopatia</b>	0 (0%)	1 (4.5%)	0 (0%)
<b>Hidronefrose</b>	0 (0%)	1 (4.5%)	0 (0%)
<b>Hepatomegalia</b>	0 (0%)	1 (4.5%)	0 (0%)
<b>Síndrome de founier</b>	0 (0%)	0 (0%)	1 (4.2%)
<b>Apneia</b>	4 (6.6%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Mal formação congênita</b>	8 (13%)	3 (14%)	1 (4.2%)
<b>Cardiopatia congênita</b>	5 (8.2%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Derrame pleural</b>	0 (0%)	0 (0%)	1 (4.2%)
<b>Piodermite</b>	0 (0%)	0 (0%)	1 (4.2%)
<b>Artrite piogênica</b>	0 (0%)	0 (0%)	1 (4.2%)
<b>Intussuscepção</b>	0 (0%)	1 (4.5%)	0 (0%)
<b>Diarreia</b>	0 (0%)	2 (9.1%)	0 (0%)
<b>Desnutrição</b>	0 (0%)	1 (4.5%)	1 (4.2%)
<b>Hidrotórax</b>	1 (1.6%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Distúrbio de coagulação</b>	1 (1.6%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Politraumatismo</b>	0 (0%)	0 (0%)	1 (4.2%)
<b>Escabiose</b>	0 (0%)	1 (4.5%)	0 (0%)
<b>Celulite</b>	0 (0%)	0 (0%)	1 (4.2%)
<b>Fratura</b>	0 (0%)	0 (0%)	1 (4.2%)

<sup>1</sup> n / N (%)

Correspondente às doenças de base, as infecções pulmonares foram as comorbidades mais encontradas em recém-nascidos e lactentes com 30% e 36%, respectivamente. Em crianças, identificou-se a doença neurológica com o maior percentual (42%), seguido da doença pulmonar (38%), conforme a tabela 3.

Tabela 4. Doenças de base de pacientes hospitalizados em UTIN e UTI-ped de 04 unidades hospitalares localizadas em Manaus – AM, durante os meses de julho a novembro de 2021.

Comorbidades	Fase		
	Neonatal, n = 61 <sup>1</sup>	Pós-neonatal, n = 22 <sup>1</sup>	Infantil, n = 24 <sup>1</sup>
<b>Doença neurológica</b>			
Sim	5 (8%)	6 (27%)	10 (42%)
Não	56 (92%)	16 (73%)	14 (58%)
<b>Doença pulmonar</b>			
Sim	18 (30%)	8 (36%)	9 (38%)

Tabela 5. Doenças de base de pacientes hospitalizados em UTIN e UTI-ped de 04 unidades hospitalares localizadas em Manaus – AM, durante os meses de julho a novembro de 2021. (conclusão)

Não	43 (70%)	14 (64%)	15 (62%)
<b>Doença Cardíaca</b>			
Sim	6 (9.8%)	4 (18%)	2 (8.3%)
Não	55 (90%)	18 (82%)	22 (92%)
<b>Neoplasia</b>			
Sim	1 (1.6%)	1 (4.5%)	5 (21%)
Não	60 (98%)	21 (95%)	19 (79%)
<b>Doença gastrointestinal</b>			
Sim	3 (4.9%)	4 (18%)	0 (0%)
Não	58 (95%)	18 (82%)	24 (100%)
<b>Insuficiência renal</b>			
Sim	1 (1.6%)	1 (4.5%)	1 (4.2%)
Não	60 (98%)	21 (95%)	23 (96%)

<sup>1</sup> n / N (%)

Os antibióticos de maior uso na UTI neonatal foram: Ampicilina (64%), Gentamicina (56%) e Tazocin (25%). Já na UTI pediátrica, para os lactentes observou-se à Vancomicina (27%), Ceftriaxona (27%), Gentamicina (14%) e relacionado as crianças, à Vancomicina (42%), Ceftriaxona (33%), Ciprofloxacino, Tazocin e Meropenem (17%) foram majoritários no uso clínico (Tabela 4).

Tabela 6. Tratamento antimicrobiano de pacientes hospitalizados em UTIN e UTI-ped de 04 unidades hospitalares localizadas em Manaus – AM, durante os meses de julho a novembro de 2021. (continua)

Antibióticos	Fase		
	Neonatal, n= 61 <sup>1</sup>	Pós-neonatal, n= 22 <sup>1</sup>	Infantil, n= 24 <sup>1</sup>
Vancomicina	3 (4.9%)	6 (27%)	10 (42%)
Ciprofloxacino	0 (0%)	1 (4.5%)	4 (17%)
Ceftriaxona	0 (0%)	6 (27%)	8 (33%)
Tazocin	15 (25%)	1 (4.5%)	4 (17%)
Ampicilina	39 (64%)	2 (9.1%)	0 (0%)
Gentamicina	34 (56%)	3 (14%)	0 (0%)
Amicacina	9 (15%)	2 (9.1%)	3 (12%)
Eritromicina	1 (1.6%)	0 (0%)	0 (0%)
Meropenem	0 (0%)	2 (9.1%)	4 (17%)
Cefalexina	0 (0%)	1 (4.5%)	0 (0%)
Metronidazol	0 (0%)	2 (9.1%)	1 (4.2%)
Cefepima	0 (0%)	1 (4.5%)	0 (0%)
Penicilina cristalizada	3 (4.9%)	0 (0%)	0 (0%)

Tabela 7. Tratamento antimicrobiano de pacientes hospitalizados em UTIN e UTI-ped de 04 unidades hospitalares localizadas em Manaus – AM, durante os meses de julho a novembro de 2021. (conclusão)

<b>Oxacilina</b>	0 (0%)	1 (4.5%)	0 (0%)
<b>Clarithromicina</b>	0 (0%)	1 (4.5%)	0 (0%)

<sup>1</sup>n /N (%)

## 6.2 CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA ORAL DE PACIENTES INTERNADOS EM UTIN E UTI-PED

A coleta na cavidade oral ocorreu em 96 pacientes (os demais participantes não puderam ser coletados pois receberam alta ou foram a óbito, e recém-nascidos com prematuridade extrema foram excluídos desta etapa do estudo). Destes 96, 74 apresentaram colonização microbiana (Figura 05), nos quais em 33 pacientes (44,6%), o isolamento de *Candida* foi identificado.

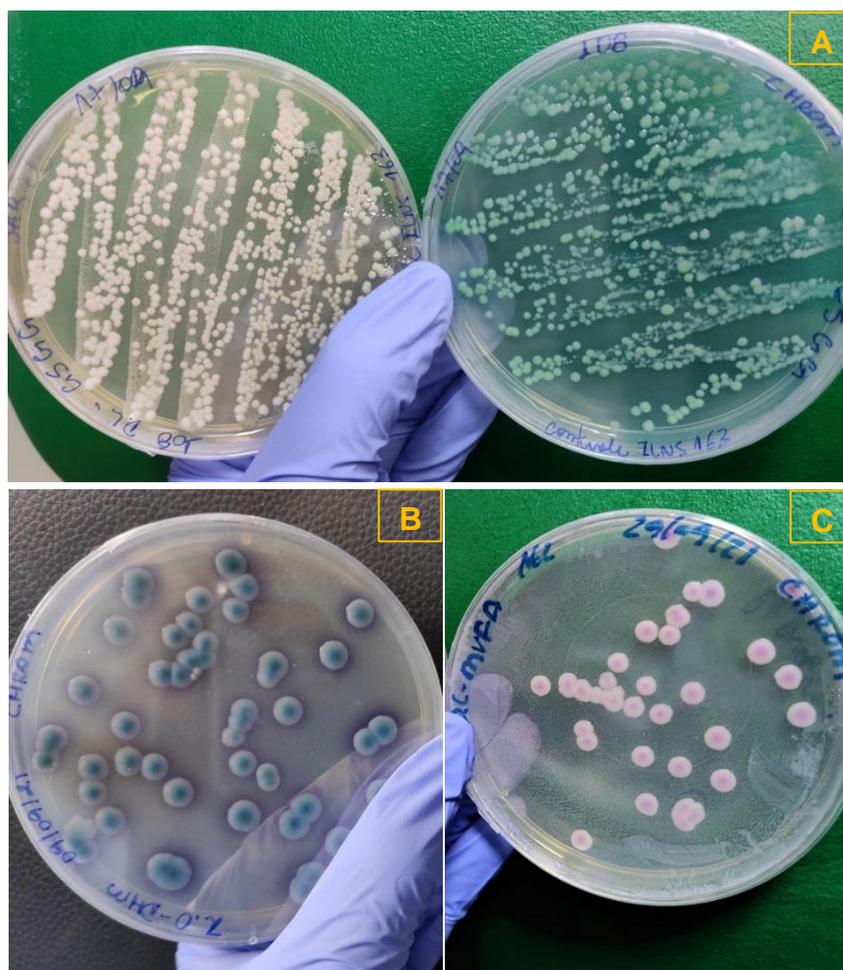


Figura 5. Leveduras isoladas da cavidade oral de pacientes internados em UTIN e UTI-ped de unidades hospitalares estudadas em Manaus – AM, entre os meses de julho e novembro de 2021. (A) Meio CHROMagar: colônias esverdeadas, opacas, com bordas delimitadas e em meio Sabouraud: colônias brancas, opacas e com bordas delimitadas; (B) Meio CHROMagar: crescimento de colônias azuis, de aspecto metalizado, halo azulado; (C) Meio CHROMagar: colônias brancas com centro rosado, com bordas delimitadas e aspecto opaco.

Ao todo, foram obtidos 37 isolados de leveduras do gênero *Candida* (Tabela 5). A identificação foi realizada por meio da macromorfologia e pigmentação em meio CHROmagar para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Para identificar a nível de espécie, optou-se pelo sequenciamento da região ITS, onde ocorreu primeiramente a extração de DNA, posteriormente, a amplificação pelos primers ITS1 e ITS4, cuja visualização foi realizada pela eletroforese em gel de agarose, a qual revelou bandas em uma altura de 400 a 600pb (Figura 06) e por fim, o sequenciamento no sequenciador ABI 3130 Genetic Analyzer.

As sequências obtidas foram analisadas no site da CBS ([cbs.knaw.nl/collections/BioloMICSSequences.aspx](https://cbs.knaw.nl/collections/BioloMICSSequences.aspx)) e em questão de similaridade, foram considerados confiáveis valores acima de 95%.

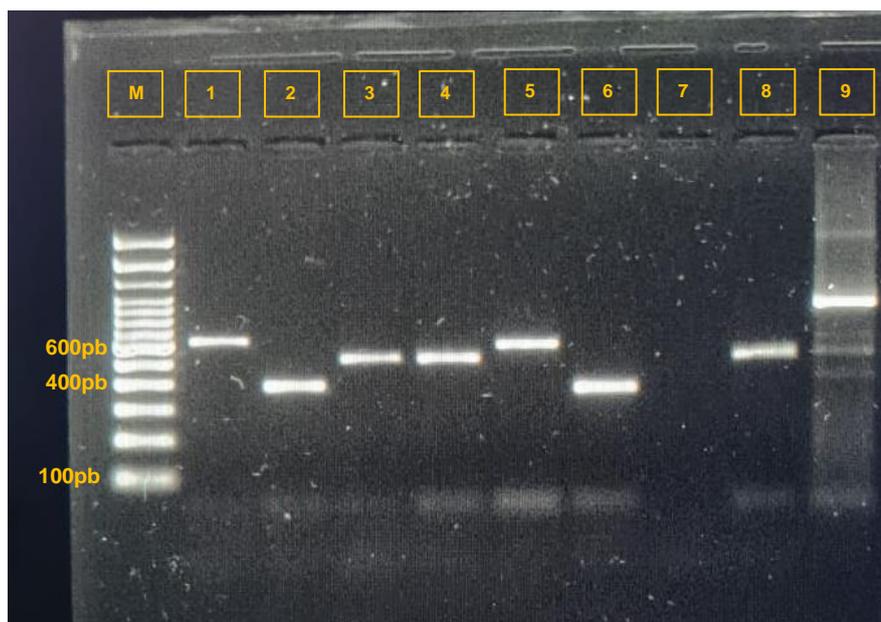


Figura 6. Gel de agarose dos isolados clínicos provenientes da cavidade oral de pacientes internados em UTIN e UTI-ped de 04 unidades hospitalares localizadas em Manaus – AM, nos meses de julho e novembro de 2021. Em sequência: Marcador Ladder 100bp (M), *Cyberlindnera fabianni* (1), *Candida duobushaemulonii* (2), *Candida parapsilosis* (3), *Candida parapsilosis* (4), *Candida thasaenensis* (5), *Candida haemulonii* (6), *ZO-FPS2* (não amplificado), *Candida parapsilosis* (8) e controle positivo (9).

Tabela 8. Hospitais infantis e maternidades estudadas em Manaus – AM entre julho e novembro de 2021, pacientes internados em UTI neo e UTI-ped e suas respectivas faixas etárias, além de espécies isoladas da cavidade oral

<b>Unidades</b>	<b>Pacientes</b>	<b>Fase</b>	<b>Espécies</b>
<b>A</b>	1	Infantil	<i>Candida glabrata</i>
<b>A</b>	2	Infantil	<i>Candida duobushaemulonii</i>
<b>A</b>	3	Infantil	<i>Candida albicans</i>
<b>A</b>	4	Infantil	<i>Candida tropicalis</i>
<b>A</b>	5	Pós-neonatal	<i>Candida orthopsilosis</i>
<b>A</b>	6	Infantil	<i>Pichia kudriavzevii</i>
<b>A</b>	7	Pós-neonatal	<i>Candida albicans</i>
<b>A</b>	8	Infantil	<i>Candida albicans</i>
<b>A</b>	9	Infantil	<i>Candida albicans</i>
<b>A</b>	10	Infantil	<i>Candida tropicalis</i>
<b>B</b>	11	Neonatal	<i>Candida tropicalis</i>
<b>B</b>	12	Neonatal	<i>Candida parapsilosis</i>
<b>B</b>	13	Neonatal	<i>Candida parapsilosis</i>
<b>B</b>	14	Neonatal	<i>Candida thasaenensis</i>
<b>B</b>	15	Neonatal	<i>Candida haemulonis</i>
<b>B</b>	16	Neonatal	<i>Cyberlindnera fabianni</i>
<b>B</b>	17	Neonatal	<i>Candida albicans</i>
<b>B</b>	18	Neonatal	<i>Candida albicans</i>
<b>B</b>	19	Neonatal	<i>Candida albicans</i>
<b>B</b>	20	Neonatal	<i>Candida albicans</i>
<b>B</b>	21	Neonatal	<i>Candida albicans</i>
<b>B</b>	22	Neonatal	<i>Candida albicans</i>
<b>B</b>	23	Neonatal	<i>Candida albicans</i>
<b>B</b>	24	Neonatal	<i>Candida haemulonis</i>
<b>B</b>	25	Neonatal	<i>Candida parapsilosis</i>
<b>C</b>	26	Infantil	<i>Candida parapsilosis</i>
<b>C</b>	27	Pós-neonatal	<i>Cyberlindnera fabianii</i>
<b>C</b>	28	Infantil	<i>Candida albicans</i>
<b>C</b>	29	Pós-neonatal	<i>Candida tropicalis</i>
<b>C</b>	30	Pós-neonatal	<i>Candida tropicalis</i>
<b>C</b>	31	Infantil	<i>Candida tropicalis</i>
<b>D</b>	32	Infantil	<i>Candida albicans</i>
<b>D</b>	33	Infantil	<i>Candida albicans</i>

De um modo geral, a espécie *C. albicans* foi a levedura mais isolada na cavidade oral com 43,25% (16/37). Identificou-se também, *C. tropicalis* com 18,91% (7/37), *C. parapsilosis* 13,51% (5/37), além de *Cyberlindnera fabianni* (*Candida fabianni*, CBS:5482) e *C. haemulonis* (CBS:5149) com 5,40 % (2/37) respectivamente.

Na UTIN, houve predomínio de *C. albicans* (50%, 8/16), *C. parapsilosis* (25%, 4/16) e *C. haemulonis* (12,5%, 2/16), além da espécie *C. thasaenensis* (CBS:12529). Para UTI-ped, houve isolamento de *C. albicans* (38%, 8/21), *C. tropicalis* (33%, 7/21), bem como espécies incomuns como: *C. duobushaemulonii* (CBS:6915) e *Pichia kudriavzevii* (CBS:2048) que é o teleomorfo de *C. Krusei*.

Observou-se também a colonização de espécies diferentes no mesmo paciente, sendo o caso de uma criança internada em UTI-ped, por motivo de atropelamento, a mesma teve fratura na base do crânio e nos ossos maxilares. Diante deste cenário, houve dificuldade para realização da higienização oral e após a coleta por meio de swab, constatou-se a presença de 03 leveduras diferentes: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. orthopsilosis* (Figura 7). Deste modo, a equipe de enfermagem foi informada acerca da situação e reforçaram as medidas profiláticas para evitar quaisquer infecções.

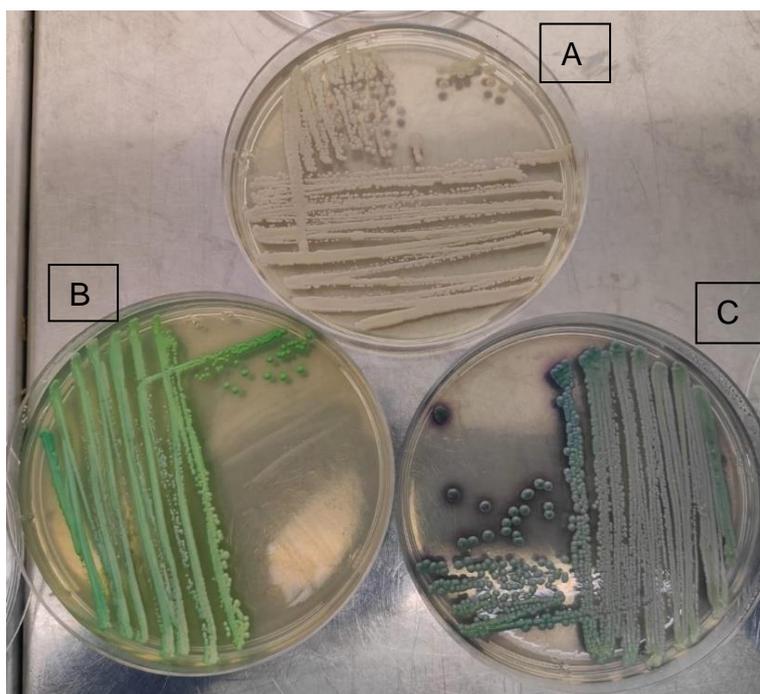


Figura 7. Isolados de espécies da cavidade oral de 01 paciente internado em UTI-ped em Manaus – AM, em novembro de 2021. Sendo: *C. orthopsilosis* (A), *C. albicans* (B) e *C. tropicalis* (C) em meio CHROMagar.

Quanto as condições clínicas da cavidade oral, houve casos de: macroglossia, xerostomia, fenda lábio-palatina, ulcerações em língua, bochecha, mucosas ressecadas e sanguinolentas, bem como, candidíase pseudomembranosa, ocasionada pela espécie *C. albicans*, cujo tratamento foi nistatina solução oral (04 vezes ao dia). Verificou-se também, a presença do cirurgião-dentista somente na unidade C (hospital infantil público), cujas visitas ocorriam semanalmente nas enfermarias e UTIs pediátricas, visto que o profissional além dos atendimentos odontológicos, realizava capacitação para as equipes (enfermeiros e técnicos de enfermagem), instruía sobre higienização e escolhas de substâncias químicas para os procedimentos.

A seguir, a tabela 6, demonstra os procedimentos realizados na cavidade oral dos pacientes hospitalizados em UTIs das unidades hospitalares envolvidas na pesquisa:

Tabela 9. Unidades hospitalares estudadas em Manaus – AM, entre os meses de julho e novembro de 2021 e suas respectivas condutas em relação aos cuidados bucais

Unidade	Procedimentos
A	Utilizam gluconato de clorexidina a 0,12% e bicarbonato diluído para higienização dos pacientes lactentes. A escovação é direcionada para crianças maiores.
B	Fazem uso de gaze umedecida com água destilada para higienização da cavidade oral dos recém-nascidos.
C	Todos os pacientes internados são higienizados por meio da escovação, ou fazem uso de bicarbonato diluído ou gluconato de clorexidina a 0,12%. Em casos de candidíase oral preconizam o fluconazol.
D	Os enfermeiros utilizam gluconato de clorexidina a 0,12% com gaze em lactentes e em pacientes pediátricos realizam a escovação com dentífrício fluoretado.

### 6.3 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E CLÍNICO DOS PACIENTES INTERNADOS EM UTIN E UTI-PED COM FUNGEMIA.

Dos 107 pacientes internados em UTIN e UTI-ped, 05 apresentaram hemocultura positiva para o gênero *Candida*, sendo 04 recém-nascidos prematuros (80%) de uma maternidade pública e 01 criança (20%) advinda de um hospital público infantil.

No período da infecção fúngica invasiva, os neonatos apresentaram uma média de 28 dias de vida, com idade gestacional média de 31,5 semanas (pré-termo precoce), sendo 75% (3/4) da raça parda e 25% (1/4) da raça branca, com peso médio de 1339 g, dado que, 100% dos pacientes nasceram de parto normal. De igual modo, uma criança de 05 anos, parda, neuropata (quadro de microcefalia), com 20,000 kg recebeu o diagnóstico de fungemia. No geral, o gênero predominante foi do sexo feminino (80%) e acerca da procedência, 04 pacientes eram de Manaus e 01 recém-nascido foi transferido do município de Eirunepé (Tabela 7).

A respeito do perfil clínico destas crianças, os motivos de internação mais relatados (Tabela 8) foram a sepse (100%), seguido da prematuridade (80%) e pneumonia (40%), na qual as comorbidades predominantes foram a doença cardíaca e doença pulmonar em 40% dos casos. Outrossim, o tempo de internação média nas unidades intensivas foram de 70 dias, e entre o período de admissão hospitalar e o diagnóstico positivo para candidemia observou-se uma média de 18 dias.

Ademais, os fatores de risco para candidemia mais observados foram: ventilação mecânica (80%), intubação e cateter umbilical (60%), nutrição parenteral (40%) e procedimento cirúrgico (laparotomia exploratória associada à flebotomia) 30 dias antes do diagnóstico de fungemia (20%). E no que concerne à evolução, 01 paciente foi a óbito em decorrência da fungemia, além dos diagnósticos de sífilis congênita, ventriculomegalia e hidrotórax.

Tabela 10. Perfil epidemiológico e clínico de pacientes com fungemia internados em 02 unidades hospitalares localizadas em Manaus – AM, entre os meses de julho e novembro de 2021.

<b>Variáveis</b>	<b>Fungemia sim, n = 5<sup>1</sup></b>
<b>Fase</b>	
Infantil	1 (20%)
Neonatal	4 (80%)
Pós-neonatal	0 (0%)
<b>Sexo</b>	
F	4 (80%)
M	1 (20%)
<b>Peso (kg)</b>	5.1 (8.3)
<b>Evolução</b>	
Alta	4 (80%)
Óbito	1 (20%)
<b>Idade gestacional (semanas)</b>	31.5 (3.1)
<b>Parto</b>	
Cesárea	0 (0%)
Normal	4 (100%)
<b>Cirurgia 30 dias antes</b>	1 (20%)
<b>Cateter umbilical</b>	3 (60%)
<b>Nutrição Parenteral</b>	2 (40%)
<b>Ventilação Mecânica</b>	4 (80%)
<b>Intubação</b>	3 (60%)

<sup>1</sup>n / N (%); Median (25%-75%); Mean (SD)

Tabela 11. Motivo de internação dos pacientes com fungemia internados em 02 unidades hospitalares localizadas em Manaus – AM, entre os meses de julho e novembro de 2021.

<b>Diagnóstico clínico</b>	<b>Fungemia sim, n = 5<sup>1</sup></b>
<b>Sepse</b>	5 (100%)
<b>Prematuridade</b>	4 (80%)
<b>Pneumonia</b>	2 (40%)
<b>Hipotermia</b>	1 (20%)
<b>Sífilis congênita</b>	1 (20%)
<b>Microcefalia</b>	1 (20%)
<b>Icterícia</b>	1 (20%)
<b>Cardiopatía congênita</b>	1 (20%)
<b>Hidrotórax</b>	1 (20%)

<sup>1</sup>n / N (%)

Para o tratamento inicial destes pacientes, em 40% dos casos, os antibióticos de maior escolha foram: Vancomicina, Tazocin e Gentamicina, visto que, no decorrer da internação, dois ou mais medicamentos foram utilizados (Tabela 9).

Tabela 12. Uso de antibióticos em pacientes com fungemia em 02 unidades hospitalares localizadas em Manaus – AM, entre os meses de julho e novembro de 2021

Antibióticos	Fungemia
	Sim, n = 5 <sup>1</sup>
Vancomicina	2 (40%)
Ciprofloxacino	1 (20%)
Tazocin	2 (40%)
Ampicilina	1 (20%)
Gentamicina	2 (40%)
Amicacina	1 (20%)
Penicilina cristalizada	1 (20%)

<sup>1</sup>n / N (%)

#### 6.4 ISOLADOS DE HEMOCULTURAS E CAVIDADE ORAL DOS PACIENTES COM FUNGEMIA, TRATAMENTO, PACIENTES CONTROLES

Acerca dos cuidados direcionados à fungemia, a tabela 10, demonstra um panorama que envolve as unidades hospitalares, pacientes e suas respectivas faixas etárias, espécies isoladas de hemoculturas, antifúngicos selecionados para tratamento e sua duração, bem como o desfecho.

Tabela 13. Pacientes internados em UTIN e UTI-ped com fungemia entre os meses de julho e novembro de 2021 de 02 unidades hospitalares localizadas em Manaus-AM, suas respectivas faixas etárias, espécies isoladas de hemoculturas, antifúngicos de escolha, duração do tratamento e desfecho

Unidade	Paciente	Fase	Espécie	Antifúngico	Duração do tratamento	Desfecho
A	01	Infantil	<i>C. tropicalis</i>	Micafungina	14 dias	Alta
B	02	Neonato	<i>C. albicans</i>	Fluconazol	41 dias	Alta
B	03	Neonato	<i>Cyberlindnera fabianii</i>	Anfotericina b	32 dias	Alta
B	04	Neonato	<i>C. albicans</i>	Anfotericina b	26 dias	Óbito
B	05	Neonato	<i>C. albicans</i>	Anfotericina b	22 dias	Alta

Entre as unidades hospitalares envolvidas neste estudo, a unidade B (maternidade pública) destacou-se por apresentar maior número de episódios de candidemia, equivalente a 80% (4/5), seguido da unidade A (hospital infantil público) com 20% (1/5). Tal afirmação, justifica-se pelo elevado número de pacientes internados nesta maternidade, além de ser considerada referência na assistência e cuidado a pacientes críticos neonatais no Amazonas.

Ao todo, 13 isolados de hemoculturas positivas foram fornecidas pelo laboratório terceirizado, sendo distribuídas: paciente 01 (02 amostras), paciente 02 (05 amostras), paciente 03 (01 amostra), paciente 04 (03 amostras) e paciente 05 (02 amostras). A espécie *Candida albicans* foi a mais prevalente em (76,92%, 10/13) dos casos, além da *Candida tropicalis* (15,38%, 2/13) e *Cyberlindnera fabianii* (7,7%,1/13), dado que, este último microrganismo, foi identificado por meio do sistema Vitek® (bioMérieux, Paris, França) como *Candida utilis*.

No que tange à terapia antifúngica, os tratamentos escolhidos foram: Micafungina, Fluconazol e Anfotericina B nas apresentações desoxicolato e lipossomal. Dentre estes medicamentos, a Anfotericina B foi o antifúngico usado em 60% (3/5) dos casos que envolveram recém-nascidos prematuros e além disso, o fluconazol foi utilizado como meio profilático em 02 pacientes. Referente a duração do tratamento a média foi de aproximadamente 27 dias.

Importante citar que cada unidade hospitalar apresentou condutas a serem seguidas quanto ao tratamento, no que diz respeito a escolha dos antifúngicos, como demonstrado na Tabela 11:

Tabela 11. Conduas quanto ao tratamento de fungemia de 04 unidades hospitalares estudadas em Manaus – AM, entre os meses de julho e novembro de 2021

Unidade	Procedimentos
A	Utilizam o fluconazol como meio profilático, uma vez na semana. E para tratamento a micafungina é o antifúngico de escolha.
B	Em recém-nascidos abaixo de 01kg, é realizado o tratamento profilático com fluconazol. Quanto ao tratamento, pode durar até 06 semanas ou quando houver a remoção dos dispositivos (cateter, sonda, tubos, etc.)
C	Não há protocolo de tratamento para fungemia, irá depender da sensibilidade ao antifúngico demonstrado no exame laboratorial. Os antifúngicos usados em ordem de escolha, preferencialmente, são: fluconazol, anfotericina b e micafungina.
D	Utilizam antifúngicos dependendo da sensibilidade demonstrada no exame laboratorial. Para profilaxia, o antifúngico de escolha é o Fluconazol e para tratamento opta-se pela Anfotericina b.

Após os diagnósticos de candidemia, foi proposta uma segunda coleta na cavidade oral desses pacientes, como também, uma coleta em 02 pacientes controles (sem a instalação da fungemia) a fim de verificar se houve uma mudança na microbiota oral a partir da infecção invasiva. Para escolha dos controles, a data de admissão na UTI e fatores de risco foram similares aos casos.

A paciente 01 foi exceção quanto ao procedimento metodológico desta pesquisa. Neste caso, houve primeiro a aquisição da amostra de hemocultura positiva para *C. tropicalis* e, no dia seguinte foi realizada a primeira coleta na cavidade oral, desta forma, não houve coleta em pacientes controles. Posteriormente, a paciente retornou à UTI, e em seguida a equipe médica solicitou uma segunda coleta na cavidade oral, devido à urocultura ser positiva para o gênero *Candida*, e identificou-se colonização por *C. tropicalis*. O uso de sonda vesical foi cancelado, pois houve desconfiança por parte dos médicos de ser a fonte de infecção. Por fim, realizou-se 15 dias de fluconazol.

Na primeira coleta, não foram isoladas leveduras em boca nos pacientes 02 e 03, todavia, após a candidemia, o paciente 03 apresentou em região oral a mesma espécie fúngica isolada do sangue e o paciente 02 continuou sem

crescimento microbiano. Os pacientes 04 e 05 apresentaram colonização prévia na região oral e depois a infecção fúngica na corrente sanguínea, conforme a Tabela 12.

Tabela 12. Isolados da cavidade oral e corrente sanguínea dos pacientes casos e controles (sem fungemia) internados em UTIN e UTI-ped de 02 unidades hospitalares localizadas em Manaus – AM, entre os meses de julho e novembro de 2021

Pacientes	1º coleta	Fungemia	2º coleta	Controle 01	Controle 02
01	-	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	-	-
02	Sem crescimento	<i>C. albicans</i>	Sem crescimento	Sem crescimento	<i>Clarispora lusitaniae</i>
03	Sem crescimento	<i>Cyberlindnera fabianii</i>	<i>Cyberlindnera fabianii</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
04	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Sem crescimento	Sem crescimento
05	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Sem crescimento

Acerca dos 08 pacientes controles, não houve colonização microbiana em 50% (4/8) dos participantes, uma vez que *C. albicans* foi isolada em 37,5% (3/8), seguida de *Clarispora lusitaniae* (*Candida lusitaniae*, CBS: 5901) com 12,5% (1/8). A idade gestacional média desses neonatos foi de 33 semanas (pré-termo moderado) e além disso, a prematuridade e sepse precoce foram motivos de internação comuns aos casos e controles.

## 6.5 UNIDADES HOSPITALARES: CRESCIMENTO MICROBIANO EM CAVIDADE ORAL DE PACIENTES INTERNADOS EM UTI E FUNGEMIA

A tabela 13 demonstra um panorama sobre as coletas realizadas na cavidade oral e seus respectivos achados, além de relacionar os pacientes diagnosticados com fungemia.

Acerca do hospital infantil A, observou-se o maior percentual de colonização fúngica em cavidade oral, sendo a segunda unidade com os maiores casos de fungemia. Sobre a maternidade pública B, identificou-se uma menor

colonização por fungos em boca, em comparação as demais unidades, todavia, apresentou o maior número de hemoculturas positivas para o gênero *Candida*. Vale ressaltar que o hospital B atende pacientes de prematuridade extrema e com tempo de internação maior.

O hospital infantil C foi a unidade com menor crescimento microbiano e a segunda unidade com maior colonização fúngica, porém não houve casos de fungemia. E quanto à maternidade/hospital infantil D, todos os pacientes coletados, em região orofaríngea, apresentaram colonização por algum microrganismo, sendo dois isolados fúngicos e sem casos de fungemia no período estudado.

Tabela 13. Unidades hospitalares e crescimento microbiano em cavidade oral de pacientes internados em UTIN e UTI-ped de 04 unidades hospitalares localizadas em Manaus – AM, entre os meses de julho e novembro de 2021

Unidades	Total de pacientes testados	Pacientes positivos para microrganismos na cavidade oral	Pacientes positivos para fungos na cavidade oral	Pacientes com fungemia
A	17	14 (82,3%)	10 (58,8%)	1 (5,8%)
B	56	43 (76,7%)	15 (26,78%)	4 (7,1%)
C	18	13 (72,2%)	6 (46,1%)	0 (0%)
D	5	5 (100%)	2 (40%)	0 (0%)
<b>Total</b>	96	75	33	5

<sup>1</sup>n / N (%)

Identificou-se colonização substancial nos participantes internados nas unidades D e A. Estes pacientes eram crianças mais velhas (01 a 12 anos), possivelmente apresentavam condições pré-existent em boca, associados aos quadros clínicos de infecção respiratória e neuropatia crônica, em sua maioria, o que dificultava o manuseio da escovação e de substâncias químicas. Ademais,

houve relatos da CCIH do hospital infantil A sobre a necessidade da inserção do profissional da área odontológica para dar suporte aos cuidados e no tratamento em ambiente intensivo, enquanto na unidade D não houve diálogo aprofundado a respeito da temática.

A higienização preconizada pela maternidade pública B, era por meio de gaze estéril umedecida com água destilada nas regiões de mucosas orais dos recém-nascidos à termo e pré-termo, conforme já descrito na tabela 6. A partir dos dados acima, conclui-se que este procedimento mecânico é eficiente para diminuir a carga fúngica e desse modo, inviabilizar infecções fúngicas como a candidíase oral.

Interessante citar também que a unidade C com presença do cirurgião-dentista apresentou o menor percentual de crescimento microbiano. Este profissional proporcionava educação permanente às equipes de enfermagem sobre higienização bucal, o que possibilitava técnicas seguras e manejo adequado dos pacientes, bem como, realizava avaliação clínica para averiguar doenças dentais e periodontais.

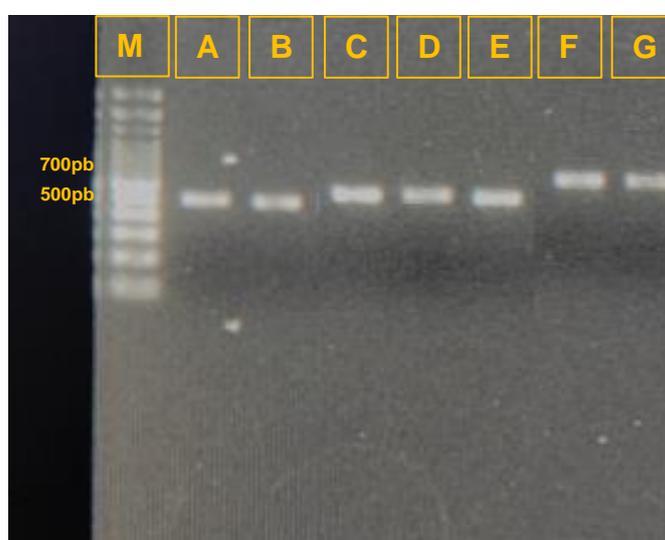
Embora sejam realizados procedimentos diários de higienização e profilaxia na cavidade oral destes pacientes, observou-se um número significativo de colonização microbiana. Tal fato, pode ser justificado devido às condições clínicas destas crianças que necessitam de dispositivos hospitalares (tubos endotraqueais, sondas) cuja utilização minimiza a produção de secreção salivar, que possui ação antimicrobiana, o qual favorece o acúmulo de bactérias e fungos em mucosa. Além disso, a prolongada terapia antibiótica, o ambiente hospitalar, e a imunossupressão também são fatores que auxiliam na colonização constante.

## 6.6 TÉCNICA MLST: GENÓTIPOS DAS ESPÉCIES DE *CANDIDA* ISOLADAS DA CAVIDADE ORAL E CORRENTE SANGUÍNEA DE PACIENTES COM CANDIDEMIA

Neste trabalho, os genótipos de *C. albicans* e *C. tropicalis* foram identificados pela técnica molecular MLST. Estas leveduras foram isoladas de

hemoculturas e da cavidade oral de pacientes com candidemia e além disso, verificou-se também os DSTs de *C. albicans* encontrados na região bucal dos pacientes controles (sem fungemia).

Para a espécie *C. albicans* foram analisados 14 isolados provenientes dos pacientes com fungemia, bem como, 03 isolados dos pacientes controles. Em relação a espécie *C. tropicalis*, foram estudados 04 isolados de um único paciente. Quanto à realização do MLST, foi realizada a eletroforese em gel, cujas bandas apresentaram altura entre de 500 pb a 900 pb (Figuras 8 e 9),



900 pb  
500 pb

Figura 8. Gel de agarose de um isolado de *C. tropicalis* amplificado para os seis genes estudados pela técnica MLST provenientes de um paciente internado em UTIN e UTI-ped de uma unidade hospitalar localizada em Manaus – AM, nos meses de julho e novembro de 2021. Marcador Ladder (M); gene SAPT4 (A); gene XYR1 (B); gene SAPT2 (C); gene ZWF1a (D); gene ICL1 (E) e gene MDR1 (F).

Após as reações de PCR, observou-se que os genes ICL1 e SAPT2 de *C. tropicalis* apresentaram bandas inespecíficas, visto que a temperatura de anelamento usada foi de 52º graus. Logo, foram realizados testes com outras temperaturas e constatou-se que a temperatura de 56º graus foi adequada para amplificação.

E para obtenção das sequências, utilizou-se o programa Sequencher 5.4.6, com objetivo de analisar os cromatogramas e principalmente, os pontos de heterozigose (dois picos sobrepostos e geralmente do mesmo tamanho de bases) os quais diferenciam os genótipos entre si. E o programa MEGA 11 para realizar o alinhamento, conforme a sequência referência.

Como citado anteriormente, são necessários 07 “housekeeping genes” para genotipagem de *C. albicans*. Dessa forma, foram encontrados 20 alelos diferentes, cuja variação deu-se entre 04 a 05 alelos. Os genes VPS13 e ZWF1b apresentaram a maior variação genética com 5 alelos distintos, enquanto os genes AAT1a, AAC1a, ADP1, MPIb, SYA1 expuseram somente 04 alelos. Acerca dos alelos mais encontrados para cada gene, observou-se: AAT1a (alelo 2), AAC1 (alelo 3), ADP1 (alelo 5), MPIb (alelo 9), SYA1(alelo 2), VPS13 (alelo 6) e ZWF1b (alelo 5), conforme a tabela 13.

Tabela 14. Genes sequenciados, alelos encontrados, alelo mais comum, quantidade de alelos diferentes e os respectivos tamanhos e amplicons dos isolados de *C. albicans* proveniente de pacientes internados em UTIN com diagnóstico de fungemia, entre julho e novembro de 2021.

Gene	Alelo	Alelo mais comum	Varição dos alelos	Fragmentos sequenciados (pb)	Tamanho do amplicon (pb)
<b>AAT1a</b>	2, 13, 25, 58	2	4	373	478
<b>AAC1</b>	3, 7, 10, 27	3	4	407	519
<b>ADP1</b>	5, 6, 15, 99	5	4	443	537
<b>MPIb</b>	3, 4, 6, 9	9	4	375	486
<b>SYA1</b>	2, 6, 56, 93	2	4	391	543
<b>VPS13</b>	6, 27, 32, 56, 72	6	5	403	741
<b>ZWF1b</b>	4, 5, 12, 15, 37	5	5	491	702

A partir disso, as combinações desses alelos representaram 5 DSTs diferentes, dado que, 04 já foram relatados e 01 configura provavelmente como novo genótipo. O DST mais frequente foi o 435, sendo identificado em 10 isolados (8 hemoculturas e 2 isolados da cavidade oral) de 02 pacientes com a infecção fúngica invasiva. A respeito dos pacientes controles, as espécies coletadas da cavidade oral apresentaram genótipos diferentes.

Concernente a espécie *C. tropicalis*, 06 “housekeeping genes” são indispensáveis para identificação do genótipo. Nestes isolados identificou-se somente 01 alelo para cada gene, logo, não houve variação genética (Tabela 14). Os alelos encontrados para os respectivos genes, foram: ICL1 (alelo 1), MDR1 (alelo 7), SAPT 2 (alelo 3), SAPT 4 (alelo 17), XRY1 (alelo 57) e ZWF1a (alelo 13). Diante do perfil alélico, encontrou-se o genótipo 147 para 04 amostras (02 hemoculturas e 02 isolados da cavidade oral) de 01 paciente com diagnóstico de fungemia.

Tabela 15. Genes sequenciados, alelos encontrados, alelo mais comum, quantidade de alelos diferentes e tamanho dos amplicons dos isolados de *C. tropicalis* proveniente de um paciente internado em UTI-ped com diagnóstico de fungemia, em agosto de 2021

Gene	Alelo	Alelo mais comum	Varição dos alelos	Tamanho do amplicon (pb)
ICL1	1	1	1	447
MDR1	7	7	1	425
SAPT2	3	3	1	525
SAPT4	17	17	1	390
XYR1	57	57	1	370
ZWF1a	13	13	1	520

Diante disso, os genótipos de *C. albicans* isolados em corrente sanguínea foram o DST435 e um “novo DST” e em cavidade oral: DST435, “novo DST”, DST591, DST2907, DST90. Para *C. tropicalis* em ambos os sítios se identificou o DST147.

#### 6.7 TÉCNICA MLST: POSSÍVEL RELAÇÃO ENTRE GENÓTIPOS DAS ESPÉCIES *C. ALBICANS* E *C. TROPICALIS* DA CAVIDADE ORAL E CORRENTE SANGUÍNEA

Com o intuito de verificar se espécies de *Candida* encontradas na cavidade oral poderiam estar relacionadas ao acometimento de fungemia em pacientes infantis, o estudo correlacionou os genótipos e realizou uma comparação entre a colonização prévia em boca e posterior diagnóstico de fungemia.

Relacionado ao paciente 01, houve isolados de *C. tropicalis* em duas hemoculturas, visto que a 1º coleta na cavidade oral ocorreu após o diagnóstico de candidemia e a 2º coleta foi realizado depois do exame de urocultura ser positiva para esta espécie. Identificou-se a cepa DST147 em todas as amostras.

Tabela 16. Paciente 01, infantil, internada em UTI-ped no hospital infantil localizado em Manaus-AM no ano de 2021, suas respectivas coletas em cavidade oral e sangue, espécies isoladas, alelos correspondentes a cada gene e genótipos de *C. tropicalis*

Fonte	Espécie	ICL	MDR1	SAPT2	SAPT4	XYR1	ZWF1a	DST
1º hemocultura	<i>C. tropicalis</i>	1	7	3	17	57	13	147
1º coleta – cavidade oral	<i>C. tropicalis</i>	1	7	3	17	57	13	147
2º hemocultura	<i>C. tropicalis</i>	1	7	3	17	57	13	147
2º coleta - cavidade oral	<i>C. tropicalis</i>	1	7	3	17	57	13	147

O paciente 02 apresentou cinco hemoculturas positivas para espécie *C. albicans* e verificou-se o DST435 em todo os isolados, e pertinente a cavidade oral não houve crescimento microbiano (Tabela 16).

Tabela 17. Paciente 02, neonato, internado em UTIN no hospital infantil localizado em Manaus-AM no ano de 2021, faixa etária, respectivas coletas em cavidade oral e sangue, espécies isoladas, alelos correspondentes a cada gene e genótipos de *C. albicans*

Fonte	Espécie	AAT1a	AAC1a	ADP1	MPIb	SYA1	VPS13	ZWF1b	DST
1º coleta – cavidade oral									Sem crescimento
1º hemocultura	<i>C. albicans</i>	2	5	5	3	9	2	6	435
2º hemocultura	<i>C. albicans</i>	2	5	5	3	9	2	6	435
3º hemocultura	<i>C. albicans</i>	2	5	5	3	9	2	6	435
4º hemocultura	<i>C. albicans</i>	2	5	5	3	9	2	6	435
5º hemocultura	<i>C. albicans</i>	2	5	5	3	9	2	6	435
2º coleta – cavidade oral									Sem crescimento

A respeito do paciente 04, constatou-se colonização na cavidade oral por *C. albicans* na 1º coleta, e posteriormente a instalação do quadro de infecção fúngica invasiva pela mesma espécie. Após análise por meio do MLST, identificou-se que ambos os isolados pertenciam a mesma cepa, o DST435. Este recém-nascido foi a óbito (Tabela 17).

Tabela 18. Paciente 04, neonato, internado em UTIN no hospital infantil localizado em Manaus-AM no ano de 2021 respectivas coletas em cavidade oral e sangue, espécies isoladas, alelos correspondentes a cada gene e genótipos de *C. albicans*

Fonte	Espécie	AAT1a	AAC1a	ADP1	MPIb	SYA1	VPS13	ZWF1b	DST
1º coleta – cavidade oral	<i>C. albicans</i>	2	5	5	3	9	2	6	435
1º hemocultura	<i>C. albicans</i>	2	5	5	3	9	2	6	435
2º hemocultura	<i>C. albicans</i>	2	5	5	3	9	2	6	435
3º hemocultura	<i>C. albicans</i>	2	5	5	3	9	2	6	435
2º coleta – cavidade oral	<i>C. albicans</i>	2	5	5	3	9	2	6	435

Similar ao caso anterior, o paciente 5 apresentou colonização em boca e, por conseguinte, a fungemia. Ao realizar o sequenciamento para *C. albicans* e inserir o perfil alélico no banco de dados do MLST, esta combinação resultou em DST inexistente. Possivelmente, estes alelos podem originar um novo genótipo não relatado (Tabela 18). Mas, tanto os isolados da cavidade oral quanto os da hemocultura apresentaram o mesmo perfil, sendo portanto, o mesmo DST novo.

Tabela 19. Paciente 05, internado em UTIN no hospital infantil localizado em Manaus- AM no ano de 2021, respectivas coletas em cavidade oral e sangue, espécies isoladas, alelos correspondentes a cada gene e genótipos de *C. albicans*

Fonte	Espécie	AAT1a	AAC1a	ADP1	MPIb	SYA1	VPS13	ZWF1b	DST
1º coleta – cavidade oral	<i>C. albicans</i>	58	27	99	4	2	76	4	-
1º hemocultura	<i>C. albicans</i>	58	27	99	4	2	76	4	-
2º hemocultura	<i>C. albicans</i>	58	27	99	4	2	76	4	-
2º coleta – cavidade oral	<i>C. albicans</i>	58	27	99	4	2	76	4	-

Por fim, os genótipos de *C. albicans* isolados em boca dos pacientes controles (Tabela 19). Salienta-se que estes pacientes foram selecionados por não apresentarem a infecção fúngica invasiva, visto que em 37,5% (3/8) houve isolamento de *C. albicans* e em 50% não houve crescimento de leveduras.

Tabela 20. Pacientes controles, neonatos, sem quadro de infecção fúngica invasiva em UTI neonatal localizado em Manaus – AM no ano de 2021, coletas em cavidade oral, espécies isoladas, alelos correspondentes a cada gene e genótipos de *C. albicans*

Paciente	Fase	Fonte	Espécie	AAT 1a	AAC 1a	ADP 1	MPI b	SYA1	VPS1 3	ZWF 1b	DST
Controle 01	Neonato	Coleta – cavidade oral	<i>C. albicans</i>	13	3	5	9	93	57	13	2907
Controle 02	Neonato	Coleta – cavidade oral	<i>C. albicans</i>	25	7	6	3	6	27	37	90
Controle 03	Neonato	Coleta – cavidade oral	<i>C. albicans</i>	13	10	15	6	53	32	15	591

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E CLÍNICO DE UTIS NEONATAIS E PEDIÁTRICAS

As unidades de terapia intensiva neonatal e pediátrica apresentam pacientes que demandam cuidados específicos, além de ser um desafio aos profissionais de saúde. Diante desta afirmativa, é oportuno a realização de levantamentos no estado do Amazonas, a fim de conhecer a situação atual desta população, compreender as necessidades de tratamento, bem como, subsidiar planejamento em saúde e deste modo, auxiliar gestores em seus processos decisórios.

Os pacientes internados em UTIN foram, principalmente, neonatos prematuros (70%), baixo peso, sexo masculino, com idade gestacional média de 33,9 semanas, nascidos de parto cesariana e um percentual de óbitos de 12%. Estes dados estão em concordância com estudos nacionais de Granzotto et al. (2012) e Said (2015).

Em vista disso, a prematuridade (<IG:37 semanas) e o baixo peso (<2.500 g) são causas frequentes de internação e estão associados ao maior risco de óbitos e ao agravamento dos casos. Observou-se também um considerável número de partos cesáreos, pois, em hipótese, entendeu-se que a via vaginal oferecia um maior risco ao feto. Ademais, estudos afirmam que a cesárea diminui a incidência de hemorragia intracraniana em recém-nascidos prematuros (BITTAR e ZUGAIB, 2010; ALBUQUERQUE et al.,2021).

Além disto, verificou-se que os principais motivos de internação, exceto a prematuridade, foram: sepse, pneumonia e malformação congênita. A literatura afirma que sepse (precoce ou tardia) é uma das principais causas de morbimortalidade em UTIN e envolve principalmente RN de baixo peso, submetidos a procedimentos invasivos (em consonância com os achados desta pesquisa). A infecção pode originar-se durante o período periparto (proveniente do trato gênito-urinário materno) ou em decorrência de internações por longos períodos (PROCIANOY; SILVEIRA, 2020).

Dentro os motivos de internação, a pneumonia (processo inflamatório que acomete os pulmões, resultante de infecção bacteriana, fúngica ou viral) é uma doença recorrente em pacientes infantis hospitalizados e apresenta uma taxa de mortalidade elevada. Sua procedência pode ser congênita, adquirida em ambiente nosocomial ou pelo uso de dispositivos, uma vez que, as defesas pulmonares do paciente estão comprometidas. Quanto à gravidade, dependerá do quadro clínico e da população da qual o neonato pertence (NISSEN, 2007). Em relação a malformação congênita, sabe-se que é uma das causas comuns em óbitos neonatais e tais casos estão em crescimento no Brasil, dado que Chuma et al. (2012) constatou um percentual de 30% desta condição clínica em uma unidade de terapia intensiva neonatal, localizada em Joinville - Santa Catarina.

As principais causas de internações de pacientes lactentes em UTIs pediátricas foram as doenças do aparelho respiratório, tais como pneumonia e insuficiência respiratória. Estes apresentaram, em sua maioria, as seguintes características: predominância do gênero masculino, idade média de 02 meses e utilização predominante de ventilação mecânica. Este perfil assemelha-se aos encontrados nos trabalhos de Dissessa et al. (2021) e Moreira et al. (2022).

De um modo geral, a ventilação mecânica, foi o dispositivo mais utilizado nas UTIs neonatais e pediátricas, pois as doenças de base mais prevalentes em neonatos e lactentes foram as infecções respiratórias. Entende-se que quanto maior a prematuridade mais chances de complicações respiratórias destes pacientes pois não possuem estrutura e função pulmonar adequada. Mediante este fato, recomenda-se o uso da ventilação mecânica a fim de proporcionar uma melhor oxigenação e, por conseguinte, aumento de sobrevida (SARETTO et al., 2019; SOUZA et al., 2021).

Na UTI pediátrica, predominaram internações de pacientes do sexo masculino, com faixa etária entre 01 a 05 anos, da raça parda. O principal motivo de internação, a pneumonia, foi similar aos lactentes, todavia, a leucemia (neoplasia) e neuropatia foram identificados como motivos de internação significantes para crianças acima de 01 ano.

E quanto as comorbidades, a doença neurológica (síndromes e crise convulsiva) foi o principal achado em crianças nesta pesquisa. Estes pacientes estão frequentemente sendo admitidos na UTI-ped devido suas condições clínicas, o que explica tal fato. Segundo o trabalho de Vilela et al. (2019) verificou-se que a principal causa de internação em UTI ped no hospital infantil em Brasília, foi a crise epilética, cuja idade variou entre 01 e 05 anos.

## 7.2 CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA ORAL DE PACIENTES INTERNADOS EM UTIN E UTI-PED

Pacientes hospitalizados em ambientes críticos, são indivíduos com elevada suscetibilidade para colonização e infecção por leveduras do gênero *Candida*, devido aos inúmeros fatores endógenos e exógenos que envolvem o hospedeiro e o microrganismo. Este estudo realizou coleta por meio de swab na cavidade oral de pacientes infantis internados em UTIs, antes dos procedimentos de profilaxia oral e identificou-se colonização em 44,66% dos participantes desta pesquisa.

Desse modo, a espécie *C. albicans* foi a levedura mais isolada em boca nas unidades intensivas neonatais e pediátricas. Ali et al. (2011) também constataram *C. albicans* como o fungo mais comum detectado na cavidade oral, em 77,7% das crianças hospitalizadas na Arábia Saudita. Além disso, Tinoco-Araújo (2013) em seus resultados, verificou que *C. albicans* está presente em 75% dos casos de infecção em UTIs infantis no Rio Grande do Norte. No entanto, Borges et al. (2009) constatou que metade dos pacientes em UTIN estavam colonizados por espécies *Candida* não-*albicans*.

Após a levedura *C. albicans*, isolou-se também, em ordem decrescente, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Cybelindnera fabianii* (*Candida fabianni*) e *C. haemulonis*. Tais achados, estão de acordo com pesquisas que afirmam o crescimento notável destas espécies *Candida* não-*albicans*, cuja preocupação se dá pela resistência aos antifúngicos tradicionais e pela virulência (LIMA et al., 2018)

Na UTI neonatal observou-se o predomínio de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. haemulonii*. A espécie *C. parapsilosis* é um patógeno neonatal significativo, associado a 10% de mortalidade (PAMMI et al., 2013). Sabe-se que a prematuridade e uso de dispositivos são fatores de risco importantes para o estabelecimento desta levedura e conforme o perfil de neonatos encontrados neste estudo, foi possível observar estas associações. Segundo o trabalho de Godim et al. (2009) no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, houve colonização em mucosa oral por *C. parapsilosis* em 26,7% dos neonatos internados.

*C. haemulonii* (MEYER E YARROW, 1984) é uma levedura recorrente em isolados de hemoculturas e foi encontrada, também, em úlceras nos dedos de pacientes com diabetes, segundo estudo de Khan et al. (2007). Em relação a cavidade oral, este microrganismo é incomum, no entanto, pacientes hospitalizados apresentam fatores que estão associados ao aparecimento deste microrganismo, como CVC, ventilação mecânica e uso prolongado de antimicrobianos (MURO et al. 2012).

Observou-se também a presença de *C. thasaenensis* na cavidade oral de um recém-nascido. Este microrganismo foi relatado pela primeira vez no estudo de Poomtien et al. (2012) que identificaram esta cepa em resíduos industriais da Tailândia, sendo considerada uma nova espécie de levedura ascomiceto, produtora de biosurfactante. Este achado demonstra que tal levedura pode integrar a microbiota oral.

Referente a UTI pediátrica, *C. albicans* e *C. tropicalis* foram as espécies mais isoladas, bem como, leveduras menos frequentes: *C. duobushaemulonii* e *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*). A colonização por *C. tropicalis* também foi constatada pelo estudo de Lima (2020) em pacientes com idade de 01 a 13 anos em UTI-ped, por meio de esfregaços de mucosa. Magnan (2018) realizou um trabalho similar em crianças de 01 a 12 anos e verificou a levedura *C. guilliermondii* (61,5% em swab) como o principal isolado, o que não foi observado neste estudo.

*C. duobushaemulonii* é uma espécie que compõe o complexo *Candida haemulonii*, intimamente relacionada com *Candida auris* (CENDEJAS-BUENO

et al., 2012). Este microrganismo de acordo com Jurado-Martín et al. (2020) era identificado erroneamente como *C. haemulonii*, entretanto, após avanços de métodos moleculares, percebeu-se esta nova cepa. *C. duobushaemulonii* participa de infecções superficiais e há relatos recentes de isolados em hemoculturas.

A levedura *Pichia kudriavzevii* telemorfo de *C. krusei*, está envolvida principalmente em fermentações de bebidas e alimentos, no entanto, é considerado um patógeno raro de importância clínica (BOIDIN, PIGNAL e BESSON, 1965). Nagarathnamma et al. (2017) relataram o primeiro surto de *Pichia kudriavzevii* como causador de sepse fúngica no hospital infantil em Bangalore - Índia, porém uma das limitações do estudo foi identificar a fonte e o modo de transmissão, além disso, está ligada à diarreia infantil (Bshabshe et al., 2019)

As condições clínicas orais e substâncias usadas para higienização estão em concordância com trabalhos de Blum et al., (2018) e Barbosa et al. (2020). A respeito da odontologia hospitalar, observou-se somente 01 cirurgião-dentista compondo a equipe multiprofissional do hospital C, visto que as demais unidades atribuíam os cuidados orais aos enfermeiros, fisioterapeutas ou fonoaudiólogos. Esta ausência de profissionais capacitados para diagnóstico, tratamento e profilaxia bucal é realidade de uma parcela significativa dos grandes centros hospitalares. Embora, exista a mobilização pelo projeto de Lei 883/19 que regulamenta a obrigatoriedade de profissionais da área odontológica nas unidades de terapia intensiva.

### 7.3 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE PACIENTES COM FUNGEMIA EM UTI NEONATAL E UTI PEDIÁTRICA.

Durante a realização desta pesquisa, constatou-se um percentual de 4,6% (5/107) de pacientes infantis com diagnóstico de infecção fúngica invasiva por *Candida* spp. Além disso, das quatro unidades hospitalares localizadas em Manaus - AM, somente uma maternidade pública e um hospital infantil público apresentaram casos de candidemia.

Diante disto, estudos indicam um possível declínio acerca da sepse fúngica, devido ao entendimento da sua epidemiologia, assim como, implementação de estratégias preventivas e direcionadas (atuação das Comissões de Infecção Hospitalar), posto que a mortalidade ainda é acentuada (Arsenault & Bliss, 2015, Walsh et al. 2019).

Evidenciou-se que 80% dos casos diagnosticados eram advindos de recém-nascidos com prematuridade precoce, baixo peso (1339 g), sexo feminino e idade gestacional de 31,5 semanas, na qual 100% destes neonatos nasceram de parto vaginal ( $p$ -valor $<0,05$ ). Lausch et al. (2019) realizaram o primeiro estudo epidemiológico nacional de candidemia pediátrica entre os anos de 2004 a 2014, na Dinamarca, e identificaram a maior incidência (103,8/100.000 nascidos vivos) em neonatos com baixo peso ao nascer e idade gestacional de 32 semanas. E Chermont et al. (2015) verificaram em um estudo retrospectivo, no Pará – Brasil, o perfil de recém-nascidos prematuros com fungemia e identificaram pacientes com idade gestacional de 30,42 semanas e peso a nascer de 1217 g.

Esta associação entre parto vaginal e fungemia, configura como um fator de risco materno (infecções nas primeiras semanas de vida que resultam da exposição de leveduras na fase intrauterina). A transmissão para o feto pode acontecer a partir da vagina colonizada, na qual ocorre aspiração fetal do fluido amniótico, e conseqüentemente um quadro de pneumonia ou sepse. A sepse precoce, pode advir de colonização materna no momento do parto, ruptura amniótica (início do trabalho de parto ou  $> 18$  horas antes do parto) (PINHEIRO et al., 2007; LUZ et al., 2021)

No nosso estudo os motivos de internação mais comuns foram sepse, prematuridade e pneumonia, além de doenças cardíacas e pulmonares serem as comorbidades mais identificadas. Os principais fatores de risco foram ventilação mecânica, intubação, nutrição parenteral. Ademais, o quadro clínico da paciente pediátrica também envolvia neuropatia e uso prolongado de sonda vesical (possível fonte de colonização). As espécies mais predominantes foram *C. albicans* (75%), *C. tropicalis* (17%) e *Cyberlindnera fabianni* (8%).

Conforme pesquisa desenvolvida por Pereira (2015) em 11 hospitais de Manaus, onde 86,4% (70/81) corresponderam a pacientes infantis, identificou-se

o predomínio de doenças pulmonares e gastrointestinais como comorbidades, além disto, as condições de risco prevalentes para fungemia, foram: uso prévio de antibióticos (98,6%), presença de cateter venoso central (95,9%) e internação em UTI/CTI (84,9%). Similarmente, as espécies *C. albicans* (34,57%), *C. tropicalis* (32,1%) e *C. parapsilosis* (17,29%) foram as mais isoladas. A média de mortalidade para neonatos foi (42,1%, 8/19), enquanto nesta pesquisa foi de 20% (1/5).

Um trabalho de revisão realizado nos anos de 2010 a 2020, na Colômbia, verificou que a taxa de mortalidade em recém-nascidos com diagnóstico de candidemia variou de 36% a 78%, cuja incidência é elevada em unidades de terapia intensiva (CORTES et al., 2020).

Santaloya et al. (2014) executaram um estudo multicêntrico, de vigilância de candidemia em pacientes pediátricos de 23 hospitais em 08 países da América latina, incluindo o Brasil, e obtiveram resultados semelhantes a este trabalho. Dos participantes, 29% eram neonatos e verificaram que os principais fatores de risco para os recém-nascidos foram: prematuridade, internação em unidade de terapia intensiva (UTI), nutrição parenteral, doença respiratória e ventilação mecânica, e para crianças: neoplasias, neutropenia e doença neurológica. Além disso, o antibiótico Vancomicina também foi relatado no tratamento destes pacientes. As principais espécies isoladas em neonatos e crianças foram *Candida albicans* (43,8% e 35,7%), *Candida parapsilosis* (27,0% e 26,3%) e *Candida tropicalis* (14,6% e 14,6%), respectivamente.

Em consonância as espécies isoladas de hemoculturas, o trabalho de Sutcu et. al (2016) verificaram que de 134 pacientes infantis internados em Istambul, *C. albicans* foi a levedura mais prevalente (47%), seguida de *C. parapsilosis* (13,4%) e *C. tropicalis* (8,2%).

No entanto, é descrito que a espécie *C. parapsilosis* é a levedura predominante em isolados de hemocultura originados de recém-nascidos (CHAN, et al., 2010; HARRINGTON et al., 2017)

A espécie *Cyberlindnera fabianni* (WICKERHAM e MINTER, 2009), estágio teleomórfico de *Candida fabianni*, foi isolada da cavidade oral e hemocultura de um recém-nascido prematuro (IG: 35 semanas), peso de 1504

g, com doença cardíaca. Arastehfar et al. (2019) afirma que esta levedura ascomiceto é oportunista e incomum, porém, está atrelada a produção de biofilme, resistência ao fluconazol, bem como, na instalação de sepse fúngica. Al-Sweih et al. (2018) descreveram um surto de candidemia pelo fungo *Cyberlindnera fabianni* em 10 neonatos prematuros e apresentaram como fatores de risco em comum: uso de antibióticos prévios e inserção de cateter intravascular, tal microrganismo já foi coletado em swab's vaginais.

Referente ao tratamento, Anfotericina B foi o antifúngico mais escolhido, além do fluconazol e micafungina. Pesquisas de Blytch et al. (2009) demonstraram que recém-nascidos receberam mais Anfotericina B do que adultos com fungemia. Silva et al. (2021) verificaram um percentual de 79% (30/38) de neonatos hospitalizados que realizaram terapia antifúngica com este medicamento.

Realizou-se uma segunda coleta em boca de pacientes com fungemia a fim de verificar mudanças a partir da infecção invasiva. Constatou-se que houve alteração na microbiota oral de 01 paciente após diagnóstico de candidemia (ausência de crescimento na primeira coleta).

Concernente aos pacientes controles, 50% apresentaram colonização em boca. A presença destas leveduras gera um alerta para possíveis infecções (STRAMANDINOLI et al. 2009, BORGES et al., 2009; SIMÕES et al., 2013).

#### 7.4 TÉCNICA MLST – GENÓTIPOS DE ISOLADOS DA CAVIDADE ORAL E HEMOCULTURAS

No presente trabalho, foram analisados isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* pela técnica de MLST provenientes de 04 pacientes, distribuídos em 1 maternidade pública e 1 hospital infantil público (referente ao quinto paciente, houve isolamento de *Cyberlindnera fabianni*, tal levedura não está incluída na genotipagem MLST). As amostras foram obtidas da cavidade oral e de hemoculturas positivas para o gênero *Candida*.

A fim de determinar os genótipos destas espécies, optou-se pela técnica denominada Multilocus Sequence Typing. Este método de tipagem é altamente

reprodutível, confiável, discriminatório e que possui um banco de dados global, permitindo comparações entre isolados e o compartilhamento de estudos epidemiológicos. MLST é baseado na análise de polimorfismos de nucleotídeos inseridos nos fragmentos de genes de manutenção (CANELA et al. 2021).

A análise é voltada para organismos haploides e diploides. Os genótipos diploides são determinados como DST (Diploid Sequence Typing), dado que a genotipagem é altamente eficaz para o gênero *Candida*, principalmente para espécies analisadas neste estudo: *C. albicans* e *C. tropicalis*. Portanto, de acordo com a metodologia proposta, a espécie *Cyberlindnera fabianni* (*Candida fabianni*) isolada em hemocultura e cavidade oral não foi investigada.

Atualmente, o banco de dados para *C. albicans* contém 4.686 isolados, dos quais 182 pertencem ao Brasil. Até março de 2022 foram identificados no banco de dados um quantitativo de 3.674 DSTs. A quantidade de alelos para cada gene foi: AAT1a (184 alelos), ACC1 (120) alelos, ADP1 (174 alelos), MP1b (178 alelos) SYA1 (243 alelos), VPS13 (313 alelos) e ZWF1b (298 alelos). Logo, quando se compara estes dados com os obtidos nesta pesquisa, constata-se que os genes VPS13 e ZWF1b são os genes do esquema de MLST com maior variabilidade genética.

Em referência a *C. tropicalis*, o website informa que há 1.351 isolados depositados, sendo 46 amostras procedentes do Brasil, e também se verificou 1.284 DSTs. Além disso, o número de alelos para cada gene foi: ICL (61 alelos), MDR1 (210 alelos), SAPT2 (78 alelos), SAPT4 (135 alelos), XYR1 (221 alelos) e ZWF1a (71 alelos).

Para espécie *C. albicans*, os alelos mais frequentes foram: AAT1a - alelo 2, AAC1 - alelo 3, ADP1 - alelo 5, MPIb - alelo 9, SYA1 - alelo 2, VPS13 - alelo 6 e ZWF1b - alelo 5, sendo a maioria dos alelos neste estudo em concordância com o banco de dados *C. albicans* referente a América do Sul, com exceção dos genes AAC1a (alelo5) e MPIb (alelo 2).

Ademais, o genótipo mais comum para *C. albicans* foi o DST435, tanto em cavidade oral quanto em corrente sanguínea. Segundo estudo de Côrrea (2015) o DST435 também foi identificado em hemocultura numa unidade de alta

complexidade, na cidade de Manaus, cujo desfecho foi o óbito. Além disso, Côrrea (2015) constatou que o DST90 foi o mais isolado em corrente sanguínea.

Através de amostras de swab vaginal e sangue, o DST435 foi identificado em isolados no Brasil nos anos de 2008 e 2013, além de ser encontrado em países como Israel, China e Japão. Entretanto, na América do Sul, os DSTs mais recorrentes em cavidade oral são: DST508, DST510, DST69 e em corrente sanguínea são: DST69, DST90, DST444 e DST24 (JOLLEY et al., 2018).

Em relação aos genótipos da cavidade oral dos pacientes controles (espécies comensais), identificaram-se: DST591, DST2907, DST90. O DST591 foi encontrado em hemocultura na Venezuela (sem registro do ano), assim como o DST2907 em hemocultura no Irã em 2011 e por fim o DST90 tanto em sangue no Brasil em 2013, quanto em urina na Malásia e China nos anos de 1995 e 2008, respectivamente (JOLLEY et al., 2018). Portanto, de acordo com o banco de dados global do MLST, estes genótipos foram identificados pela primeira vez na cavidade oral.

A respeito de *C. tropicalis*, os isolados de sangue e cavidade oral procederam de uma única paciente. Os alelos frequentes foram ICL1 (alelo 1), MDR1 (alelo 7), SAPT 2 (alelo 3), SAPT 4 (alelo 17), XRY1 (alelo 57) e ZWF1a (alelo 13) que resultaram no DST147. Este genótipo também foi caracterizado em Taiwan no ano de 1999, cuja amostra originou-se de urina.

Tal resultado divergiu do trabalho de Magri et al. (2013) em São Paulo, onde o DST 232 foi o mais observado em corrente sanguínea, em sua maioria advindos de pacientes pediátricos. E quanto à cavidade oral, conforme o banco de dados *C. tropicalis*, o DST90 foi o mais constante no Brasil (JOLLEY et al., 2018).

## 7.5 TÉCNICA MLST – RELAÇÕES GENÉTICAS DAS ESPÉCIES *C. ALBICANS* E *C. TROPICALIS* DA CAVIDADE ORAL E CORRENTE SANGUÍNEA

Conforme a proposta inicial deste estudo, a saber: verificar se leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade oral poderiam estar relacionadas ao

acometimento de candidemia em pacientes infantis hospitalizados. Identificou-se que, dos 05 pacientes com fungemia, somente 02 neonatos prematuros demonstraram colonização prévia em região bucal (mucosas jugais, língua e palato) e posterior quadro de infecção fúngica em corrente sanguínea.

Salienta-se que este estudo foi um dos primeiros a utilizar a técnica de genotipagem MLST para verificar a relação de leveduras do gênero *Candida* entre cavidade oral e fungemia.

Em relação a paciente 01, não é possível afirmar a origem da infecção invasiva, visto que a coleta em boca foi realizada após o diagnóstico, todavia, pode-se observar que o DST 147 (*C. tropicalis*) isolado em hemocultura, foi identificado posteriormente na cavidade oral. Quanto ao paciente 02, o genótipo DST 435 de *C. albicans*, foi encontrado em 5 amostras de hemoculturas, portanto, houve o entendimento de que a fungemia não possuía envolvimento com a região orofaríngea, pois não se observou crescimento microbiano prévio e subsequente na cavidade oral. Os pacientes 04 e 05 apresentaram DSTs iguais em isolados da cavidade oral e corrente sanguínea, sendo o DST435 e um possível novo genótipo identificados.

Acerca desta temática há poucos estudos, sendo este trabalho um dos primeiros a comparar perfis genéticos de isolados de *C. albicans* nestes sítios, por meio da técnica MLST.

Evidências similares foram encontradas por Batista et al. (2014), durante o período de 6 meses, em UTI neonatal de um hospital público de São Paulo. Constatou-se uma população de 125 recém-nascidos, dentre os quais, 12 pacientes apresentaram colonização oral persistente e suspeita clínica de sepse fúngica. Através do processo genotipagem por PFGE, encontrou-se concordância entre as espécies de leveduras da mucosa bucal e no sangue em 6 recém-nascidos (*C. albicans* com 5 casos e *C. parapsilosis* com 1 caso) que apresentaram, concomitantemente, colonização oral e septicemia. Por fim, 4 dos pacientes que indicaram leveduras em concordância, foram a óbito.

Heo et al. (2011) verificaram através da técnica PFGE que leveduras recuperadas de biofilme da cavidade oral eram indistinguíveis de isolados de

secreções traqueais e de lavado broncoalveolar em pacientes internados em UTI. De modo geral, estes resultados fundamentam a hipótese de que microrganismos inseridos em boca podem ser fonte para infecções invasivas.

## 8 CONCLUSÃO

- Observou-se perfis epidemiológicos distintos para pacientes neonatais e pediátricos internados em UTI, embora os motivos de internação, comorbidades e uso de dispositivos hospitalares apresentem similaridades.
- A espécie *C. albicans* foi a levedura de maior ocorrência na cavidade oral de pacientes infantis em ambientes críticos.
- Em UTIN, as espécies mais encontradas na região oral foram *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. haemulonis*.
- Em UTI-ped, houve isolamento majoritário de *C. albicans* e *C. tropicalis* em boca.
- Espécies incomuns foram identificadas na cavidade oral de pacientes neonatais e pediátricos, a saber: *Cyberlindnera fabianni*, *Candida thasaenensis*, *Candida duobushaemulonii* e *Pichia kudriavzevii*.
- O perfil de pacientes com diagnóstico de fungemia são, em sua maioria, neonatos com prematuridade precoce, com baixo peso ao nascer, onde a sepse, prematuridade e pneumonia foram os principais motivos de internação.
- Os dispositivos clínicos mais observados para candidemia foram a ventilação mecânica, intubação e cateter umbilical.
- A espécie *Candida albicans* foi a principal levedura causadora de fungemia, seguida de *C. tropicalis* e *Cyberlindnera fabianni*.
- O genótipo de *C. albicans* mais frequente foi o DST435, tanto em cavidade oral quanto em corrente sanguínea.
- Os genótipos de *C. albicans* isolados da cavidade oral apresentam diversidade genética.
- Um DST isolado da cavidade oral e corrente sanguínea, nunca relatado para *C. albicans*, configura provavelmente como novo genótipo.
- Para *C. tropicalis* identificou-se o DST147 em corrente sanguínea e região oral.
- Dois pacientes apresentaram genótipos de *C. albicans* idênticos em cavidade oral (colonização prévia) e corrente sanguínea. Tal fato

representa uma evidência de que a cavidade oral pode servir como fonte para o acometimento de fungemia.

## 9 REFERÊNCIAS

- Alanio A; Ollivier-Desnos M; Garcia-Hermoso; Bretagne S. **Investigating Clinical Issues by Genotyping of Medically Important Fungi: Why and How?**. *Clinical Microbiology Reviews*, v.30, n.3, p.671-707, may, 2017.
- Albuquerque MAJS; Dourado TF; Carneiro VMN; Pastro DOT. **Study of the epidemiological profile of child mortality in rio branco (ac), from 2013 to 2018**. *DêCiência em Foco*, v. 5, n. 1, p. 193-205, 2021.
- Ali GY, Algohary EH, Rashed KA, Almoghanum M, Khalifa AA. **Prevalence of Candida colonization in preterm newborns and VLBW in neonatal intensive care unit: role of maternal colonization as a risk factor in transmission of disease**. *J Matern Fetal Neonatal Med*, v. 25, n. 6, p;789-95, 2012.
- Aliaga SMD; Clark MPH; Laughon M; Walsh TJ; Hope WW; Benjamin DK; Kaufman D; Arrieta A; Jr DKB; Smith PB. **Changes in the Incidence of Candidiasis in Neonatal Intensive Care Units**. *PEDIATRICS*, v. 133, n. 2, p. 236 - 242, feb, 2014.
- Alonso-Valle H; de Acha Ó; García-Palomo JD; Farinas-Alvarez C; Fernandez-Mazarrasa C; Farinas MC. **Candidemia in tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality**. *Europ Clin Microbiol Infect Dis*, v. 22, p. 254-7, 2003.
- Al-Sweih N; Ahmad S; Khan S; Joseph L; Asadzadeh M; Khan Z. **Cyberlindnera fabianii fungaemia outbreak in preterm neonates in Kuwait and literature review**. *Mycoses*, v.62, p. 51-61, 2019.
- Antunes AGV; Pasqualotto AC; Diaz MC; D'Azevedo PA; Severo LC. **Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns**. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 46, n. 5, p. 239-241, sep-out, 2004.
- ANVISA. **Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº16: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2016**. Brasil, 2016.
- ANVISA. **Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº20: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2016**. Brasil, 2018.
- Araujo-Passos SM, **Prevalência de Candida spp. na cavidade oral de pacientes com e sem prótese dentária atendidos nas unidades básicas de saúde da cidade de Manaus-AM**. Mestrado (Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia). Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, p. 9, 2009.

Arastehfar A; Fang W; Al-Hatmi MAS; Afsarian MH; Daneshnia F; Bakhtiari M; Sadati SK; Badali H; Khodavaisy S; Hagen F; Liaom W; Pan W; Zomorodian K; Boekhout T. **Unequivocal identification of an underestimated opportunistic yeast species, *Cyberlindnera fabianii*, and its close relatives using a dual-function PCR and literature review of published cases.** Medical Mycology, v. 57, n. 7, p. 833- 840, Oct, 2019.

Aredrup MC. **Epidemiology of Invasive Candidiasis.** Curr Opin Crit Care, v. 16, n. 5, p. 445-452, oct, 2010.

Ariff S; Saleem AF; Soofi SB; Sajjad R. **Clinical spectrum and outcomes of neonatal candidiasis in a tertiary care hospital in Karachi, Pakistan.** J Infect Dev Ctries, v.5, n3, p. 216-23, mar, 2011.

Arnold HM; Micek ST; Shorr AF; Zilberberg MD; Labelle AJ; Kothari S; Kollef MH. **Utilização de recursos hospitalares e custos do tratamento inadequado da candidemia.** Farmacoterapia. v. 30, p. 361–368, 2010.

Arsenault AB; Bliss JM. **Neonatal Candidiasis: New Insights into an Old Problem at a Unique Host-Pathogen Interface.** Curr Fungal Infect Rep, v.9, n.4, p. 246-252, dec, 2015.

Barbosa AMC; Acioli ACR; Cruz GV; Montes MAJ. **Odontologia Hospitalar em Unidade de Terapia Intensiva: Revisão de Literatura.** Scientific-Clinical Odontology, p. 472, 2020.

Barros JNP; Almeida ETC; Sá JCR. **Possível relação entre candidíase oral e candidemia em pacientes hospitalizados.** Revista fluminense de odontologia, n. 50, jul-dez, 2018.

Batista GCM; Krebs VLJ; Ruiz LS; Auler ML; Hahn RC; Paula CR. **Oral colonization: A possible source for candidemia in low-weight neonates.** Journal de Mycologie Médicale, v. 24, p. 81-86, jan, 2014.

Batista SA; Siqueira JSS; Junior AS; Ferreira MF; Agostini M; Torres SR. **Alterações orais em pacientes internados em unidades de terapia intensiva.** Revista Brasileira de Odontologia, Rio de Janeiro, v. 71, n. 2, p. 156-159, 2014.

Brasil. Lei nº 883/2019, de 19 de fevereiro de 2019. **Apresentação da proposta sobre a obrigatoriedade da presença de profissionais de odontologia nas unidades de terapia intensiva e demais unidades hospitalares de internações prolongadas e dá outras providências.** Brasília, DF, 2019. Disponível em: [https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/prop\\_mostrarintegra?codteor=1713237](https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/prop_mostrarintegra?codteor=1713237).

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria Ministerial nº 930, de 10 de maio de 2012. **Define as diretrizes e objetivos para a organização da atenção integral e humanizada ao recém-nascido grave ou potencialmente grave e os**

**critérios de classificação e habilitação de leitos de Unidade Neonatal no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS).** Brasília, 2012.

Brasil, Ministério da Saúde. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde **Saúde da criança: crescimento e desenvolvimento.** Brasília, 2012.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria Ministerial nº N° 895, DE 31 DE MARÇO DE 2017. **Institui o cuidado progressivo ao paciente crítico ou grave com os critérios de elegibilidade para admissão e alta, de classificação e de habilitação de leitos de Terapia Intensiva adulto, pediátrico, UCO, queimados e Cuidados Intermediários adulto e pediátrico no âmbito do Sistema Único de Saúde – SUS.** Brasília, 2017.

Benjamin DK; Stoll BJ; Fanaroff AA; McDonald SA; Oh W; Higgins RD; Shahnaz D; Poole K; Lupton A; Goldberg R. **Neonatal Candidiasis Among Extremely Low Birth Weight Infants: Risk Factors, Mortality Rates, and Neurodevelopmental Outcomes at 18 to 22 Months.** Pediatrics January, v.117, n.1, p. 84-92, 2006.

Bittar RE; Zugaib M. **What is the best delivery mode for the premature fetus?** FEMINA, v. 38, n.10, out, 2010.

Blum DFC; Silva JAS; Baeder FM; Bona AD. **A atuação da Odontologia em unidades de terapia intensiva no Brasil.** Revista Brasileira de Terapia Intensiva, v. 30, p. 327-332, 2018.

Blyth CC; Chen SC; 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, v. 123, n. 5, p.1360-1368, may, 2009.

Boechat AL; Boechat NO. **Sepse: diagnóstico e tratamento.** Rev Bras Clin Med. São Paulo, v. 8, n. 5, p. 420-427, set-out, 2010.

Bonatti H; Stelzmueller I; Berger N; Lencher M; Grif K; Geltner C; Margreiter R; Lass-Flo C. **Infections caused by *Candida krusei* in five transplant and two surgical patients.** Surgical Infections, v.10, n.3, p.265-271,2009.

Borges RM; Soares LR; Brito CS; Brito DVD; Abdallah VOS; Gontijo Filho PPG. **Fatores de risco associados à colonização por *Candida spp.* em neonatos internados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal Brasileira.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 42, n. 4, p. 431-435, jul-ago, 2009.

Bougnoux ME; Morand S; D'enfert C. **Usefulness of Multilocus Sequence Typing for Characterization of Clinical Isolates of *Candida albicans*.** J Clin Microbiol, v. 40, n. 4, p. 1290-1297, 2002.

Bougnoux ME; Tavanti A; Bouchier C; Gow NAR; Magnier UM, Davidson AD; Maiden MCJ; D'Enfert C; Odds FC. **Collaborative**

**Consensus for optimized Multilocus Sequence Typing of *Candida albicans*.** J Clin Microbiol, v. 41, p. 5265-5266, 2003.

Brixner B; Renner JDP; Krummenauer EC. **Contaminação ambiental da UTI pediátrica: fator de risco para a ocorrência de infecções oportunistas?** Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção, Santa Cruz do Sul, v.6, n.1, 24-28, 2011.

Bshabshe AA; Joseph MRP; Battayah EC; Hamidb ME. **Fungal peritonitis caused by *Pichia kudriavzevii* following sleeve gastrectomy.** Ann Saudi Med, may-june, p. 205-208, 2019.

Canela HMS; Cardoso B; Frazão MR; Falcão JP; Vitali LH; Martinez R; da Silva MEF. **Genetic diversity assessed using PFGE, MLP and MLST in *Candida* spp. candidemia isolates obtained from a Brazilian hospital.** Braz J Microbiol. v. 52, n. 2, p.503-516, jun, 2021.

Chan S; Baley ED; Hossain J; Di Pentima MC. ***Candida* species bloodstream infections in hospitalised children: A 10-year experience.** J Paediatr Child Health, v. 51, n. 9, sep, p. 857-860, 2015.

Chermont AG; Rodrigues AA; Praxedes FB; Monma CA; Pinheiro RET; Nascimento LCC. **Candidemia em unidade materno infantil de referência: aspectos clínico-epidemiológicos e fatores de risco em prematuros com peso inferior a 1.500 g.** Rev Pan-Amaz Saude, v.6, n.4, p. 35-38, 2015.

Chitnis AS; Magill SS; Edwards JR; Chiller TM; Fridkin SK; Lessa FC. **Trends in *Candida* Central Line-Associated Bloodstream Infections Among NICUs 1999-2009.** PEDIATRICS, v. 130, n.1, p.46-52, 2012.

Cliff PR; Sandoe JAT; Heritage J; Barton RC. **Use of multilocus sequence typing for the investigation of colonization by *Candida albicans* in intensive care unit patients.** Journal of hospital infection, v. 69, n. 1, p. 24-32, 2008.

Colombo AL; Nucci M; Park B; Nouér SA; Arthington-Skaggs B; da Matta DA, Warnock D; Morgan J. **Epidemiology of candidemia in Brazil: nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers.** J Clin Microbiol, v. 44, p. 2816-23, 2006.

Colombo AL. **Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey.** PLoS ONE; v. 8, n.3, p.1-8, mar, 2013.

Côrrea MA. **Estudo da incidência de candidemia e diversidade genética de *Candida* em pessoas internadas em Unidades Hospitalares de Manaus – Amazonas.** Dissertação (Mestrado Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia). Universidade Federal do Amazonas. Amazonas, p.8, 2014.

Cortés JÁ; Ruiz JF; Melgarejo-Moreno LN; Lemos EV. **Candidemia en Colômbia.** Biomédica, v.40, n.1, p; 195-207, 2020.

Couto EMP; Carlos D; Machado ER. **Candidíase em neonatos: uma revisão epidemiológica**. Ensaios e Ciência, Ciências Biológicas, Agrárias e Saúde, v. 15, n. 4, p. 197-213, 2011.

Cuenca-Estrella M; Verweij PE; Arendrup MC; et al. **ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: diagnostic procedures**. Clin Microbiol Infect, v.18, n. 7: p. 9-18, 2012.

Dadar M; Tiwari R; Karthik K; Chakraborty S; Shahali Y; Dhama K. **Candida albicans - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update**. Microbial Pathogenesis, v.117, p. 128–138, 2018.

Delaloye T; Calandra J. **Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient**. Virulence, v. 5, n. 1, p. 161-169, jan, 2014.

Disessa CP; Ribeiro AP; Armond JE; Castro MM; Novo N; Juliano Y. **Crianças em Unidade de Terapia Intensiva de um Hospital Público da cidade de São Paulo: aspectos epidemiológicos durante internação: uma análise de 329 neonatos**. Revista Saúde (Sta.Maria), v. 47, n. 1, 2021.

Dzidic M; Collado MC; Abrahamsson T; Artacho A; Stensson M; Jenmalm MC; Mira A. **Oral microbiome development during childhood: an ecological succession influenced by postnatal factors and associated with tooth decay**. ISME J, v. 12, n. 9, p. 2292-2306, sep, 2018.

Epelbaum O; Chasan R. **Candidemia in the Intensive Care Unit**. Clin. in chest med, New York, v. 38, n. 3, p. 493-509, sep, 2017.

Fleischmann-Struzeket C; Goldfarb BR; Schlattman P; Schlapbach LJ; Reinhart K; Kisson N. **The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review**. Lancet Respir Med, v.6, n. 3, p.223-230, mar, 2018.

Gaetti-Jardi E; Setti JS; Cheade MFM; Mendonça JCGM. **Atenção odontológica a pacientes hospitalizados: revisão da literatura e proposta de protocolo de higiene oral**. Revista Brasileira de Ciências da Saúde, v. 11, n. 35, p.31-36, jan/mar, 2013.

Ghannoum MA; Richard J; Jurevic RJ; Pranab K; Mukherjee PK; Cui F; Sikaroodi M; Naqvi A; Gillevet PM. **Characterization of the Oral Fungal Microbiome (Mycobiome) in Healthy Individuals**. PLOS pathogens, v. 6, n. 1, jan, 2010.

Giacomazzi J; Baethgen L; Carneiro LC; Millington MA; Denning DW; Colombo AL; Pasqualotto AC. **Association with The LIFE Program. The burden of serious human fungal infections in Brazil**. Mycoses, v. 59, n. 3, p.145-50, mar, 2016.

Giolo MP; Svidzinsk TIE. **Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia**. J Bras Patol Med Lab, v. 46, n. 3, p. 225-234, jun, 2010.

Giusiano GE; Mangiaterra M; Rojas F; Gomez V. **Yeasts species distribution in Neonatal Intensive Care Units in northeast Argentina.** *Mycoses*, v. 47, p. 300–303, 2004.

Godim BA; Brito DD; Brito CS; Dolinger EJO; Abdalah VOS; Filho PPG. **Fatores de risco para colonização e sepse por *Candida albicans* e *Candida não albicans* em neonatos críticos.** *Ciências Saúde*, v. 16, n. 3, p. 105-109, jul-set, 2009.

Gomez A; Nelson KE. **O microbioma oral das crianças: desenvolvimento, doença e implicações além da saúde bucal.** *Microb Ecol*, v.73, p.492-503, 2017.

Granzotto JA; Mota DM; Real RF; Dias CM; Teixeira RF; Filho JCM; Tiecher GB; Pilecco AJPL; Gonçalves ER. **Análise do perfil epidemiológico das internações em uma unidade de terapia intensiva neonatal.** *Revista da AMRIGS*, Porto Alegre, v.56, n. 4, p. 304-307, out - dez. 2012

Harrington R; Kindermann SL; Hou Q; Taylor RJ; Azie N; Horn DL. **Candidemia and invasive candidiasis among hospitalized neonates and pediatric patients.** *Curr Med Res Opin*, n. 33, v. 10, p.1803-1812, oct, 2017.

Hartman ME; Linde-Zwirble WT; Angus DC; Watson RS. **Trends in the epidemiology of pediatric severe sepsis.** *Pediatr Crit Care Med*. v.14, n.7, p. 686-693, 2013.

Heo SM; Sung RS; Scannapieco FA; Haase EM. **Genetic relationships between *Candida albicans* strains isolated from dental plaque, trachea, and bronchoalveolar lavage fluid from mechanically ventilated intensive care unit patients.** *Journal of Oral Microbiology*, v.3, n.1, 2011.

Ingram EC; Vega MV; Norero X; Sáez-Llorens X; De Antonio R; Barría ER. **Risk factors and lethality associated with Neonatal Candidemia in a neonatal unit.** *Rev. chil. Pediatr*, Santiago, v.90, n.2, p. 196-193, apr, 2019.

Júnior JCCS; Izabel TSS. **Microbiota Oral e Sua Implicação no Binômio Saúde-Doença.** *Revista Contexto & Saúde*, Editora Unijuí, vol. 19, n. 36, p. 91-99, jan-jun. 2019.

Kaur H; Shankarnarayana SA; Hallur V; Muralidharan, J; Biswal, M; Ghosh, AK; Rudramurthy, SM. **Prolonged Outbreak of *Candida krusei* Candidemia in Paediatric Ward of Tertiary Care Hospital.** *Mycopathologia*, v. 185, n. 2, p. 257-268, abr, 2020.

Kisson MD; Ueki TM. **Sepsis and the Global Burden of Disease in Children.** *JAMA Pediatr.*, v.170, n.2, p. 107–108, feb, 2019

Khan ZU; Al-Sweih NA; Ahmad S; Al-Kazemi N; Khan S; Joseph L; Chandy L. **Outbreak of Fungemia Among Newborns Caused by *Candida haemulonii***

- Resistant to Amphotericin B, Itraconazole and Fluconazole.** Journal of Clinical Microbiology, v. 45, n. 6, jun, 2007.
- Klotz SA; Chasin BS; Powell B; Gaur NK; Lipke PN. **Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature.** Diagn Microbiol Infect Dis, v. 59, p. 401-406, 2007.
- Kollef M; Micek S; Hampton N; Doherty JÁ; Kumar A. **Septic shock attributed to *Candida* infection: importance of empiric therapy and source control.** Clinical Infectious Diseases, v. 54, n. 12, p. 1732-1746, 2012.
- Kuzucu C; Durmaz R; Otlu B; Aktas E; Gulcan H; Cismezi Z. **Species distribution antifungal susceptibility and clonal relatedness of *Candida* isolates from patients in neonatal and pediatric intensive care units at a medical Center in Turkey.** The New Microbiologica, v. 31, p. 401-408, 2008.
- Jolley KA; Bray JE; Maiden MCJ. **Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications.** Wellcome Open Res, v. 3, n.124, sep, 2018.
- Jurado-Martín I; Marcos-Arias C; Tamayo E; Guridi A; de Groot PWJ; Quindós G; Eraso E. ***Candida duobushaemulonii*: An Old But Unreported Pathogen.** J Fungi (Basel), v.6, n.4, p. 1-14, dec, 2020
- Juyal D; Sharma M; Pal S; Rathaur VK; Sharma N. **Emergence of Non-*Albicans Candida* Species in Neonatal Candidemia.** North American Journal of Medical Sciences, v. 5, n. 9, p. 541-545, 2013.
- Lacaz CS; Porto E; Martins JEC; Heins-Vaccari EM; Melo NT. **Tratado de micologia médica Lacaz.** Sarvier, São Paulo, 9 ed, 2002.
- Lausch KR; Schultz Dungu KH; Callesen MT; Schrøder H; Rosthøj S; Poulsen A; Østergaard L; Mortensen KL; Storgaard M; Schønheyder HC; Søgaaard M; Arendrup MC. **Pediatric Candidemia Epidemiology and Morbidities: A Nationwide Cohort.** Pediatr Infect Dis J, v.38, n.5, p.464-469, may, 2019.
- Lepak A.; Andes D. **Fungal sepsis: optimizing antifungal therapy in the critical care setting.** Critical Care Clinics, v.27, p.123-147, 2011.
- Lima ALA; Filho AAO; Pérez ALAL; Sousa JP; Pinheiro LS; Neto HD; Júnior JPS; Lima EO. **Atividade antifúngica do geraniol contra *Candida não-albicans* de importância clínica em pediatria.** Rev. UNINGÁ, Maringá, v. 55, n. 3, p. 161-169, jul-set, 2018.
- Lima LS. **Estudo dos fatores de virulência de *Candida* spp. isoladas da cavidade bucal de pacientes pediátricos em UTI.** {Dissertação} Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.
- Luz GA; Schneider GC; Carmo MS. **Candidíase e candidemia neonatal: Revisão de literatura.** Research, Society and Development, v. 10, n. 4, p.1-22, 2021.

Maciel CCS; Cândido HRFL. **Infecção hospitalar: principais agentes e drogas administradas.** Revista Eletrônica de Ciências, v. 3, n. 1, p. 33-43, jan – jun, 2010.

Magri MMC; Gomes-Gouvêa MS; Freitas VLT; Motta AL; Moretti ML; Shikanai-Yasuda MA. **Multilocus Sequence Typing of *Candida tropicalis* Shows the Presence of Different Clonal Clusters and Fluconazole Susceptibility Profiles in Sequential Isolates from Candidemia Patients in São Paulo, Brazil.** Journal of Clinical Microbiology, v.51, n.1, p. 268-277, dec, 2013.

Maiden MC; Bygraves JA; Feil E; Morelli G; Russell JE; Urwin R; Zhang Q; Zhou J; Zurth K; Caugant DA; Feavers IM; Achtman M; Spratt BG. **Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms.** Proc Natl Acad Sci U S A. v. 95, p. 3140-3145, mar, 1998.

Martin GS; Mannino DM; Eaton S; Moss M. **The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000.** The New Eng J Med, v. 348, p. 1546-54, apr, 2003.

Matta DA. **Caracterização de isolados clínicos de *Candida albicans* de estudo brasileiro multicêntrico de candidemia por metodologia de “Multilocus Sequence Typing (MLST)”**. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, 2009.

Magnan MK. **Análise clínica e prevalência de espécies de candida na cavidade bucal de pacientes pediátricos hospitalizados em UTI.** {Tese} Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018

McManus BA, Maguire R, Cashin PJ, Claffey N, Flint S, Abdulrahim MH, Coleman DC. **Enrichment of multilocus sequence typing clade 1 with oral *Candida albicans* isolates in patients with untreated periodontitis.** J Clin Microbiol, v. 50, n. 10, p. 3335-3344, oct, 2012.

Méan M; Marchetti O; Calandra T. **Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit.** Crit Care., v. 12, n. 1, p. 204, 2008.

Medeiros EA; Lott TJ; Colombo AL; Godoy P; Coutinho AP; Braga MS; Nucci M; Brandt ME. **Evidence for a pseudo-outbreak of *Candida guilliermondii* fungemia in a university hospital in Brazil.** J Clin Microbiol., v. 45, n. 3, p. 942-947, mar, 2007.

Meyer E; Geffers C; Gastmeier P; Schwab F. **No increase in primary nosocomial candidemia in 682 German intensive care units during 2006 to 2011.** Euro Surveill. v.18, p.1–8, 2013.

Milsop JW; Fazel N. **Oral candidiasis.** Clinics in Dermatology, v. 34, n.4, p. 487-494, 2016.

Montagna MT; Lovero G; De Giglio O; Latta R; Caggiano G; Montagna O; Coretti C; Cuna T; Giglio M; Dalfino L; Bruno F; Puntillo F. **Epidemiology of invasive fungal infections in the intensive care unit: results of a multicenter Italian survey (AURORA Project)**. *Infection*, v. 41, n. 3, p. 645–653, jun, 2013.

Morace G, Borghi E, Iatta R, Amato G, Andreoni S, Brigante G, et al. **Antifungal susceptibility of invasive yeast isolates in Italy: the GISIA3 study in critically ill patients**. *Infect Dis*, v. 11, n. 130, 2011.

Morais TMN; Silva A; Avi ALRO; Souza PHR; Knobel E, Camargo LFA. **A importância da atuação odontológica em pacientes internados em unidade de terapia intensiva**. *Rev Bras Ter Int*, v. 18, n. 4, p.412-417, 2010.

Moreira MEL. **Controversies about the management of invasive fungal infections in very low birth weight infants**. *J. Ped*, v. 81, n.1, S52-S58, 2005.

Moreno S; Parra B; Botero JE; Moreno F; Vásquez D; Fernández H; Alba S; Gallego S; Castillo G; Contreras A. **Microbiota periodontal y microorganismos aislados de válvulas cardíacas en pacientes sometidos a cirugía de reemplazo de válvulas en una clínica de Cali, Colombia**. *Biomédica*, v. 37, n. 1, p. 516-525, 2017.

Motta FA; Costa LMD; Muro MD; Cardoso MN, Picharski GL; Jaeger G; Burger M. **Risk factors for candidemia mortality in hospitalized children**. *Jornal de Pediatria*, Rio de Janeiro, v. 93, n. 2, 165-171, 2017.

Moreira MGS; Kegler JJ; Monteiro AS; Sehnem GD; Ribeiro AC; Neves ET. **Caracterização da morbidade de crianças/adolescentes com cuidados contínuos e complexos internados em terapia intensiva pediátrica**. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 2, e13311225343, 2022

Mourão PHO; Magalhães PP; Mendes EN. **Indigenous microbiota of human beings**. *Revista Médica de Minas Gerais*, v. 15, n. 3, p. 1-12, 2004.

Mucha FS; Guilherme CF; Silva AG. **Frequência e características maternas e do recém-nascido associadas à internação de neonatos em UTI no município de Joinville, Santa Catarina – 2012**. *Rev. Bras. Saúde Mater. Infant*, v.15, n. 2, apr-jun, 2015.

Munguia-Pérez R; Martínez-Contreras R; Xicotencatl-Rosas S; Duarte-Escalante E; Castañeda-Roldan E. **Oral fungal diversity (mycobiome) in healthy individuals from rural and urban areas from the neovolcanic axis in Puebla, Mexico**. *Scholars Research Library*, v. 3, n. 5, p. 2173–80, 2012.

Muro MD, Motta Fde A, Burger M, Melo AS, Dalla-Costa LM. **Echinocandin resistance in two *Candida haemulonii* isolates from pediatric patients**. *J Clin Microbiol*. v. 50, n. 11, p. 3783-3785, 2012.

- Nagarathnamma T, Chunchanur SK, Rudramurthy SM, Vineetha KR, Ramamurthy K, Joseph J, Ambica R. **Outbreak of *Pichia kudriavzevii* fungaemia in a neonatal intensive care unit.** J Med Microbiol. v.66, n.12, p.1759-1764, dec, 2017.
- Nasry B. **Diversity of the Oral Microbiome and Dental Health and Disease.** Int J Clin Med Microbiol, v. 1, n. 1, p.1-8, 2016.
- Negri M; Martins M; Henriques M; Svidzinski TIE; Azeredo J; Oliveira R. **Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients.** Mycopathologia, v. 169, p.175–82, 2010.
- Nissen MD. **Pneumonia congênita e neonatal.** Paediatric Respiratory Reviews, v. 8, n. 3, p.195-203, set, 2007.
- Nogacka AM; Salazar N; Arboleya S; Suárez M; Fernández N; Solís G; de Los Reyes-Gavilán CG; Gueimonde M. **Early microbiota, antibiotics and health.** Cell Mol Life Sci., v. 75, n.1, p. 83-91, jan, 2018.
- Nucci M; Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T; Tiraboschi IN; Cortes J; Zurita J; Guzman-Blanco M; Santolaya ME; Thompson L; Sifuentes-Osornio J; Echevarria JI; Colombo AL. **Epidemiology of candidemia in Latin American: A laboratory-based survey.** PLoS One, v.8, n.3, p. e59373, 2013.
- Odds FC; Bougnoux ME; Shaw DJ; Bain JM; Davidson AD; Diogo D; Jacobsen MD; Lecomte M; Li SY; Tavanti A; Maiden MC; Gow NA; d'Enfert C. **Molecular phylogenetics of *Candida albicans*.** Eukaryot Cell, v.6, n. 6, p.1041–1052, 2007.
- Odds FC; Jacobsen MT. **Multilocus Sequence Typing of Pathogenic *Candida* Species.** Eukaryotic Cell, v.7, n. 7, p. 1075–1084, jul, 2008.
- OLIVEIRA JC. **Tópicos em Micologia Médica.** Rio de Janeiro; 2014.
- Oliveira VKP; Ruiz LS; Oliveira NAJ; Moreira D; Hahn RC; Melo ASA; Nishikaku AS; Paula CR. **Fungemia caused by *Candida* species in a children's public hospital in the city of São Paulo, Brazil: study in the period 2007-2010.** Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, v. 56, n. 4, p. 301-305, 2014.
- Padovani MCRL; Souza SAB; Sant'Anna GR; Guaré RO. **Protocolo de cuidados bucais na Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) Neonatal.** Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde, v. 14, n. 1, p. 71-80, 2012.
- Pammi M, Holland L, Butler G, Gacser A, Bliss JM. ***Candida parapsilosis* is a significant neonatal pathogen: a systematic review and meta-analysis.** Pediatr Infect Dis J, v.32, n. 5, p.206-216, may, 2013.
- Pana ZD; Roilides E; Warris A; Grolls AH; Zaoutis. T. **Epidemiology of Invasive Fungal Disease in Children.** Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society, v. 6, n. 1, p. 3-11, 2017.

Pasqualotto AC; Antunes AGV; Severo, LC. ***Candida guilliermondii* as the aetiology of candidosis**. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, v. 48, n.3, p. 123-127, 2006.

Peixoto ITA; Sardi JCO; Aníbal PC; Gonçalves RB; Hofling JF. **Evidências científicas de *Candida* spp. em bolsas periodontais**. RFP, Passo Fundo, v. 15, n. 2, p. 177-182, mai-ago, 2010.

Pereira GH; Müller PR, Szeszs MW, Levin AS, Melhem MSC. **Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*C. albicans* *Candida* species**. Medical Mycology, v. 48, n. 6, p. 839–842, sep, 2010.

Pereira VN. **Perfil epidemiológico de pacientes com candidemias em 11 hospitais de Manaus e avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos e fatores de virulência de *Candida* spp.** Dissertação (Mestrado Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia). Universidade Federal do Amazonas. Amazonas, p.8, 2015.

Pinheiro RS; Ferreira LCL; Brum IR; Pereira J; Monte GRL. **Estudo dos fatores de risco maternos associados à sepse neonatal precoce em hospital terciário da Amazônia brasileira**. Rev. Bras. Ginecol. Obstet., v.29, n.8, ago, 2007.

Poomtien J; Jindamorakot S; Limtong S; Pinphanichakarn P; Thaniyavarn J. **Two new anamorphic yeasts species, *Cyberlindnera samutprakarnensis* sp. nov. and *Candida thasaenensis* sp.nov., isolated from industrial wastes in Thailand**. Antonie Van Leeuwenhoek. v. 103, n. 1, p. 229-238, jan, 2013.

Procianoy RS; Silveira RC. **Os desafios no manejo da sepse neonatal**. J. Pediatr. Rio de Janeiro, v. 96, n.1, Mar-Apr, 2020.

Pfaller MA, Diekema DJ. **Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem**. Clin Microbiol Rev, v. 20, n.1, p. 133-163, Jan, 2007.

Rao S; Ali U. **Systemic fungal infections in neonates**. Journal of Postgraduate Medicine, v. 51, p. 27-29, 2005.

Rosanova T; Brizuela M; Carnovale S; Caracciolo B; Caravallo N, Gómez S, Sarkis C. **Candidemia en un hospital pediátrico de alta complejidad**. Medicina Infantil, p.17-21, 2018.

Rudd KE; Johnson SC; Agesa KA; Shackelford KA; Tsoi D; Kievlan DH; Comlobara DV; Ikuta KS; Kisson N; et al. **Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the global burden of disease study**. The lancet, v. 395, p. 200-211, jan, 2020.

Santolaya ME; Alvarado T; Queiroz-Telles F; Colombo AL; Zurita J; Tiraboschi IN; Cortes JÁ; Thompson L; Guzman M; Sifuentes J; Echevarría JI; Nucci M. **Latin American Invasive Mycosis Network. Active surveillance of candidemia in children from Latin America: a key requirement for**

**improving disease outcome.** *Pediatr Infect Dis J*, v.33, n.2, p.40-44, feb, 2014.

Sutcu M; Salman N; Akturk H; Dalgic N; Turel O; Kuzdan C; Kadayifci EK; Sener D; Karbuz A; Erturan Z; Somer A. **Epidemiologic and microbiologic evaluation of nosocomial infections associated with *Candida* spp in children: A multicenter study from Istanbul, Turkey.** *Am J Infect Control*, v.44, n.10, p.1139-1143, oct, 2016.

SAID, LM. **Perfil epidemiológico dos recém-nascidos admitidos na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal de um hospital de referência em atenção materno infantil.** Dissertação (Mestrado em Teoria e Pesquisa do Comportamento) Universidade Federal do Pará. 2015.

Saldanha KFD, Costa DC; Peres PI; Oliveira MM; Masocatto DC; Jardim ECG. **A odontologia hospitalar: revisão.** *Arch Health Invest*, v. 4, n.1, p. 58-68, 2015.

Santos TB; Amaral, MA - Ng, Peralta NG; Almeida RS. **A Inserção da Odontologia em Unidades de Terapia Intensiva.** *Journal of Health Sciences*, v. 19, n. 2, p. 83-87, 2017.

Shane AG; Sanchez PJ; Stoll BJ. **Neonatal sepsis.** *The Lancet*, p.1-11, apr, 2017.

Sherman AP; Santos DVO; Cardoso AO; Rocha RF. **Presença de *Candida* spp. na cavidade bucal de lactentes durante os primeiros quatro meses de vida.** *Cienc Odontol Bras*, v.7, n.3, p. 79-86, jul-set, 2004.

Saretto GC; Pacheco CM; Corazza EJ, Fernandes HS. **Perfil epidemiológico na unidade de terapia intensiva neonatal e pediátrica de um hospital com ênfase na fisioterapia.** *Revista de Extensão da UNESC*, v. 4, n. 1, 2019.

Sidrim JJC; Rocha MFG. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, ed.1, p. 21, 2004.

Silva HYW; Freitas FTM. **Invasive candidiasis in a Brazilian neonatal intensive care unit.** *Revista Brasileira de Saúde Materna*, v.21, n. 2, apr-jun, 2021.

Silveira RC, Procianoy RS. **Uma revisão atual sobre sepse neonatal.** *Boletim Científico de Pediatria*, v. 1, n.1, 2012.

Simões RJ; Fonseca P; Figueira MH. **Infecções por *Candida* spp na Cavidade Oral.** *Odontol. Clín -Cient.*, Recife, v.12, n.1, p.19-22, jan-mar, 2013.

Siqueira-Batista R; Gomes AP, Calixto-Lima L, Vitorino RR, Perez MCA, Mendonça EG et al. **Sepse: atualidades e perspectivas.** *Rev. bras. ter. intensiva*, São Paulo, v. 23, n.2, p.207-216, abr-jun, 2011.

Soares LPMA; Oliveira RT; Carneiro ICRS. **Infecções da corrente sanguínea por *Candida* spp. em unidade neonatal de hospital de ensino da Região Norte do Brasil: estudo dos fatores de risco.** Rev. Pan- Amaz. Saúde, v.4.n.3, p.19-23, set, 2013.

Souza FL; Queiroz ML; Coutinho DJG; Albuquerque CG. **Práticas da ventilação mecânica invasiva da UTI neonatal do hospital das clínicas de Pernambuco.** Brazilian Journal of Development, Curitiba, v.7, n.12, p.119626-119638, dez, 2021.

Song ES; Shin JH; Jang HC; Choi MJ; Kim SH; Bougnox ME; d'Enfert C; Choi YY. **Multilocus sequence typing for the analysis of clonality among *Candida albicans* strains from a neonatal intensive care unit.** Med Mycol, v.52, n.6, p.653-658, 2014

Stramandinoli RT; Souza PHC; Westphalen FH; Bisinelli JC; Ignácio SA; Yurgel LS. **Prevalência de candidose bucal em pacientes hospitalizados e avaliação dos fatores de risco.** Rev Sul-Bras Odontol, v.7, n.1, p. 66-72, mar, 2010.

Struzycka I. **The oral microbiome in dental caries.** Polish J Microbiol, v. 63, n. 2, p. 127–35, 2014.

Su JZ; Yang YL; Rong R; Wu B-Q. **Genotype and homology analysis of pathogenic strains and candida canbic colonization of newborns Hospitalized.** Pediatrics & Neonatology, v.59, n. 5, p. 488-493, oct, 2018.

Sulyanto MR; Thompson ZA; Beall JC; Leys JE; Griffen AL. **The Predominant Oral Microbiota Is Acquired Early in an Organized Pattern.** Nature, v. 9, n.1, p. 1-7, jul, 2019.

Tan BH; Chakrabarti A; Li RY; Patel AK; Watcharananan SP; Liu Z; Chindamporn UM; Tan AL; Sun PL; Wu UI; Chen YC . **Incidence and species distribution of candidaemia in Asia: a laboratory-based surveillance study.** Clin Microbiol Infect, v. 21, n. 10, p. 946-953, 2015.

Tavanti A; Gow NA, Senesi S; Maiden MC; Odds FC. **Optimization and validation of multilocus sequence typing for *Candida albicans*.** J Clin Microbiol, v.41, n.8, p.3765-3776, aug, 2003.

Tavanti A; Davidson AD; Johnson EM; Maiden CJ; Shaw DJ; Gow NAR; Odds FC. **Multilocus Sequence Typing for Differentiation of Strains of *Candida tropicalis*.** Journal of Clinical Microbiology, n.43, v. 11, p. 5593-5600, nov, 2005.

Tinoco-Araujo JE; Araújo DFG; Barbosa PG; Santos PSS; Medeiros AMC. **Candidíase invasiva e alterações bucais em recém-nascidos prematuros.** Einstein. v. 11, n. 1, p. 71-75, fev, 2013.

Toledo G; Cruz I. **The importance of the oral hygiene in intensive care unit as a way of prevention of nosocomial infection- sistematic literature review.** J. Special Nurs. Care. v. 1, n. 2, p. 1-14, 2009.

Trofa D; Gácsér A; Nosanchuk J. ***Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen**. Clinical microbiology reviews, v. 21, n.4, p. 606-625, out, 2008.

Tsai MH; Wang SH; Hsu JF; Lin LC; Chu SM; Huang Hr; MC Chiang; Fu RH; Lu JJ; Huan JC. **Clinical and molecular characteristics of bloodstream infections caused by *Candida albicans* in children from 2003 to 2011**. Clin Microbiol Infect, v.21, n.11, p. 1018.e1–1018.e8, nov, 2015.

Tsai MH; Hsu JF; Chu SM; Chang JP; Lai MYMei-Yin Lai; Wu H; Huang H-R; Chiang MC; Fu R-H; Lu J-J. **Clinical and microbiological characteristics, and impact of therapeutic strategies on the outcomes of children with candidemia**. Scientific Reports, v. 7, n. 1, p.1-9, 2017.

Tulio KS; Stramandinoli-Zanicotti RT; Dirschnabel AJ; Schussel JL; Wasilewski JHS; Krelling A; Beltrame OC; Martins CRW; Sassi LM. **Alterações no perfil da microbiota bucal durante permanência na UTI: colonização por patógenos respiratórios potenciais**. Arch Health Invest, v. 7, n. 9, p. 351-357, 2018.

Urwin R; Martin CJ. **Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology Maiden**. TRENDS in Microbiology. v.11, n.10, oct, 2003.

Van Asbeck EC; Huang Y-C; 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, v. 164, n. 6, p. 287-293, dec, 2007.

Viani PRC. ***Candida* provenientes de infecção hospitalar isoladas de pacientes em hospital infantil do Estado de São Paulo e avaliadas por marcadores fenotípicos**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 10, 2007.

Vilela LR; Brízida LVO; Pádua MF; Silva BM; Seguti LF. **Perfil de crianças e adolescentes internados por distúrbios neurológicos**. Revista de Pediatria, v. 9, n.3, 2019.

Walsh TJ; Katragkou A; Chen T; Salvatore C; Roilides E. **Invasive Candidiasis in Infants and Children: Recent Advances in Epidemiology, Diagnosis, and Treatment**. Journal of fungi, v. 5, n. 11, p. 2-9, jan, 2019.

Wille MP; Guimaraes T; Furtado G; Colombo AL. **Historical trends in the epidemiology of candidaemia: analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 108, n.3, p. 288-292, 2013.

Wu K; Luo K; Li L; Zhang Q; Zhu J; Gao C; Chen M; Zhu M; Li W. **Multilocus Sequence Typing of Pathogenic *Candida albicans* Isolates Collected from**

**a Teaching Hospital in Shanghai, China: A Molecular Epidemiology Study.** PlosOne, v. 10, n. 4, April, 2015.

Wu JY; Zhou DY; Zhang Y; Mi F; Xu J. **Analyses of the Global Multilocus Genotypes of the Human Pathogenic Yeast *Candida tropicalis*.** Front Microbiol. v.10, n.900, apr, 2019.

Xavier PCN; Chang MR; Nunes MO; Palhares DB; Silva RA; Bonfim GF; Junior NFA. **Candidemia neonatal, em hospital público do Mato Grosso do Sul.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 41, n. 5, p. 459-463, 2008.

Yapar N; Pullukcu H; Avkan-Oguz V; Sayin-Kutlu S; Ertugrul B; Sacar S; Cetim B; Kaya O. **Evaluation of species distribution and risk factors of candidemia: a multicenter case-control study.** Med Mycol., n. 49, p. 26-31, 2011.

Yu Y; Du L; Yuan T; Zheng J; Chen A; Chen L; Shi L. **Risk Factors and Clinical Analysis for Invasive Fungal Infection in Neonatal Intensive Care Unit Patients.** Am J Perinatol, v. 30, p. 589-594, 2013.

Zaoutis TE; Argon J; Chu J; Berlin JA; Walsh TJ; Feudtner C. **The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis.** Clin Infect Dis, v. 41, n. 1, p.1232-1239, 2005.

## APÊNDICE A

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PAIS OU RESPONSÁVEIS LEGAIS

O(A) seu(sua) filho(a) está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa, intitulado: **MICROBIOTA ORAL E FUNGEMIA: ANÁLISE DA POSSÍVEL RELAÇÃO EM PACIENTES NEONATAIS E PEDIÁTRICOS INTERNADOS EM UTI**, sob responsabilidade da pesquisadora THAIS MOREIRA GAMA. O objetivo do projeto é conhecer quais espécies de fungos são mais encontradas na boca de pacientes infantis internados em ambiente hospitalar e verificar se estes fungos tem relação direta ou contribuem para uma infecção no sangue (fungemia) em recém-nascidos e crianças internadas em UTI.

O(A) Sr(a). tem plena liberdade de recusar a participação do seu(sua) filho(a) ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma para o tratamento que ele(a) recebe neste serviço de Unidade de Terapia Intensiva neonatal ou pediátrica. Para participar deste estudo o (a) Sr. (a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. E se eventualmente houver danos decorrentes dos riscos desta pesquisa, o pesquisador assumirá a responsabilidade pelo ressarcimento e pela indenização.

A participação do(a) seu(sua) filho(a) é voluntária e será realizada por meio do acesso ao prontuário e utilização dos microrganismos isolados a partir da boca e sangue (caso haja suspeita de fungemia). O pesquisador coletará na região oral através de um “cotonete” estéril nas áreas de língua, mucosa das bochechas, palato duro e se eventualmente o paciente for diagnosticado com candidemia, ocorrerá uma segunda coleta oral. O sangue será coletado pela própria equipe hospitalar, caso o paciente apresente sinais e sintomas clínicos de sepse, somado a suspeita de fungemia clínica pela equipe médica e a pesquisa necessitará utilizar o fungo que crescer.

Segundo a resolução do CNS 466/2012 toda pesquisa com seres humanos envolve riscos, porém no presente estudo, estes serão minimizados, principalmente considerando as medidas éticas e de biossegurança que serão implementadas a fim de reduzir ao máximo os riscos inerentes.

Para minimizar possíveis riscos, a entrada na UTI sempre será com o amparo da equipe de enfermagem e com uso de EPI e a coleta na cavidade oral será com uso de um “cotonete” estéril. Em caso do paciente necessitar coletar sangue esse será coletado conforme a recomendação médica e pela equipe do hospital, não havendo participação do pesquisador. Por fim, a identificação do paciente será codificada, prezando pela privacidade e sigilo das informações.

Se o sr(a) aceitar a participação do menor, estará colaborando para compreensão da possível relação patogênica de fungos encontrados na cavidade oral e sangue, em pacientes infantis hospitalizados. Com os dados obtidos, esperamos confirmar isso e assim contribuir com uma melhor qualidade

Responsável legal \_\_\_\_\_

Pesquisador \_\_\_\_\_

da atenção à saúde que leve a diminuição da mortalidade em UTI neonatal e pediátrica.

Se julgar necessário, o(a) Sr(a) dispõe de tempo para que possa refletir sobre a participação do seu filho(a), consultando, se necessário, seus familiares ou outras pessoas que possam ajudá-los na tomada de decisão livre e esclarecida. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas a identidade do(a) seu(sua) filho(a) não será divulgada, sendo guardada em sigilo.

O(A) Sr(a). pode entrar em contato com a pesquisadora responsável Thais Moreira Gama, a qualquer tempo para informação adicional no **Instituto Leônidas e Maria Deane - Fundação Oswaldo Cruz, no endereço: Rua Teresina, 476, Adrianópolis, Manaus/AM, pelo telefone (92) 3621-2333 ou e-mail: [projeticobiota@gmail.com](mailto:projeticobiota@gmail.com)**. E com o **Comitê de Ética em Pesquisa da Ufam – Hospital Getúlio Vargas (UFAM/HUGV)**.

### Consentimento Pós-Infomação

Eu, \_\_\_\_\_, portador(a) do documento de identidade \_\_\_\_\_ fui informado sobre o que a pesquisadora quer fazer e porque precisa da colaboração do(a) meu(minha) filho(a), e entendi a explicação. Por isso, eu concordo na participação do(a) meu(minha) filho(a) no projeto, sabendo que ele(a) não vai ganhar nada e que poderá sair quando quiser. Este documento (TCLE) será elaborado em duas VIAS, que serão rubricadas em todas as suas páginas, exceto a com as assinaturas, e assinadas ao seu término por mim e pelo pesquisador responsável, ficando uma via com cada um.

### Menor Participante

Nome: \_\_\_\_\_

Manaus, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Responsável Legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador Responsável



IMPRESSÃO  
DACTILOSCÓPICA

**APÊNDICE B****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA  
BIORREPOSITÓRIO**

O menor sob sua responsabilidade está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa intitulada: **MICROBIOTA ORAL E FUNGEMIA: ANÁLISE DA POSSÍVEL RELAÇÃO EM PACIENTES NEONATAIS E PEDIÁTRICOS INTERNADOS EM UTI**, que tem como objetivo conhecer quais espécies de fungos são mais encontradas na boca de pacientes infantis internados em ambiente hospitalar e verificar se estes fungos tem relação direta ou contribuem para uma infecção no sangue (fungemia) em recém-nascidos e crianças internadas em UTI.

Para este estudo os microrganismos isolados originais serão repicados em duplicata em tubos de ensaio com meio de cultura Ágar Sabouraud glicose 2% e serão armazenados no Laboratório de Biodiversidade em Saúde/Micologia do ILMD-Fiocruz.

Pedimos a sua autorização para a coleta, o armazenamento e a utilização das cepas fúngicas nesta pesquisa. A utilização do material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa, e estará armazenada durante um período de 05 (cinco) anos. Caso haja interesse na utilização em projetos futuros o Sr. (a) será consultado.

O (A) Sr. (a) será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar, podendo retirar, a qualquer momento, o seu consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório. A participação do (a) seu (sua) filho (a) é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou prejuízo no tratamento para o menor.

Qualquer outro projeto que venhamos a executar com alguma amostra já coletada do (a) menor, que seja diferente do objetivo do estudo aqui esclarecido, será submetido um novo projeto de pesquisa para ser analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, além de ser solicitado a você um novo termo de consentimento, antes que o estudo seja iniciado.

O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo e privacidade, sendo que os dados, materiais e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos e após esse tempo serão destruídos. O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo, conforme a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria

Responsável legal \_\_\_\_\_

Pesquisador \_\_\_\_\_

2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em DUAS vias, sendo que uma será arquivada pela pesquisadora Thais Moreira Gama, no **Instituto Leônidas e Maria Deane - Fundação Oswaldo Cruz, localizada Rua Teresina, 476, Adrianópolis, Manaus/AM, pelo telefone (92) 3621-2333 ou e-mail: projetomicobiota@gmail.com** e a outra será fornecida a (o) Sr. (a).

### Consentimento Pós-Informação

Eu, \_\_\_\_\_, portador(a) do documento de identidade \_\_\_\_\_ fui informado sobre o que a pesquisadora quer fazer e porque precisa da colaboração do(a) meu(minha) filho(a), e entendi a explicação. Por isso, eu concordo na participação do(a) meu(minha) filho(a) no projeto, sabendo que ele(a) não vai ganhar nada e que poderá sair quando quiser. Este documento (TCLE) será elaborado em duas VIAS, que serão rubricadas em todas as suas páginas, exceto a com as assinaturas, e assinadas ao seu término por mim e pelo pesquisador responsável, ficando uma via com cada um.

### Menor Participante

Nome: \_\_\_\_\_

Manaus, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Responsável Legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador Responsável



IMPRESSÃO  
DACTILOSCÓPICA

**APÊNDICE C****FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS – DADOS DEMOGRÁFICOS E  
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS****Registro:** \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_

Gênero: ( ) Feminino ( ) Masculino

Naturalidade: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_

Tipo de instituição ( ) Maternidade ( ) Hospital

Setor: ( ) UTI neonatal ( ) UTI pediátrica

Data da internação: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Motivo da internação: \_\_\_\_\_

Período de internação hospitalar antes da candidemia: \_\_\_\_\_

Comorbidades subjacentes: ( ) Prematuridade ( ) Câncer ( ) Doença cardíaca  
( ) Doença pulmonar ( ) Doença Neurológica ( ) Transplante ( ) Insuficiência renal  
aguda e crônica ( ) Neutropenia Outro: \_\_\_\_\_

Uso de antibióticos: ( ) Sim ( ) Não Se sim, qual: \_\_\_\_\_

Cirurgia nos últimos 30 dias: ( ) Sim ( ) Não Se sim, qual: \_\_\_\_\_

Manifestações clínicas orais: \_\_\_\_\_

Evolução: Alta ( ) Óbito ( )

Uso de dispositivos médicos-terapêuticos:

1. Cateter venoso central ( ) Sim ( ) Não
2. Nutrição Parenteral: ( ) Sim ( ) Não
3. Ventilação Mecânica: ( ) Sim ( ) Não
4. Intubação: ( ) Sim ( ) Não

## APÊNDICE D

### PLANO DE PREVENÇÃO À COVID-19 PARA PESQUISA DE CAMPO

A entrada da pesquisadora nas Unidades de Terapia Intensiva – UTI neonatal e pediátrica deu-se mediante autorização prévia dos diretores responsáveis pelas unidades de saúde selecionadas para o estudo. A pesquisadora foi testada para a Covid-19 e utilizou equipamentos de proteção individual (gorro, máscara, jaleco, luva e propé) tomando todos os cuidados necessários para prevenção e proteção contra o novo coronavírus. Os responsáveis legais pelos participantes da pesquisa receberam um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), onde foram orientados sobre os objetivos do estudo, riscos e benefícios e convidados a participar, sendo obtido o consentimento por escrito (Apêndice A).

## ANEXO A

UFAM - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO GETÚLIO  
VARGAS



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** MICROBIOTA ORAL E FUNGEMIA: ANÁLISE DA POSSÍVEL RELAÇÃO EM PACIENTES NEONATAIS E PEDIÁTRICOS INTERNADOS EM UTI.

**Pesquisador:** THAIS MOREIRA GAMA

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 47110821.2.0000.9167

**Instituição Proponente:** CENTRO DE PESQUISAS LEONIDAS E MARIA DEANE - FUNDACAO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio  
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 4.789.793

**Apresentação do Projeto:**

De acordo com o arquivo apresentado PB\_INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO\_1514387, gerado em 08/06/2021 18:54:39, o protocolo de pesquisa apresenta os seguintes elementos a seguir descritos:

**Resumo:**

Este trabalho tem como objetivo verificar a relação da microbiota presente na cavidade oral de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) e Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica (UTI-Ped) de Maternidades e Hospitais Infantis (Públicos e Privado), localizados em Manaus, associada à ocorrência de fungemia. Para tanto, serão feitas coletas durante um período de 04 meses, conforme os critérios do Ministério da Saúde, em todos os pacientes neonatais (04 primeiras semanas de vida, ou até 28º dia) e pediátricos (a partir do 29º dia após o nascimento até 12 anos) que derem entrada em UTI neonatal e pediátrica. Serão utilizadas amostras coletadas na Maternidade Dona Lindú, Hospital e Pronto Socorro da criança Zona Oeste, Hospital e Pronto Socorro da criança Zona Sul, Hospital e Pronto-Socorro da Criança da Zona Leste e Instituto de Saúde da Criança do Amazonas (ICAM) e Hospital Maternidade Unimed. No estudo serão utilizados os espécimes fúngicos da mucosa oral através de uma coleta por swab. Para observar e correlacionar os genótipos de leveduras da cavidade oral e corrente sanguínea, através da técnica molecular de Multilocus Sequence Typing (MLST), serão manuseadas as cepas de

**Endereço:** Rua Tomás de Vila Nova, 04  
**Bairro:** PRAÇA 14 DE JANEIRO **CEP:** 69.020-170  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3305-4707 **E-mail:** cep.hugv@ebserh.gov.br

UFAM - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO GETÚLIO  
VARGAS



Continuação do Parecer: 4.789.793

Candida previamente isoladas das coletas da cavidade oral e de hemocultura, sendo este um procedimento realizado por um laboratório terceirizado proveniente das Unidades Hospitalares estudada. Informações sobre os pacientes serão levantados junto ao SAME de cada uma das unidades para que possa ser levantado o perfil epidemiológico. Portanto, esta pesquisa apresenta como proposta a compreensão desta possível relação, a fim de subsidiar conhecimento sobre a problemática. Além de contribuir para qualidade da atenção à saúde e com a perspectiva da importância de equipes multidisciplinares, com ênfase em medidas preventivas para o controle e monitoramento da cavidade oral que levem para a diminuição da mortalidade em UTI neonatal e pediátrica.

Hipótese: Espécies fúngicas encontradas na cavidade oral de recém-nascidos e crianças hospitalizadas em Unidades de Terapia Intensiva, contribuem para o acometimento de fungemia?

**Metodologia Proposta:**

A pesquisa será realizada em duas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) de Maternidades (sendo uma pública e outra privada) e cinco Unidades de Terapia Intensiva Pediátrica (UTI-Ped) de Hospitais Infantis/Maternidade (sendo quatro públicas e uma privada), localizados na cidade de Manaus/Amazonas. A coleta será realizada durante um período de 04 meses, conforme os critérios do Ministério da Saúde, em todos os pacientes neonatais (04 primeiras semanas de vida, ou até 28º dia) e pediátricos (a partir do 29º dia após o nascimento até 12 anos) que derem entrada em UTI neonatal e pediátrica, respectivamente, nas unidades hospitalares envolvidas no estudo. Os dados epidemiológicos serão levantados junto ao Serviço de Arquivo Médico e Estatísticas (SAME) de cada uma das Unidades participantes do estudo, conforme autorização para utilização dos mesmos. Tais autorizações serão fornecidas tanto pela Secretaria Estadual de Saúde, e Diretores de cada uma das Unidades.

Para caracterizar o perfil epidemiológico e clínico de pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal e Pediátrica, as informações clínicas serão extraídas de prontuários médicos e incluirão: idade, gênero, naturalidade, tipo de instituição, setor, motivo da internação, período de internação hospitalar antes da candidemia, doenças subjacentes, cirurgia nos últimos 30 dias, presença de um cateter intravenoso ou qualquer outro dispositivo artificial no momento da candidemia, manifestação clínica oral (placas esbranquiçadas, áreas eritematosas, úlceras) e evolução (alta ou óbito). Os responsáveis dos pacientes encaminhados a UTI neonatal ou UTI

Endereço: Rua Tomás de Vila Nova, 04  
Bairro: PRAÇA 14 DE JANEIRO CEP: 69.020-170  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)3305-4707 E-mail: cep.hugv@ebsem.gov.br

UFAM - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO GETÚLIO  
VARGAS



Continuação do Parecer: 4.789.793

pediátrica, serão abordados pela Comissão de Controle de Infecção Hospitalar da unidade, juntamente com o pesquisador, a fim de obter autorização para as coletas na cavidade bucal e permissão para uso dos fungos isolados do paciente durante o período de internação na UTI para os estudos de caracterização dos mesmos, através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). No estudo serão utilizados os fungos da mucosa bucal para determinar os microrganismos residentes. Os pacientes serão acompanhados enquanto estiverem internados em UTI para observar a suspeita de fungemia. Caso ocorra, a coleta será feita pelo laboratório terceirizado conforme procedimento de rotina da unidade hospitalar. Para observar e correlacionar os genótipos de leveduras da cavidade oral e corrente sanguínea, através da técnica molecular de Multilocus Sequence Typing (MLST), serão manuseadas as cepas de *Candida* previamente isoladas das coletas da cavidade oral e de hemocultura. Será realizada uma coleta inicial em cavidade oral - antes da equipe de assistência hospitalar efetivar profilaxia com digluconato de clorexidina 0,12% - em áreas e mucosa jugal, língua e palato duro. As amostras de sangue serão coletadas a partir de um vaso sanguíneo periférico, em pacientes que apresentarem sinais e sintomas clínicos de sepse, somado a suspeita de fungemia clínica pela equipe médica, visto que estes procedimentos serão realizados pelos enfermeiros. Conforme a hemocultura destes pacientes seja positiva para espécie *Candida*, o pesquisador retornará a UTI neonatal ou UTI pediátrica e realizará uma segunda coleta em mucosa oral com swab estéril, para observar possíveis alterações da microbiota bucal. Para realização da genotipagem pela técnica MLST, será necessário que o paciente apresente hemocultura positiva para *Candida* e tenha sido submetido a duas coletas em mucosa oral. Com a finalidade de correlacionar os genótipos de *Candida* encontradas na cavidade oral com as isoladas da corrente sanguínea, as cepas serão sequenciadas e analisados 7 genes (*Candida Albicans*) e 8 genes (*Candida tropicalis*), desta forma será possível realizar inferências sobre o nível de estirpe.

**Metodologia de Análise de Dados:** Os dados apurados serão registrados em uma planilha de coleta desenvolvida no programa Microsoft Excel®, contendo as variáveis a serem estudadas. Posteriormente serão analisados no programa R x 6.43.1.1. Statistics. As distribuições de frequências das características clínicas e epidemiológicas dos casos de candidemia serão apresentadas na forma de Tabelas, uma vez que o nível de significância utilizado em todas as análises será de 0,05. A análise laboratorial irá ocorrer no Laboratório de Biodiversidade em Saúde/Micologia do ILMD-Fiocruz, os espécimes da cavidade oral serão cultivados e analisados a olho nu, a considerar a morfologia e pigmentação das colônias. E para análise da genotipagem

Endereço: Rua Tomás de Vila Nova, 04  
Bairro: PRAÇA 14 DE JANEIRO CEP: 69.020-170  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)3305-4707 E-mail: cep.hugv@ebserm.gov.br

UFAM - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO GETÚLIO  
VARGAS



Continuação do Parecer: 4.789.793

será utilizada a técnica de sequência Multilocus (MLST), onde ocorrerá a extração de DNA, ampliação dos genes pela PCR, sequenciamento dos 07 genes (*Candida albicans*) e 06 genes (*Candida tropicalis*) escolhidos e posteriormente as sequências serão copiadas e adicionadas ao site oficial do MLST (<https://pubmlst.org/calbicans/>) e (<http://pubmlst.org/ctropicalis/>) onde haverá a possibilidade de introduzir a sequência de um determinado gene por vez, para cada isolado. A finalidade é comparar com a base de dados do MLST via internet, o qual fornecerá o número do genótipo encontrado entre os diferentes alelos depositados.

**Desfecho Primário:** Estima-se encontrar associação entre espécies de *Candida* (*Candida albicans* e *Candida tropicalis*) da cavidade oral e corrente sanguínea em casos de fungemia, sendo confirmado pela técnica de sequência Multilocus, ao verificar genótipos similares, além de conhecer o perfil epidemiológico/clínico de pacientes infantis internados nas UTIs neonatais e pediátricas de Manaus e identificar as espécies fúngicas que residem na cavidade oral de pacientes internados em UTI.

**Hipótese:** Espécies fúngicas encontradas na cavidade oral de recém-nascidos e crianças hospitalizadas em Unidades de Terapia Intensiva, contribuem para o acometimento de fungemia?

**Objetivo Primário:** Verificar a relação da microbiota presente na cavidade oral de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva neonatal e pediátrica de Maternidades e Hospitais Infantis Públicos/Privado de Manaus e a ocorrência de fungemia.

**Objetivos Secundários:** Caracterizar o perfil epidemiológico/clínico de recém-nascidos e crianças internadas em UTI e determinar a microbiota presente na cavidade oral; Determinar os genótipos das espécies de *Candida* isoladas da cavidade oral e corrente sanguínea de pacientes que apresentarem candidemia; Correlacionar as espécies de *Candida* ou outras espécies de fungos encontradas na cavidade oral com as isoladas da corrente sanguínea.

**Crítérios de Inclusão:** Os pacientes serão incluídos no estudo mediante os seguintes critérios: Aceite dos familiares ou responsáveis legais em participar da pesquisa mediante a concordância do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE); paciente deverá estar internado em Unidade de Terapia Intensiva neonatal e pediátrica, apresentar faixa etária de até 12 anos. E um mesmo paciente será considerado como novo caso quando houver uma nova hemocultura positiva após 30 dias do primeiro caso detectado.

Endereço: Rua Tomás de Vila Nova, 04	CEP: 69.020-170
Bairro: PRAÇA 14 DE JANEIRO	
UF: AM	Município: MANAUS
Telefone: (92)3305-4707	E-mail: cep.hugv@ebserh.gov.br

UFAM - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO GETÚLIO  
VARGAS



Continuação do Parecer: 4.789.793

**Critério de Exclusão:** Serão excluídos do presente estudo: Pacientes que estejam impossibilitados de realizarem a coleta oral e amostras cujas cepas causadoras de candidemia perderem a viabilidade de crescimento em laboratório.

**Objetivo da Pesquisa:**

De acordo com o arquivo apresentado PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1514387, gerado em 08/06/2021 18:54:39, o protocolo de pesquisa apresenta os seguintes elementos a seguir descritos:

**Objetivo Primário:**

Verificar a relação da microbiota presente na cavidade oral de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva neonatal e pediátrica de Maternidades e Hospitais Infantis Públicos/Privado de Manaus e a ocorrência de fungemia.

**Objetivo Secundário:**

Caracterizar o perfil epidemiológico/clínico de recém-nascidos e crianças internadas em UTI e determinar a microbiota presente na cavidade oral.

Determinar os genótipos das espécies de Candida isoladas da cavidade oral e corrente sanguínea de pacientes que apresentarem candidemia;

Correlacionar as espécies de Candida ou outras espécies de fungos encontradas na cavidade oral com as isoladas da corrente sanguínea.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

De acordo com o arquivo apresentado PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1514387, gerado em 08/06/2021 18:54:39, o protocolo de pesquisa apresenta os seguintes elementos a seguir descritos:

**Riscos:**

Neste estudo está previsto o contato com pacientes neonatais e pediátricos internados em UTI para realizar uma coleta na cavidade oral com swab antes da realização da profilaxia que será efetuada pela equipe hospitalar. Após esse contato, somente haverá outro, caso esse paciente apresente uma fungemia. Esse novo contato será para realizar outra coleta na cavidade oral. A pesquisadora não terá nenhuma participação na coleta de sangue para a hemocultura, sendo essa

Endereço: Rua Tomás de Vila Nova, 04  
 Bairro: PRAÇA 14 DE JANEIRO CEP: 69.020-170  
 UF: AM Município: MANAUS  
 Telefone: (92)3305-4707 E-mail: cep.hugv@ebserm.gov.br

UFAM - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO GETÚLIO  
VARGAS



Continuação do Parecer: 4.789.793

feita conforme a rotina do hospital. O paciente só será incluído na pesquisa após o responsável ser convidado e esclarecido sobre o projeto e se aceitar participar na pesquisa com a assinatura do TCLE. Para minimizar os possíveis riscos que

podem estar presentes durante a realização do trabalho os seguintes procedimentos serão adotados: a pesquisadora somente acessará a UTI na presença de um profissional da equipe da UTI e seguirá os protocolos para acesso da UTI das unidades hospitalares envolvidas no estudo, onde estão incluídos a lavagem rigorosa das mãos, uso de máscara, luvas, jaleco, gorro, pro-pé. A coleta será com swab estéril e realizada pela própria pesquisadora que é cirurgiã dentista e treinada para este tipo de procedimento que estará atenta para realizar o procedimento da forma mais cuidadosa e ágil possível a fim de minimizar o desconforto do paciente. Para a coleta de dados dos pacientes a pesquisadora já fez treinamento para garantir a privacidade e sigilo das informações do paciente. E, qualquer risco não previsto decorrente da participação na pesquisa será minimizado pelo pesquisador.

**Benefícios:**

Os procedimentos apresentados serão necessários para determinar se há associação entre a microbiota oral e a fungemia desenvolvida. Há evidências ainda insuficientes para comprovar uma possível contribuição ou evolução para a ocorrência da doença. Com os dados obtidos, espera-se confirmar essa hipótese e assim contribuir com uma melhor qualidade da atenção à saúde que leve a diminuição da mortalidade em UTI neonatal e pediátrica.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Protocolo de pesquisa apresentando em sua segunda submissão (versão 2) Relativo a um estudo longitudinal, observacional e descritivo. Os participantes desta pesquisa serão pacientes neonatais e pediátricos internados em Unidades de Terapia Intensiva de Maternidades e Hospitais Público/Privado localizados na cidade de Manaus, enquanto as amostras serão

constituídas por fungos da cavidade oral e leveduras do gênero *Candida* encontradas em hemoculturas positivas. Será realizado um levantamento de dados em prontuários médicos, a fim de caracterizar o perfil clínico/epidemiológico destes pacientes, coleta por meio de swab para identificar os microrganismos fúngicos pertencentes a mucosa oral e para determinar, correlacionar os genótipos de leveduras da cavidade oral e corrente

sanguínea de pacientes com fungemia, através da técnica molecular de Multilocus Sequence Typing (MLST), serão manuseadas as cepas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Identificada no arquivo do termo de responsabilidade Thais Moreira Gama, pesquisadora responsável pelo projeto intitulado "Microbiota oral e fungemia: Análise da possível relação em pacientes neonatais e

Endereço: Rua Tomás de Vila Nova, 04  
Bairro: PRAÇA 14 DE JANEIRO CEP: 69.020-170  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)3305-4707 E-mail: cep.hugv@ebserm.gov.br

UFAM - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO GETÚLIO  
VARGAS



Continuação do Parecer: 4.789.793

pediátricos internados em UTI\* sob orientação da pesquisadora Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura declaro estar ciente e que cumprirei os termos da Resolução 466/12 de 12/12/2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde e declaro: (a) assumir o compromisso de zelar pela privacidade e sigilo das informações; (b) tornar os resultados desta pesquisa públicos sejam eles favoráveis ou não; e (c) comunicar o Comitê de Ética em Pesquisa e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa sobre qualquer alteração no projeto de pesquisa, nos relatórios

anuais ou através de comunicação protocolada, que me forem solicitadas; (d) utilizar os materiais e as informações obtidas no desenvolvimento deste trabalho apenas para fins de pesquisa e para atingir seus objetivos.

De acordo com arquivo PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1514387, gerado em 08/06/2021 18:54:39, temos as seguintes informações sobre a pesquisa:

Acesso a dados de prontuários: Sim.

Número estimado de participantes: prontuários de 200 pacientes.

Critérios de inclusão: adequado.

Critérios de exclusão: adequado.

Recrutamento dos participantes: não se aplica a este protocolo

Riscos: VER PENDÊNCIAS NO TCLE DOS RESPONSÁVEIS E TCLE BIORREPOSITÓRIO

Equipe de pesquisadores: adequada.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

DE ACORDO COM O ARQUIVO CARTA RESPOSTA ENVIADO EM 08/08/2021 18:47:01

RESPOSTA DE PENDÊNCIAS

PENDÊNCIA 1. TCLE para o responsável legal - inadequado (identificação incompleta do responsável)

RESPOSTA: Realizamos a alteração no TCLE para o responsável legal e adicionamos no consentimento pós-informação o nome completo do responsável e o número do documento de identidade. As alterações estão destacadas em vermelho no arquivo em anexo TCLE\_RESPONSÁVEIS\_LEGALIS\_v2.

Endereço: Rua Tomás de Vila Nova, 04  
Bairro: PRAÇA 14 DE JANEIRO CEP: 69.020-170  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)3305-4707 E-mail: cep.hugv@ebsem.gov.br

UFAM - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO GETÚLIO  
VARGAS



Continuação do Parecer: 4.789.793

**PENDÊNCIA 2. TCLE biorrepositório (consentimento pós informação) - Declaração de Manuseio Material Biológico /Biorrepositório / Biobanco: inadequado (identificação incompleta do responsável e indevida autorização prévia para uso em projetos futuros)**

**RESPOSTA:** Acrescentamos no TCLE Biorrepositório, o nome completo e o número do documento de identidade do responsável no consentimento pós-informação. Retiramos a opção de autorização prévia para uso em projetos futuros, conforme solicitado, e adicionamos no texto um parágrafo com orientações sobre a utilização futura da amostra armazenada. As alterações estão destacadas em vermelho no arquivo em anexo TCLE\_BIORREPOSITORIO\_v2.

**Recomendações:**

Considerando a CARTA RESPOSTA ENVIADO EM 08/06/2021 18:47:01

Considerando as adequações nos arquivos enviados em 08/06/2021 18:48:17 TCLE\_Responsáveis legais\_v2 e 08/06/2021 18:48:34 TCLE\_ Biorrepositório\_v2, adequando as solicitações do CEP, conforme descrito a seguir:

**1. Consentimento Pós-Informação**

Eu, \_\_\_\_\_, portador(a) do documento de identidade \_\_\_\_\_ fui informado sobre o que a pesquisadora quer fazer e porque precisa da colaboração do(a) meu(minha) filho(a), e entendi a explicação. Por isso, eu concordo na participação do(a) meu(minha) filho(a) no projeto, sabendo que ele(a) não vai ganhar nada e que poderá sair quando quiser. Este documento (TCLE) será elaborado em duas VIAS, que serão rubricadas em todas as suas páginas, exceto a com as assinaturas, e assinadas ao seu término por mim e pelo pesquisador responsável, ficando uma via com cada um.

Menor Participante

Nome: \_\_\_\_\_

**2. Pedimos a sua autorização para a coleta, o armazenamento e a utilização das cepas fúngicas nesta pesquisa. A utilização do material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa, e estará armazenada durante um período de 05 (cinco) anos. Caso haja interesse na**

Endereço: Rua Tomás de Vila Nova, 04  
Bairro: PRAÇA 14 DE JANEIRO CEP: 69.020-170  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)3305-4707 E-mail: cep.hugv@ebsem.gov.br

UFAM - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO GETÚLIO  
VARGAS



Continuação do Parecer: 4.789.793

utilização em projetos futuros o Sr. (a) será consultado.

Qualquer outro projeto que venhamos a executar com alguma amostra já coletada do (a) menor, que seja diferente do objetivo do estudo aqui esclarecido, será submetido um novo projeto de pesquisa para ser analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, além de ser solicitado a você um novo termo de consentimento, antes que o estudo seja iniciado.

Eu, \_\_\_\_\_, portador(a) do documento de identidade \_\_\_\_\_ fui informado sobre o que a pesquisadora quer fazer e porque precisa da colaboração do(a) meu(minha) filho(a), e entendi a explicação. Por isso, eu concordo na participação do(a) meu(minha) filho(a) no projeto, sabendo que ele(a) não vai ganhar nada e que poderá sair quando quiser. Este documento (TCLE) será elaborado em duas VIAS, que serão rubricadas em todas as suas páginas, exceto a com as assinaturas, e assinadas ao seu término por mim e pelo pesquisador responsável, ficando uma via com cada um.

Menor Participante

Nome: \_\_\_\_\_

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

**PENDÊNCIA 1.** TCLE para o responsável legal - adequado (identificação completa do responsável). Realizamos a alteração no TCLE para o responsável legal e adicionamos no consentimento pós-informação o nome completo do responsável e o número do documento de identidade. As alterações estão destacadas em vermelho no arquivo em anexo TCLE\_RESPONSAVEIS\_LEGAI5\_v2.

**PENDÊNCIA 2.** TCLE Biorrepositório (consentimento pós-informação) - Declaração de Manuseio Material Biológico/Biorrepositório/Biobanco: adequado (identificação completa do responsável e devida autorização prévia para uso em projetos futuros).

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Endereço: Rua Tomás de Vila Nova, 04  
Bairro: PRAÇA 14 DE JANEIRO CEP: 69.020-170  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)3305-4707 E-mail: cep.hugv@ebserm.gov.br

UFAM - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO GETÚLIO  
VARGAS



Continuação do Parecer: 4.789.793

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1514387.pdf	08/06/2021 18:54:39		Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA.doc	08/06/2021 18:47:01	THAIS MOREIRA GAMA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TCLE_BIORREPOSITORIO_v2.docx	08/06/2021 18:46:34	THAIS MOREIRA GAMA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_RESPONSAVEIS_LEGAIS_v2.docx	08/06/2021 18:46:17	THAIS MOREIRA GAMA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMO_DE_RESPONSABILIDADE_PESQUISADOR.pdf	12/05/2021 22:23:16	THAIS MOREIRA GAMA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DETALHADO.docx	12/05/2021 22:16:54	THAIS MOREIRA GAMA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DETALHADO.pdf	12/05/2021 22:16:36	THAIS MOREIRA GAMA	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	12/05/2021 22:15:12	THAIS MOREIRA GAMA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DECLARACAO_DE_INFRAESTRUTURA.pdf	12/05/2021 22:14:06	THAIS MOREIRA GAMA	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	12/05/2021 22:13:55	THAIS MOREIRA GAMA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	12/05/2021 22:13:37	THAIS MOREIRA GAMA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

MANAUS, 18 de Junho de 2021

Assinado por:  
PLÍNIO JOSÉ CAVALCANTE MONTEIRO  
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Tomás de Vila Nova, 04  
Bairro: PRAÇA 14 DE JANEIRO CEP: 69.020-170  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)3305-4707 E-mail: cep.hugv@ebserh.gov.br