



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Caracterização do Microbioma em Unidades de Cuidados
Intensivos**

Teresa Maria Silva do Nascimento

TESE PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS ESPECIALIDADE MICROBIOLOGIA

JULHO, 2025



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Caracterização do Microbioma em Unidades de Cuidados
Intensivos**

Autor: Teresa Maria Silva do Nascimento

Orientador: Prof. Doutora Maria Helena Sousa Barroso

Coorientadores: Prof. Doutor João Inácio e Professor Doutor Miguel Viveiros

Tese apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de
Doutor em Ciências Biomédicas, especialidade Microbiologia.

Copyright © em nome de Teresa Maria Silva do Nascimento, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.

O Instituto de Higiene e Medicina Tropical e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de cópias impressas ou em formato digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou a ser inventado e divulgar por meio de repositórios científicos e admitir sua cópia e distribuição com fins educacionais ou de pesquisa, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Produção Científica

Artigos Publicados (4)

- Nascimento T, Inácio J, Guerreiro D, Patrício P, Proença L, Toscano C, Diaz P, Barroso H. Enhancing ICU *Candida* spp. surveillance: a cost-effective approach focused on *Candida auris* detection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2024; 14:1463456. doi:10.3389/fcimb.2024.1463456.
- Nascimento T, Inácio J, Guerreiro D, Patrício P, Proença L, Toscano C, Diaz P, Barroso H. Susceptibility patterns of *Candida* spp. collected from intensive care units: a prospective study in 2020–2022. *Infect Prev Pract.* 2024;6(4):100403. doi: 10.1016/j.infpip.2024.100403.
- Nascimento T, Inácio J, Guerreiro D, Patrício P, Proença L, Toscano C, Diaz P, Barroso H. Insights into *Candida* colonization in intensive care unit patients: a prospective multicenter study. *J Fungi.* 2024;10(6):378. doi:10.3390/jof10060378.
- Nascimento T, Inácio J, Guerreiro D, Patrício P, Proença L, Toscano C, Barroso H. Can chlorhexidine gluconate baths reduce fungal colonisation in intensive care unit patients? *Antimicrob Resist Infect Control.* 2025; 14:87. doi: 10.1186/s13756-025-01606-6.

Artigos submetidos (1)

- Nascimento T, Inácio J, Guerreiro D, Patrício P, Proença L, Toscano C, Barroso H. The intensive care unit mycobiome map: fungal insights from axillary and groin skin swabs. Submetido para publicação à revista *Microbiol Spectr.* 2024.

O trabalho desenvolvido durante esta tese foi apresentado em comunicações orais e em painel em conferências internacionais:

Comunicação oral

- Nascimento T, Inácio J, Ferreira I, Diaz P, Freitas P, Barroso H. Mannitol Salt Agar Auris: a useful medium for differentiating *Candida auris*. Apresentado em: 31st European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (ECCMID); 2021 Jul 9–12; Paris, France.

Comunicações em painel

- Nascimento T, Inácio J, Guerreiro D, Patrício P, Diaz P, Toscano C, Carvalho D, Faria I, Barroso H. Identification and characterization of cryptic species of *Candida* isolated from ICU patients. Apresentado em: Trends in Medical Mycology; 2023 Oct 20–23; Athens, Greece.
- Nascimento T, Inácio J, Guerreiro D, Patrício P, Diaz P, Toscano C, Faria I, Barroso H. Susceptibility patterns of *Candida* spp. collected from intensive care units: a prospective study in 2020–2022. Apresentado em: 6th International Congress of CiiEM—Immediate and Future Challenges to Foster One Health; 2023 Jul 5–7; Almada, Portugal. Med Sci Forum. 2023;22(1):45. doi:10.3390/msf2023022045.
- Nascimento T, Inácio J, Guerreiro D, Patrício P, Diaz P, Toscano C, Faria I, Barroso H. Identification procedures of yeast species recovered from Portuguese intensive care units. Apresentado em: 6th International Congress of CiiEM—Immediate and Future Challenges to Foster One Health; 2023 Jul 5–7; Almada, Portugal. Med Sci Forum. 2023;22(1):35. doi:10.3390/msf2023022035.
- Nascimento T, Inácio J, Guerreiro D, Patrício P, Diaz P, Toscano C, Faria I, Barroso H. Identification and antifungal patterns of cryptic species of *Candida* isolated from ICU patients. Apresentado em: 6th International Congress of CiiEM—Immediate and Future Challenges to Foster One Health; 2023 Jul 5–7; Almada, Portugal.

- Nascimento T, Patrício P, Proença L, Guerreiro D, Barroso H. The impact of chlorhexidine gluconate baths on *Candida* colonization in intensive care units. Apresentado em: 33rd European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (ECCMID); 2023 Apr 27–29; Copenhagen, Denmark.
- Jorge R, Carvalho A, Fernandes A, Patrício J, Nascimento T, Patrício P. *Candida* colonization and mortality in an ICU: is *Candida* colonization a poor prognosis factor in the critical patient? Apresentado em: 42nd International Symposium on Intensive Care & Emergency Medicine. 2023 March 21–24; Brussels, Belgium. Crit Care. 2023; 27:119.
- Nascimento T, Inácio J, Diaz P, Patrício P, Toscano C, Faria I, Barroso H. Surveillance of ICU patients for *Candida* colonisation in tertiary hospitals in suburban Lisbon, Portugal. Apresentado em: 32nd European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (ECCMID); 2022 Apr 23–26; Lisbon, Portugal.
- Nascimento T, Inácio J, Ferreira I, Diaz P, Freitas P, Barroso H. *Candida* spp. colonization among intensive care unit patients: preliminary results. Apresentado em: The 5th International Congress of CiiEM—Reducing inequalities in Health and Society 2021 Jun 16–18; Almada, Portugal. Med Sci Forum. 2021;5(1):14. doi:10.3390/msf2021005014.

“The future belongs to those who believe in the beauty of their dreams.”

Eleanor Roosevelt

À minha Mãe

Agradecimentos

A conclusão desta tese de doutoramento representa não apenas o culminar de anos de pesquisa e dedicação, mas também a colaboração, apoio e incentivo de muitas pessoas às quais devo imensa gratidão.

Primeiramente, gostaria de expressar a minha profunda gratidão à minha orientadora, Prof. Doutora Helena Barroso, cuja orientação, paciência e sabedoria foram fundamentais ao longo deste percurso. As suas críticas construtivas e sugestões valiosas enriqueceram este trabalho e contribuíram significativamente para o meu crescimento académico e pessoal. Muito obrigada pela amizade ao longo de todo o percurso.

Agradeço ao meu coorientador, Prof. Doutor João Inácio, pela forma diplomática com que sempre me sensibilizou, pela paciência e tempo dedicado à revisão deste trabalho.

Agradeço também aos membros da minha comissão tutorial, Professor Doutor Nuno Taveira, Prof. Doutora Paula Sampaio e Professor Doutor Miguel Viveiros pelas suas contribuições críticas e sugestões. A sua experiência e conhecimento foram essenciais para a melhoria deste trabalho.

Quero também agradecer à Professora Doutora Graciete Freitas por toda a motivação que sempre me transmitiu para a área científica da Micologia ao longo de várias décadas. Foi e será sempre a minha mãe profissional.

Aos meus colegas e amigos da Egas Moniz, agradeço o apoio incondicional, as discussões frutíferas e a camaradagem ao longo destes anos. Em particular, gostaria de mencionar a Guilhermina e a Alexandra pela amizade, pelas ideias partilhadas e pela ajuda nos momentos de dificuldade. Ao Prof. Doutor Luís Proença por toda a ajuda com o tratamento estatístico.

Gostaria de expressar a minha profunda gratidão às minhas colegas e amigas Cristina e Dinah pelo apoio inestimável e pela partilha de conhecimentos na área da micologia médica.

À equipa de apoio aos laboratórios da Egas Moniz muito agradeço o vosso apoio total. Desde a paciência da Susana ao ouvir as minhas ideias sobre a elaboração de diferentes meios, à Natacha sempre sorridente e disponível para me ouvir e tirar fotografias, à Daniela Rente a preparar os meios de cultura experimentais e à Daniela Guerreiro que me ajudou muito nos diferentes protocolos experimentais e nunca se cansou da intensa produção fotográfica.

Agradeço à Egas Moniz School of Health & Science e ao Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa pelo suporte institucional e pelas oportunidades de desenvolvimento proporcionadas. Reconheço também o apoio financeiro recebido de Centro de investigação interdisciplinar Egas Moniz que viabilizou a realização deste estudo.

Às minhas amigas de sempre, Carla, São, João, Rosa, Liliana, Sílvia, Marta e Gisela que me ouvem há décadas falar de temas completamente desconhecidos com uma amizade incondicional.

À minha família, expresso a minha eterna gratidão pelo amor, compreensão e apoio contínuo. Aos meus pais, pela educação e valores que me transmitiram, e pelo encorajamento constante em todas as etapas da minha vida. Ao Fernando, meu companheiro de uma vida, agradeço pela paciência, apoio emocional e incentivo inabalável, que foram essenciais para a superação dos desafios deste percurso. Ao Lourenço e à Matilde que nunca me deixaram desistir tendo sido uma ajuda preciosa.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Cada palavra de incentivo, cada gesto de apoio e cada conselho recebido foram fundamentais para a conclusão desta tese.

A todos, o meu sincero e profundo agradecimento.

Resumo

O microbioma é um componente importante do microbioma humano. Apesar da sua relevância tem sido pouco estudado, especialmente em doentes internados em unidades de cuidados intensivos (UCI). Neste contexto, este estudo prospetivo multicêntrico, realizado entre 2020 e 2022 em doentes em UCI na área metropolitana de Lisboa teve como objetivo avaliar a importância do ambiente nosocomial na colonização fúngica da pele, com especial enfoque no género *Candida* e particularmente *C. auris*. Mais especificamente, avaliar a dinâmica da colonização fúngica e os factores de risco associados tanto na admissão (D1) quanto ao longo do internamento, ao 5º (D5) e 8º dia (D8). A análise incluiu a caracterização do microbioma, os perfis de susceptibilidade aos principais antifúngicos utilizados na prática clínica e o impacto nos índices de sobrevivência.

De 675 doentes foram obtidos 988 exsudados combinados bilaterais das regiões intertriginosas axilar e inguinal, especificamente: 675, 203 e 110 amostras em D1, D5 e D8 respetivamente. A microbiota (n=371) foi identificada por métodos fenotípicos, MALDI-TOF MS e PCR, e verificou-se que o género *Candida* foi dominante (n=355). *C. albicans* foi a espécie mais prevalente (52,1%) seguida por *C. parapsilosis* (30,7%). Porém, identificou-se um desvio nesta coorte, de *C. albicans* para espécies de *Candida* não-*albicans*, dependente da unidade hospitalar ($p=0,011$). Os resultados evidenciaram a ausência de *C. auris* apesar da sua pesquisa por PCR em tempo real e métodos convencionais, aos quais se adicionou um meio de cultura seletivo, desenvolvido neste estudo, o *Manitol Salt Agar Auris*.

A colonização fúngica observada foi de 184/675 (27,3%), 87/203 (42,8%) e 58/110 (52,7%) no D1, D5 e D8, respetivamente. A dinâmica da colonização por *Candida* spp. foi significativamente associada ao tipo de UCI (*Odds Ratio* (OR)= 2,03, IC 95% 1,22-3,39, $p=0,007$), infeção respiratória (OR= 1,74, IC 95% 1,17-2,58, $p=0,006$), hemodiálise (OR = 2,19, IC 95% 1,17-4,10, $p=0,014$), COVID-19 (OR = 0,37, IC 95% 0,14-0,99, $p=0,048$) e a uma menor taxa de sobrevivência a 3 meses ($p=0,008$). O grau de colonização por *Candida* spp. foi elevado (superior a 100 UFC/mL) em 77,2% dos doentes.

O microbioma das amostras dos doentes em UCI (D1 e D8) obtido por metasequenciação evidenciou diversidade genética, com predomínio marcado do género *Candida*, mas sem associação significativa com o internamento na UCI ($p=0,499$).

Os perfis de susceptibilidade antifúngica *in vitro* para o fluconazol, voriconazol, anfotericina B e anidulafungina, foram obtidos através do método epsilométrico (Etest®) e mostraram que a resistência continua a ser pouco comum entre os isolados de *Candida* spp. nas UCI investigadas, sem alterações significativas ao longo do tempo de internamento ou entre unidades hospitalares.

Destaca-se deste estudo, a utilização da colonização da pele por *Candida* spp. como uma ferramenta de alerta precoce para informar sobre os factores de risco e índices de sobrevivência dos doentes em estado crítico. Perspetiva-se que o conhecimento da dinâmica do microbioma da pele em doentes internados em UCI seja fundamental para compreender as alterações associadas à colonização, bem como a possível infeção dos doentes.

Palavras-chave: microbioma, *Candida* spp., *Candida auris*, Unidade de Cuidados Intensivos, antifúngicos.

Abstract

The mycobiome is an important component of the human microbiome. Despite its significance, it has been under-researched, particularly in patients hospitalized in intensive care units (ICU).

In this context, this multicentre prospective study, carried out between 2020 and 2022 in patients admitted to ICUs in the Lisbon metropolitan area, aimed to assess the importance of the nosocomial environment in fungal colonisation of the skin, with a special focus on the *Candida* genus and particularly *C. auris*. Specifically, to assess the dynamics of fungal colonisation and its risk factors on admission (D1) and for the length of ICU stay, at day 5 (D5) and 8 (D8). The analysis included the characterization of the mycobiome, susceptibility profiles to the main antifungals drugs used in clinical practice, and the impact on survival rates.

From 675 patients, 988 bilateral combined axillary/inguinal swabs were collected, particularly, 675, 203 and 110 samples on D1, D5 and D8 respectively. The mycobiota (n=371) was identified by phenotypic methods, MALDI-TOF MS and PCR and it was found that *Candida* spp. was dominant (n=355). *C. albicans* was the most prevalent species (52.1%) followed by *C. parapsilosis*. However, a shift was identified in this cohort from *C. albicans* to non-*albicans* *Candida* species, depending on the hospital unit ($p=0.011$). The results showed the absence of *C. auris* despite its detection by real time PCR and culture-based methods, to which a selective culture medium developed in this study, Mannitol Salt Agar Auris, was added.

The fungal colonisation observed was 184/675 (27.3%), 87/203 (42.8%) and 58/110 (52.7%) on D1, D5 and D8, respectively. The dynamics of colonisation by *Candida* spp. was significantly associated with the type of ICU (odds ratio (OR) = 2.03, 95% CI 1.22-3.39, $p=0.007$), respiratory infection (OR = 1.74, 95% CI 1.17-2.58, $p=0.006$), haemodialysis (OR = 2.19, 95% CI 1.17-4.10, $p=0.014$), COVID-19 (OR = 0.37, 95% CI 0.14-0.99, $p=0.048$) and a lower survival rate at 3 months ($p=0.008$). The degree of colonisation by *Candida* spp. was high (>100 CFU/mL) in 77.2% of patients.

The mycobiome obtained by metasequencing patients in the ICU (D1 and D8) showed genetic diversity, with a marked predominance of the *Candida* spp., but no significant association with all length of ICU stay ($p=0.499$).

In vitro antifungal susceptibility profiles for fluconazole, voriconazole, amphotericin B and anidulafungin were obtained using the epsilometric method (Etest®) and showed that resistance continues to be uncommon among *Candida* spp. isolates in the ICUs investigated, with no significant changes over the length of stay or between hospital units. This study highlights the clinical investigation of skin colonisation by *Candida* spp. as an early warning tool to provide information on risk factors and survival rates in critically ill patients. Clarifying the dynamics of the skin mycobiome in ICU patients is anticipated to be fundamental in understanding the changes associated with colonization and the potential for patient infection.

Keywords: mycobiome, *Candida* spp., *Candida auris*, Intensive Care Unit, antifungals.

Índice Geral

PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	III
AGRADECIMENTOS.....	IX
RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
ÍNDICE GERAL	XV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XVIII
ÍNDICE DE TABELAS.....	XXI
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS OU ACRÓNIMOS.....	XXIII
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 INTRODUÇÃO	3
1.2 CONCEITO DE MICBIOTA E MICBIOMA.....	3
1.3 O GÉNERO <i>CANDIDA</i> NO MICBIOMA	12
1.3.1 FACTORES DE RISCO PARA INFEÇÃO POR <i>CANDIDA</i> SPP.	13
1.3.2 CANDIDEMIA E CANDIDOSE INVASIVA	16
1.3.3 ESPÉCIES CLINICAMENTE RELEVANTES	16
1.3.3.1 Complexo <i>Candida albicans</i>	18
1.3.3.2 Complexo <i>Candida glabrata</i> (atualmente <i>Nakaseomyces glabratus</i>).....	23
1.3.3.3 Complexo <i>Candida parapsilosis</i>	25
1.3.3.4 <i>Candida tropicalis</i>	26
1.3.3.5 <i>Candida krusei</i> (atualmente <i>Pichia kudriavzevii</i>)	27
1.3.3.6 <i>Candida lusitanae</i> (atualmente <i>Clavispora lusitanae</i>).....	28
1.3.3.7 Complexo <i>Candida guilliermondii</i> (atualmente <i>Meyerozyma guilliermondii</i>)	28
1.3.3.8 <i>Candida auris</i>	28
1.3.3.9 Outras espécies de <i>Candida</i> não- <i>albicans</i>	40
1.4 METODOLOGIAS APLICADAS AO ESTUDO DA MICBIOTA E DO MICBIOMA.....	41
1.4.1 Identificação dos complexos <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> e <i>C. parapsilosis</i>	45
1.4.2 Identificação de <i>C. auris</i>	47
1.5 SUSCEPTIBILIDADE ÀS MOLÉCULAS ANTIFÚNGICAS	52
1.5.1 Fármacos Antifúngicos.....	53
1.5.2 Mecanismos de resistência aos antifúngicos	55
1.5.3 Novos fármacos antifúngicos.....	59
1.5.4 Factores influenciadores da eficácia dos antifúngicos	62
1.5.5 Testes de susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antifúngicos.....	63
1.6 FUNDAMENTO DA TESE E OBJETIVOS.....	70
2. CARACTERIZAÇÃO DA MICBIOTA CUTÂNEA EM DOENTES DE UNIDADES DE CUIDADOS INTENSIVOS NOS HOSPITAIS TERCIÁRIOS DE LISBOA	73
2.1 INTRODUÇÃO	75
2.2 OBJETIVOS	77
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	77
2.3.1 Desenho do estudo.....	77
2.3.2 Fluxograma.....	82
2.3.3 Identificação dos isolados	83
2.3.4 Quantificação do crescimento	88
2.3.5 Análise estatística	88
2.4 RESULTADOS	89
2.4.1 Caracterização da amostra.....	89
2.4.2 Resultados das culturas de vigilância fúngica.....	89
2.4.3 Identificação dos isolados	90
2.4.4 Origem dos isolados de <i>Candida</i> spp.	94

2.4.5	Quantificação do crescimento	100
2.5	DISCUSSÃO	103
3.	PESQUISA DE <i>CANDIDA AURIS</i> NO MICOBIOMA DA PELE DE DOENTES EM UNIDADES DE CUIDADOS INTENSIVOS.....	111
3.1	INTRODUÇÃO	113
3.2	OBJETIVOS	115
3.3	MATERIAL E MÉTODOS	116
3.3.1	Amostra	116
3.3.2	Processamento da amostra.....	116
3.3.3	Rastreio de <i>C. auris</i> baseado em métodos culturais	117
3.3.4	Pesquisa de <i>C. auris</i> por PCR em tempo real.....	120
3.4	RESULTADOS	124
3.4.1	Deteção de isolados presuntivos de <i>C. auris</i>	124
3.4.2	Identificação de <i>C. auris</i> por PCR convencional	128
3.4.3	Pesquisa de <i>C. auris</i> de amostras de vigilância por qPCR.....	129
3.5	DISCUSSÃO	130
4.	COLONIZAÇÃO FÚNGICA EM DOENTES ADMITIDOS EM UNIDADES DE CUIDADOS INTENSIVOS NA REGIÃO METROPOLITANA DE LISBOA	139
4.1	INTRODUÇÃO	141
4.2	OBJETIVOS	142
4.3	MATERIAL E MÉTODOS	143
4.3.1	Características da coorte.....	143
4.3.2	Definições.....	144
4.3.3	Análise estatística	144
4.4	RESULTADOS	145
4.4.1	Características demográficas e clínicas dos doentes	145
4.4.2	Taxas de colonização	147
4.4.3	Factores demográficos e clínicos predisponentes de colonização fúngica.....	148
4.4.4	Dados demográficos e características clínicas dos doentes colonizados	152
4.4.5	Caracterização epidemiológica e clínica dos isolados de <i>Candida</i> spp.	153
4.4.6	Índice de sobrevivência dos doentes	157
4.5	DISCUSSÃO	158
5.	CARACTERIZAÇÃO DO MICOBIOMA DA PELE EM DOENTES INTERNADOS EM UNIDADES DE CUIDADOS INTENSIVOS.....	167
5.1	INTRODUÇÃO	169
5.2	OBJETIVOS	172
5.3	MATERIAL E MÉTODOS	172
5.3.1	Amostra	172
5.3.2	Fluxograma.....	173
5.4	RESULTADOS	178
5.4.1	Controlo de qualidade da amostra	178
5.4.2	Caracterização da coorte de doentes	179
5.4.3	Processamento dos dados de sequenciação	179
5.4.4	Identificação e anotação taxonómica	180
5.4.5	Micobiota vs Micobioma.....	186
5.4.6	Índices de diversidade alfa e beta nos grupos D1 e D8.....	188
5.4.7	Relação do microbioma com os factores de risco dos doentes em UCI.....	191
5.5	DISCUSSÃO	191
6.	PERFIS DE SUSCEPTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> AOS ANTIFÚNGICOS.....	197
6.1	INTRODUÇÃO	199
6.2	OBJETIVOS	201
6.3	MATERIAL E MÉTODOS	202
6.3.1	População e amostras de doentes	202
6.3.2	Isolados e meios de cultura	202

6.3.3	Antifúngicos e inóculo	203
6.3.4	Leitura e interpretação.....	203
6.3.5	Análise estatística	205
6.4	RESULTADOS	206
6.4.1	Perfis de susceptibilidade antifúngica dos isolados de <i>Candida</i> spp.	206
6.4.2	Integração dos perfis de susceptibilidade com os dados clínico epidemiológicos.....	211
6.5	DISCUSSÃO	215
7.	DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	225
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	235
9.	ANEXOS.....	267
9.1	DOCUMENTOS	269
9.1.1	ANEXO 1- CONSENTIMENTO INFORMADO	269
9.1.2	ANEXO 2- INQUÉRITO DE MONITORIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E CLÍNICA	272
9.1.3	ANEXO 3- AUTORIZAÇÕES DAS COMISSÕES DE ÉTICA	275
9.2	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	278
9.2.1	ANEXO 4- MEIOS DE CULTURA.....	278
9.2.2	ANEXO 5- MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA.....	280
9.2.3	ANEXO 6- PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DE DNA FÚNGICO.....	282
9.2.4	ANEXO 7- PESQUISA DE DNA DAS ESPÉCIES CRÍPTICAS DOS COMPLEXOS DE <i>C. ALBICANS</i> , <i>C. GLABRATA</i> E <i>C. PARAPSILOSIS</i> POR PCR MULTIPLEX	285
9.2.5	ANEXO 8- PESQUISA DE DNA DE <i>C. AURIS</i>	288
9.2.6	ANEXO 9- PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA EXTRAÇÃO, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DO DNA PARA SEQUENCIAÇÃO	291
9.2.7	ANEXO 10- PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE SEQUENCIAÇÃO DA REGIÃO ITS2 E ANÁLISE BIOINFORMÁTICA	292
9.2.8	ANEXO 11- DETERMINAÇÃO DOS PERFIS DE SUSCEPTIBILIDADE PELO E-TEST	295

Índice de Figuras

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
Figura 1.1. Sumário dos géneros fúngicos constituintes do microbioma associado ao hospedeiro saudável.	5
Figura 1.2. Sumário das diferentes comunidades fúngicas que influenciam a microbiota da pele, vagina, intestino e cavidade oral.	12
Figura 1.3. Interação entre <i>Candida</i> spp. e o hospedeiro humano. Destaca-se a transição de comensal para patogénico, influenciada por factores de virulência fúngica e factores de risco do hospedeiro	13
Figura 1.4. Distribuição global de <i>Candida auris</i> de 2009 a 2023 nos 6 continentes.	31
Figura 1.5. Colonização, factores de risco para infeção e manifestações clínicas de <i>Candida auris</i>	37
Figura 1.6. O cistrão ribossómico fúngico.	44
Figura 1.7. Observação macroscópica das colónias de <i>Candida auris</i> dos <i>clades</i> I, II, III e IV, após 48 horas de incubação a 37°C em CHROMagar Candida.	47
Figura 1.8. Aspeto das colónias de <i>Candida auris</i> dos quatro <i>clades</i> descritos no CHROMagar TM Candida Plus após 48 h de incubação a 35 °C.	48
Figura 1.9. Observação microscópica de <i>Candida auris</i> numa preparação com azul de lactofenol após 72h de incubação a 37°C.	49
Figura 1.10. Métodos disponíveis para o isolamento e identificação de <i>Candida auris</i>	51
Figura 1.11 Representação da estrutura da parede, membrana celular e síntese de DNA/RNA de <i>Candida</i> spp., destacando as classes de fármacos antifúngicos e os seus mecanismos de ação.	53
Figura 1.12. Principais mecanismos de aquisição de resistência e/ou tolerância a fármacos antifúngicos nos principais agentes patogénicos fúngicos humanos.	56
Figura 1.13. Factores que influenciam a contribuição da resistência antifúngica para o insucesso clínico.	62
2. CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA CUTÂNEA EM DOENTES DE UNIDADES DE CUIDADOS INTENSIVOS NOS HOSPITAIS TERCIÁRIOS DE LISBOA	73
Figura 2.1. Sinopse do estudo observacional para a caracterização do microbioma em unidades de cuidados intensivos.	78
Figura 2.2. Sinopse do esquema de colheita de amostras biológicas nas diferentes UCI: UCIP e UCICRE do HFF e HBA.	79
Figura 2.3. Descrição do protocolo de colheita realizado pelos profissionais de saúde nas unidades hospitalares.	81
Figura 2.4. Protocolo para o rastreio micológico dos exsudados axilares e inguinais em unidades de cuidados intensivos.	84
Figura 2.5. Fluxograma do procedimento experimental para a análise por MALDI-TOF MS®.	85
Figura 2.6. Etapas do protocolo de PCR multiplex utilizado para a identificação de espécies crípticas dos complexos <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. glabrata</i>	87
Figura 2.7. Distribuição global e por unidade hospitalar das amostras positivas para fungos.	89
Figura 2.8. Identificação presumtiva de espécies de <i>Candida</i> em culturas mistas no meio CHROMagar Candida®.	90
Figura 2.9. Comparação das metodologias microbiológicas fenotípicas bioquímicas e proteómicas (MALDI-TOF MS) na identificação dos isolados fúngicos.	91
Figura 2.10. Diversidade dos isolados fúngicos (n=371) por género (a) e espécie (b).	92
Figura 2.11. Perfis eletroforéticos dos padrões de bandas obtidos a partir dos produtos de PCR.	93
Figura 2.12. Resultados comparativos (%) entre as diferentes metodologias utilizadas na identificação das espécies fúngicas (testes fenotípicos, MALDI-TOF MS e PCR).	94
Figura 2.13. Distribuição dos isolados de <i>C. albicans</i> vs. não- <i>albicans</i> . (a) no geral, (b) por unidade hospitalar e (c) por dia de colheita: admissão (D1) e ao 5º (D5) e 8º (D8) dia de internamento.	95
Figura 2.14. Distribuição dos isolados de <i>C. albicans</i> vs. não- <i>albicans</i> por UCI nos diferentes dias de colheita (D1, D5 e D8).	96
Figura 2.15. Distribuição dos isolados de <i>Candida</i> spp. por UCI entre os anos de 2020-2022.	96
Figura 2.16. Distribuição das espécies de <i>Candida</i> na admissão à UCI e durante o internamento.	99
Figura 2.17. Distribuição das espécies fúngicas em culturas mistas durante o período de recolha na UCI (D1, D5 e D8). Outros inclui os isolados de fungos leveduriformes não <i>Candida</i>	99

Figura 2.18. Distribuição da densidade do crescimento fúngico (UFC/mL) em UCI: (a) global e (b) na admissão (D1) e durante o internamento ao 5º e 8º dia (D5 e D8).	101
3. PESQUISA DE <i>CANDIDA AURIS</i> NO MICOBIOMA DA PELE DE DOENTES EM UNIDADES DE CUIDADOS INTENSIVOS.....	111
Figura 3.1. Fluxograma utilizado no rastreio de <i>Candida auris</i> .	116
Figura 3.2. Conceção do meio de cultura seletivo, <i>Manitol Salt Agar Auris</i> (MSAA) com base nas características fisiológicas de <i>C. auris</i> .	117
Figura 3.3. Algoritmo de identificação molecular de <i>C. auris</i> a partir de isolados fúngicos.	119
Figura 3.4. Ensaio de PCR em tempo real para identificação de <i>C. auris</i> .	121
Figura 3.5. Observação do crescimento de amostras e controlos em meio MSAA.	125
Figura 3.6. Meio MSAA inoculado com estirpes de referência.	126
Figura 3.7. Placas de MSAA inoculadas por espalhamento a partir de suspensões com 10 ⁶ UFC/mL das estirpes controlo.	127
Figura 3.8. Observação do crescimento em meio MSAA (0,1 McFarland) 40°C/48h.	127
Figura 3.9. Cultura de <i>C. auris</i> DSMZ 105988 (<i>Clade III</i>) em meio de Sabouraud dextrose agar após diluições seriadas.	128
Figura 3.10. Gel de agarose dos produtos de PCR amplificados, para identificação de <i>C. auris</i> .	128
Figura 3.11. Curvas de amplificação dos ensaios de qPCR de <i>C. auris</i> .	129
4. COLONIZAÇÃO FÚNGICA EM DOENTES ADMITIDOS EM UNIDADES DE CUIDADOS INTENSIVOS NA REGIÃO METROPOLITANA DE LISBOA	139
Figura 4.1. Fluxograma detalhado da amostra populacional no estudo prospetivo.	143
Figura 4.2. Perfil da colonização fúngica ao longo do período de internamento na UCICRE-HFF, UCIP-HFF e UCI do HBA.	148
5. CARACTERIZAÇÃO DO MICOBIOMA DA PELE EM DOENTES INTERNADOS EM UNIDADES DE CUIDADOS INTENSIVOS.....	167
Figura 5.1. Estrutura e diversidade microbiana da pele saudável nas regiões axilar e inguinal do corpo humano.	169
Figura 5.2. Fluxograma utilizado para o estudo do microbioma fúngico.	173
Figura 5.3. Fluxograma para a construção da biblioteca.	175
Figura 5.4. Fluxograma para a análise bioinformática.	176
Figura 5.5. Perfis eletroforéticos dos produtos amplificados por PCR com <i>primers</i> para as regiões ITS1 e ITS2, visualizados em gel de agarose corado com marcador de DNA fluorescente.	178
Figura 5.6. Total de amostras aprovadas para sequenciação.	179
Figura 5.7. Abundância relativa dos 10 principais géneros fúngicos em cada amostra.	181
Figura 5.8. Abundância relativa dos 30 principais géneros fúngicos em cada amostra.	181
Figura 5.9. Média da abundância relativa (%) dos géneros fúngicos presentes nas 56 amostras.	182
Figura 5.10. Abundância relativa das 10 principais espécies fúngicas em cada amostra.	182
Figura 5.11. Média da abundância relativa (%) das espécies e géneros fúngicos presentes nas 56 amostras.	183
Figura 5.12. Abundância relativa dos 10 principais géneros fúngicos na admissão (D1) e oitavo dia de permanência (D8) na UCI.	184
Figura 5.13. Abundância relativa das 10 principais espécies fúngicas na admissão (D1) e oitavo dia de permanência (D8) na UCI.	184
Figura 5.14. Árvore evolutiva por género: filos e abundância relativa nas amostras (a) e nos dois grupos em estudo (D1 e D8) (b).	185
Figura 5.15. <i>Boxplots</i> dos índices de diversidade alfa (D1 e D8).	189
Figura 5.16. Análise de diversidade beta. Representação da distância UniFrac nas comunidades fúngicas calculada nos dois grupos em estudo (D1 e D8).	189
Figura 5.17. Representação da árvore filogenética e mapa de abundância relativa dos filos gerados pelo método <i>Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Mean</i> (UPGMA).	190
6. PERFIS DE SUSCEPTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> AOS ANTIFÚNGICOS.....	197
Figura 6.1. Fluxograma do estudo observacional para avaliação da atividade <i>in vitro</i> de moléculas antifúngicas sobre os isolados de <i>Candida</i> spp., em unidades de cuidados intensivos.	202

Figura 6.2. Perfis de susceptibilidade <i>in vitro</i> dos isolados das espécies de <i>Candida</i> aos antifúngicos testados.	206
Figura 6.3. Perfis de susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antifúngicos para <i>C. parapsilosis</i> (Cp), <i>C. orthopsilosis</i> (Co) e <i>C. metapsilosis</i> (Cm).	211
Figura 6.4. Prevalência global dos fenótipos de resistência nos isolados de <i>Candida</i> spp. em cada unidade hospitalar.	212
9. ANEXOS.....	267
Figura 9.1 Protocolo experimental para a extração enzimática com proteinase K.....	283
Figura 9.2. Protocolo de extração do DNA genómico com Fungal Lysis Solution®.....	285
Figura 9.3. Protocolo experimental de PCR convencional para identificação de <i>C. auris</i>	288
Figura 9.4. Diluições seriadas de células de <i>C. auris</i> para preparação dos controlos positivos do ensaio de qPCR.	289
Figura 9.5. Protocolo experimental do PCR panfúngico.	291
Figura 9.6. Protocolo experimental do E-test.	295

Índice de Tabelas

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
Tabela 1.1. Sumário de vários géneros fúngicos leveduriformes não <i>Candida</i> spp. associados a infeção fúngica.....	9
Tabela 1.2. Factores de risco do hospedeiro associados à candidose em UCI.	15
Tabela 1.3. Sumário das principais características de <i>Candida</i> spp. com relevância clínica.	19
Tabela 1.4. Características fenotípicas do complexo <i>Candida albicans</i>	45
Tabela 1.5. Mecanismos de resistência aos antifúngicos.....	55
Tabela 1.6. Resumo dos mecanismos moleculares de resistência às principais classes de fármacos antifúngicos em <i>Candida</i> spp.	57
Tabela 1.7. Características das novas abordagens terapêuticas para as infeções por <i>Candida</i> spp.	61
Tabela 1.8. Metodologias mais frequentemente utilizadas nos testes de susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antifúngicos.....	65
2. CARACTERIZAÇÃO DA MICBIOTA CUTÂNEA EM DOENTES DE UNIDADES DE CUIDADOS INTENSIVOS NOS HOSPITAIS TERCIÁRIOS DE LISBOA	73
Tabela 2.1. Número de amostras colhidas na admissão e durante o tempo de permanência na UCI.....	89
Tabela 2.2. Perfis de espécies identificadas por métodos fenotípicos bioquímicos e proteómicos (MALDI-TOF MS).....	91
Tabela 2.3. Origem e distribuição por UCI dos isolados de <i>Candida</i> spp.	94
Tabela 2.4. Distribuição dos isolados de <i>Candida</i> spp. por UCI e dia de colheita.	98
Tabela 2.5. Distribuição dos isolados de <i>Candida</i> spp. de doentes em UCI ao longo do tempo (2020-2022).	100
Tabela 2.6. Distribuição das UFC por espécie de <i>Candida</i> e dia de colheita (D1, D5 e D8).	102
3. PESQUISA DE <i>CANDIDA AURIS</i> NO MICBIOMA DA PELE DE DOENTES EM UNIDADES DE CUIDADOS INTENSIVOS.....	111
Tabela 3.1. Condições utilizadas no protocolo de PCR em tempo real com os <i>primers</i> para o gene alvo <i>ITS2</i>	123
Tabela 3.2. Resultados obtidos no rastreio de <i>C. auris</i> com os diferentes meios de cultura.	124
4. COLONIZAÇÃO FÚNGICA EM DOENTES ADMITIDOS EM UNIDADES DE CUIDADOS INTENSIVOS NA REGIÃO METROPOLITANA DE LISBOA	139
Tabela 4.1. Características demográficas e clínicas dos doentes.	146
Tabela 4.2. Características clínicas dos doentes submetidos a terapêutica antifúngica profilática por UCI hospitalar.	147
Tabela 4.3. Dinâmica da permanência do doente na UCI vs. taxa de colonização, de D1 a D8	148
Tabela 4.4. Avaliação univariada do risco de colonização doente na admissão na UCI.....	149
Tabela 4.5. Análise multivariada do risco de colonização do doente na admissão na UCI.	150
Tabela 4.6. Análise de risco univariada para colonização permanente durante todo o tempo de permanência na UCI (D1-D8).	151
Tabela 4.7. Características demográficas e clínicas dos doentes colonizados na admissão à UCI.	153
Tabela 4.8. Características demográficas e clínicas dos doentes em função dos isolados de <i>Candida</i> spp.	155
Tabela 4.9. Avaliação do risco de sobrevivência (3 meses) em doentes colonizados na UCI do Hospital Beatriz Ângelo (D1-D8).	157
5. CARACTERIZAÇÃO DO MICBIOMA DA PELE EM DOENTES INTERNADOS EM UNIDADES DE CUIDADOS INTENSIVOS.....	167
Tabela 5.1. Caracterização dos factores de risco da coorte seleccionada para o estudo do microbioma.	173
Tabela 5.2. <i>Primers</i> utilizados na reacção de amplificação em cadeia (PCR)	175
Tabela 5.3. Perfil clínico dos doentes com amostras sequenciadas.	179
Tabela 5.4. Espécies de <i>Candida</i> presentes na micobiota e microbioma.	187

6.	PERFIS DE SUSCEPTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> AOS ANTIFÚNGICOS.....	197
	Tabela 6.1. Principais classes de antifúngicos e os seus fármacos mais relevantes.	200
	Tabela 6.2. Categorias interpretativas para <i>Candida</i> spp. dos antifúngicos testados de acordo com as normas EUCAST e estudos relevantes.	205
	Tabela 6.3. Distribuição da CMI por espécie de <i>Candida</i> e antifúngico com base nos pontos de corte do EUCAST.	207
	Tabela 6.4. Perfil de susceptibilidades dos isolados de espécies de <i>Candida</i> obtidos de amostras de doentes em UCI, conforme determinado pelo EUCAST.	210
	Tabela 6.5. Perfil de resistências dos isolados de <i>Candida</i> spp. nas UCI das unidades hospitalares em estudo.	212
	Tabela 6.6. Principais características demográficas, clínicas e microbiológicas dos doentes com perfis fenotípicos de resistência aos azóis e equinocandinas.	214
9.	ANEXOS.....	267
	Tabela 9.1. <i>Primers</i> utilizadas no protocolo de PCR multiplex.....	285
	Tabela 9.2. Planificação da placa de reação do ensaio de PCR multiplex.....	286
	Tabela 9.3. Análise dos perfis eletroforéticos para a identificação das diferentes espécies crípticas dos principais complexos de <i>Candida</i> spp.	287
	Tabela 9.4. <i>Primers</i> e sondas utilizadas no ensaio de qPCR.	289
	Tabela 9.5 Planificação da placa de reação do ensaio de qPCR.	290

Lista de abreviaturas, siglas ou acrónimos

AnfoB	Anfotericina B
ABC	<i>ATP Binding Cassette</i>
ABDE	Água BiDestilada Estéril
AND	Anidulafungina
ANOSIM	Análise de similaridades (<i>Analysis of similarities</i>)
APACHE	Avaliação da Fisiologia Aguda e da Saúde Crónica (<i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation</i>)
ART	Terapêutica Antirretroviral (<i>Antiretroviral Therapy</i>)
ASV	Variante de Sequência de Amplicação (<i>Amplicon Sequence Variant</i>)
ATCC	Coleção Americana de Culturas Tipo (<i>American Type Culture Collection</i>)
Atm	Atmosfera
BCD	Distância Bray-Curtis (<i>Bray-Curtis distance</i>)
BSA	Albumina de Soro Bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
C	Cirurgia
CA	Concordância Categórica (<i>Categorical Agreement</i>)
CBP	Concentrações de corte clínicas (<i>Clinical Breakpoints</i>)
CBS	Centro de Referência de Culturas de Fungos, Países Baixos (<i>Centraal bureau voor Schimmel cultures</i>)
CDC	Centro de Controlo e Prevenção das Doenças (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
CI	Candidose (íase) Invasiva
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CiiEM	Centro de investigação interdisciplinar Egas Moniz
CPO	Organismo Produtor de Carbapenemase (<i>Carbapenemase-Producing Organism</i>)
CQ	Controlo de Qualidade
CNA	<i>Candida não- albicans</i>
COVID-19	Doença por Coronavírus 2019
CVC	Cateter Venoso Central
CV	Cateter Vesical
Ct	Ciclo Limiar (<i>Cycle Threshold</i>)
D1	Primeiro dia de colheita (1º dia de internamento)
D5	Segundo dia de colheita (5º dia de internamento)
D8	Terceiro dia de colheita (8º dia de internamento)
DO	Densidade Ótica
DP	Desvio Padrão
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>DeoxyriboNucleic Acid</i>)
DNA-FISH	Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência no DNA (<i>DNA Fluorescence In Situ Hybridization</i>)
DSMZ	Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares (<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>)
EA	Concordância Essencial (<i>Essential Agreement</i>)

ECDC	Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças (<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>)
ECV/ECOFF	Valores de Corte Epidemiológicos (<i>Epidemiological Cutoff Values</i>)
ESCMID	Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica (<i>European Society of Clinical Microbiology</i>)
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	Comité Europeu de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>)
FDA	Administração Federal de Medicamentos (<i>Federal Drug Administration</i>)
5-FL	5-Flucitosina
FLU	Fluconazol
GCH	Gluconato de clorohexidina
GPI	Glicosilfosfactidilinositol
HBA	Hospital Beatriz Ângelo
HFF	Hospital Professor Doutor Fernando Fonseca
HIV	Vírus da imunodeficiência humana) (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficácia (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HS1 e HS2	<i>Hot Spots</i> 1 e 2
HSP 90	Proteína de Choque Térmico 90 (<i>Heat Shock Protein 90</i>)
Hz	Hertz
IC	Intervalo de Confiança
ID	Identificação
IDSA	Sociedade de Doenças Infeciosas da América (<i>Infectious Diseases Society of America</i>)
IFI	Infeção Fúngica Invasiva
IgG	Imunoglobulina da classe G
IGS	Espaço intergénico (<i>Intergenic Space</i>)
ITS	Espaço Interno Transcrito (<i>Internal Transcribed Spacer</i>)
KCl	Cloreto de potássio
LAMP	<i>Loop mediated Isothermal Amplification</i>
LOD	Limite de deteção (<i>Limit Of Detection</i>)
LSU	Subunidade grande (<i>Large Subunit</i>)
MALDI-TOF MS	Espectrometria de Massa por Desorção/Ionização a Laser Assistida por Matriz e Tempo de Voo (<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time- of- Flight Mass Spectrometry</i>)
MDR	Multirresistente (<i>Multi Drug Resistance</i>)
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MOPS	3(N morfolino) propanossulfonato
MRPP	Procedimento de Permutação de Respostas Múltiplas (<i>Multi Response Permutation Procedure</i>)
MSAA	Agar de manitol salgado auris (<i>Mannitol Salt Agar Auris</i>)
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ HCO ₃	Carbonato de sódio

NET	Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (<i>Neutrophil Extracellular Trap</i>)
NMDS	Escalonamento Multidimensional Não Métrico (<i>Non-metric Multidimensional Scaling</i>)
NP	Nutrição Parentérica
NGS	Sequenciação de Nova Geração (<i>Next Generation Sequencing</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
OTU	Unidades Taxonómicas Operacionais (<i>Operational Taxonomic Units</i>)
PAMP	Padrão Molecular Associado a Patógenos (<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>)
PBS	Tampão fosfacto salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCA	Análise de componentes principais (<i>Principal Component Analysis</i>)
PCoA	Análise de coordenadas principais (<i>Principal Coordinates Analysis</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
qPCR	PCR quantitativo
PG	Crescimento Paradoxal (<i>Paradoxical Growth</i>)
POC	<i>Point-of-Care</i>
QIIME	<i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology</i>
Qubit	Unidade fundamental de informação quântica (<i>Fundamental unit of quantum information</i>)
RAM	Resistência Antimicrobiana
RM	Ressonância Magnética
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
rRNA	RNA ribossómico
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
ROS	Espécies reativas ao oxigénio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
<i>RPB1, RPB2</i>	Genes codificantes das subunidades B1 e B2 da RNA polimerase (<i>RNA Polymerase II Subunit B1, B2</i>)
ROC	Curva Característica de Operação do Recetor (<i>Receiver Operating Characteristic</i>)
RUO	Somente para uso em investigação (<i>Research Use Only</i>)
SAP	Aspartil protease secretória (<i>Secreted Aspartyl Proteinase</i>)
SARS-CoV2	Síndrome respiratória aguda grave por coronavírus 2 (<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>)
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SPSS	Pacote Estatístico para as Ciências Sociais (<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>)
SMI	Serviço de Medicina Intensiva
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Polimorfismos únicos de nucleótido (<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>)

SNS	Serviço Nacional de Saúde
SSDB	Caldo de Sabouraud Dulcitol Salgado (<i>Salt Sabouraud Dulcitol Broth</i>)
SSU	Subunidade pequena (<i>Small Subunit</i>)
TDM	Monitorização terapêutica de medicamentos (<i>Therapeutic Drug Monitoring</i>)
Th	Linfócitos T <i>helper</i>
TLR	Recetor tipo toll (<i>Toll Like Receptor</i>)
TSAF	Testes de Susceptibilidade a Antifúngicos
UCI	Unidade de Cuidados Intensivos
UCICRE	Unidade de Cuidados Intensivos Cirúrgica
UCIP	Unidade de Cuidados Intensivos Polivalente
UME6	Expressão Meiótica a Montante 6 (<i>Upstream Meiotic Expression 6</i>)
UPGMA	Método de agrupamento emparelhado não Ponderado com média Aritmética (<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>)
UniFrac	Fração única de linhagens filogenéticas (<i>Unique Fraction of Phylogenetic Lineages</i>)
UNITE	Base de Dados de Ectomicorrizas Nórdicas ITS de Fácil Utilização (<i>User-friendly Nordic ITS Ectomycorrhiza Database</i>)
UV	Ultravioleta
VA	Ventilação assistida
VOR	Voriconazol
WGS	Sequência Completa do Genoma (<i>Whole Genome Sequence</i>)
WT	Tipo selvagem (<i>Wild Type</i>)
YPD	Extrato de levedura-peptona-dextrose (<i>Yeast Peptone Dextrose</i>)

1. Introdução Geral

1.1 Introdução

O reino Fungi engloba uma grande diversidade de organismos ubiqüitários que apresentam uma vasta gama de formas e funções (1). Os fungos são organismos eucariotas heterotróficos, com uma estrutura celular bem desenvolvida, sendo classificados, com base na sua morfologia, em formas leveduriformes, filamentosas (hifas) e dimórficas (2). Os humanos são continuamente expostos a múltiplos géneros fúngicos por várias vias, particularmente pela via respiratória, oral e de contato, embora a maioria não cause doença em indivíduos saudáveis. Porém, para os indivíduos com sistemas imunológicos comprometidos o risco de desenvolver infeção fúngica é maior, e pode variar de doença leve a potencialmente fatal, dependendo da virulência da espécie fúngica e dos factores predisponentes do hospedeiro (3).

Mais de 600 espécies de fungos estão descritas como causadoras de infeção no Homem e animais, mas menos de 30 espécies causam mais de 99% das infeções (4). Destas, a maioria tem carácter de agentes patogénicos oportunistas e têm sido foco de especial preocupação quando afetam doentes imunocomprometidos e/ou gravemente doentes (5).

Atualmente, as micoses sistémicas oportunistas mais relevantes incluem a criptococose, aspergilose, candidose e pneumocistose (6). Destas, as causadas por *Candida* spp. em Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) representam uma ameaça grave necessitando de uma abordagem terapêutica eficaz (7). Neste contexto, a colonização por *Candida* spp. em doentes internados em UCI é de grande importância clínica devido ao seu potencial de evoluir para infeções invasivas (8). A identificação rápida e precisa de *Candida* spp. no micobioma pode ajudar a guiar políticas de controlo de infeção, diminuindo os índices de mortalidade e a propagação de estirpes resistentes (9, 10).

1.2 Conceito de micobiota e micobioma

A microbiota refere-se à comunidade dinâmica de microrganismos (bactérias, vírus, fungos) que colonizam diversos locais do organismo humano, enquanto a micobiota se refere exclusivamente à comunidade fúngica. O microbioma, que inclui o micobioma, é composto pelas comunidades microbianas bem como o seu material genético e as suas interações com o hospedeiro (11). Ambos, microbiota e microbioma desempenham um

papel vital no crescimento e desenvolvimento do organismo humano, realizando uma variedade de funções fisiológicas e metabólicas que não são inatas, como a digestão de certos alimentos, a síntese de vitaminas e a proteção contra agentes patogénicos (12, 13). Como tal, a microbiota humana, atua como modificador da fisiologia humana fundamental, incluindo a aquisição de energia, a disponibilidade de cofactores vitamínicos, o metabolismo xenobiótico, o desenvolvimento da função imunológica e até mesmo a função neurológica (13). De um modo geral, a resposta do sistema imunológico do hospedeiro é crucial para manter uma microbiota funcional e "saudável", além de prevenir o surgimento de infeções oportunistas (14).

Classicamente, as investigações microbiológicas baseavam-se na cultura de amostras biológicas, utilizando técnicas para inferir a identidade dos organismos. A verdadeira imagem da diversidade da microbiota fúngica era confundida por organismos fastidiosos que não dispunham *in vitro* das condições de crescimento necessárias *in vivo*, tais como interdependências metabólicas complexas (15). Ainda assim, as tecnologias, metodologias e, as ferramentas de *software* concebidas ou adaptadas para lidar com as peculiaridades fúngicas não são comparáveis com as disponíveis para o estudo do bacterioma e do viroma (11).

Dependendo dos métodos utilizados, existem várias definições de micobioma disponíveis (16). A maioria destas definições é baseada em análises de sequências de DNA e descrevem o micobioma como um genoma coletivo de microrganismos fúngicos num ambiente específico (15). Assim, a análise de uma amostra biológica específica pode ser limitada e fornecer uma visão parcial, até que métodos mais avançados estejam disponíveis para obter resultados mais completos e precisos (17). Todavia, as abordagens metagenómicas revelaram uma grande quantidade de dados sobre o micobioma, permitindo uma mudança de perspetiva (18). Atualmente reconhece-se que as funções dos organismos multicelulares estão intrinsecamente ligadas ao seu micobioma, destacando a sua importância para a saúde e funcionamento do organismo (15). Por conseguinte, o conceito abrangente de micobioma pode ser definido pela sua constituição qualitativa e quantitativa, pelas suas variabilidades localizadas ou temporais e pela soma das interações não só entre os seus membros, mas também com o bacterioma e viroma e, evidentemente, com o habitat em que reside (17).

O microbioma não é um sistema estático, mas altamente dinâmico ao longo da vida humana, a nível intra e inter individual (19). A colonização começa desde o nascimento e continua a aumentar e flutuar de acordo com factores como o estilo de vida, a dieta, a idade, o sexo, a doença e a terapêutica (especialmente a utilização de antibióticos e antifúngicos) (20). Os fungos podem colonizar múltiplas superfícies do corpo humano, tais como a cavidade oral, o trato respiratório, gastrointestinal e urogenital e pele, sendo específicos do local anatómico do organismo (Fig. 1.1) (21-23). Apesar de uma elevada diversidade fúngica, o microbioma representa apenas uma pequena fração da comunidade microbiana humana (inferior a 1%), mas inclui espécies determinantes na manutenção da estrutura e função das comunidades microbianas (23).

Uma análise integrativa de vários estudos mostra que diferentes locais do organismo humano abrigam populações específicas de fungos, e que diversos padrões de microbioma estão associados a várias doenças (18). Ao fazer interface com outros biomas, bem como com o hospedeiro, o microbioma desempenha um papel importante no desenvolvimento e progressão de doenças associadas a fungos (24). Enquanto colonizadores, os fungos também podem influenciar a fisiologia e o metabolismo do hospedeiro, o desenvolvimento e a função do sistema imunitário e até o comportamento do indivíduo (20).

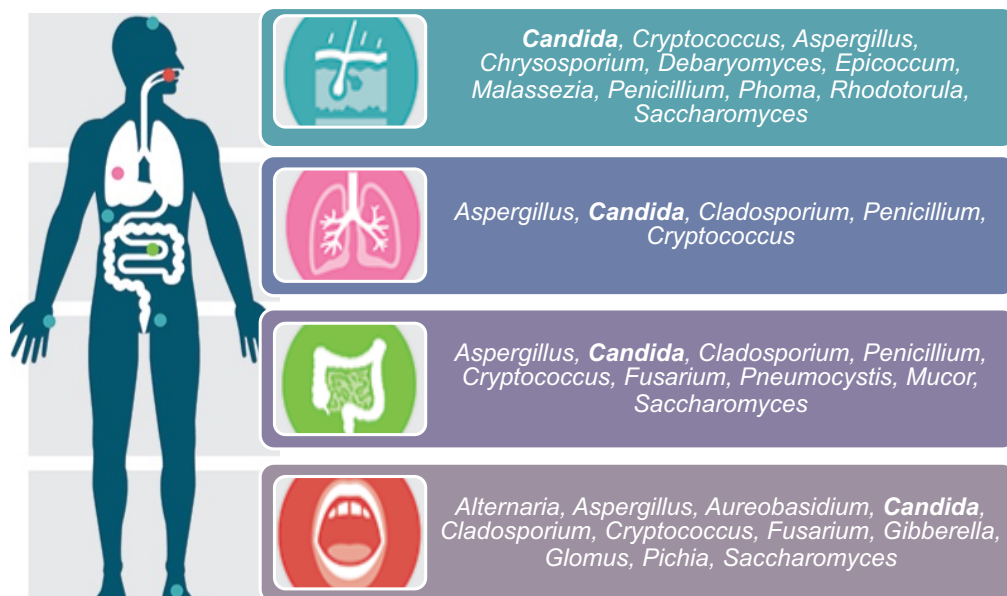


Figura 1.1. Sumário dos gêneros fúngicos constituintes do microbioma associado ao hospedeiro saudável. As diferentes comunidades fúngicas que influenciam a microbiota da pele, trato respiratório, intestinal e cavidade oral. Adaptado de (23).

No organismo humano, o sobre crescimento de algumas espécies fúngicas colonizadoras está fortemente associado a infeções sistémicas ou outras doenças (25). Por conseguinte, compreender as interações entre o microbioma, o hospedeiro e outros membros do microbioma é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção e terapêutica para uma série de doenças humanas (26).

1.2.1 O microbioma e Unidades de Cuidados Intensivos

As Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) são reconhecidas como potenciais reservatórios de infeções nosocomiais, ou seja, infeções adquiridas em ambientes de cuidados de saúde. O microbioma, que compreende a comunidade de fungos (incluindo leveduras e fungos filamentosos) presentes em UCI, nas superfícies e nos próprios doentes, desempenha um papel crucial. Muitos dos organismos fúngicos que compõem o microbioma apresentam um perfil de patogénicos oportunistas (27). No organismo humano, a colonização por estes microrganismos poderá ser transitória, permanente ou, ainda, dar origem a doença, dependendo da interação entre os seus factores de virulência e os mecanismos de defesa do hospedeiro (11, 28). Por conseguinte, em doentes internados em UCI, o microbioma e respetiva microbiota, podem ser um factor desencadeante no estado de saúde, com o potencial de causar infeções associadas. Atualmente, os seguintes factores são reconhecidos por contribuírem de forma relevante para alterações na microbiota em UCI:

- Internamento hospitalar prolongado: os doentes em UCI geralmente têm estadias hospitalares prolongadas, o que pode levar a uma maior exposição a vários microrganismos, incluindo fungos (29).
- Supressão imunológica: Muitos doentes têm o sistema imunológico comprometido devido a condições clínicas subjacentes, lesões graves ou uso de medicamentos imunossupressores, tornando-os mais suscetíveis a infeções fúngicas (30).
- Dispositivos médicos invasivos: A utilização de cateteres, ventiladores e linhas centrais, pode introduzir agentes patogénicos fúngicos no organismo, especialmente se não forem seguidas medidas adequadas de controlo de infeção (31).

- Antibióticos de largo espectro: A utilização de antibióticos de largo espectro pode perturbar o equilíbrio microbiano normal do organismo, permitindo o crescimento excessivo de fungos oportunistas (32).

Os fungos mais comuns implicados em infeções relacionadas com as UCI são as espécies dos géneros *Candida* e *Aspergillus*. As espécies de *Candida* são a causa mais frequente de infeções fúngicas da corrente sanguínea, e subsequente candidose invasiva (CI), representando 70 a 90% das Infeções Fúngicas Invasivas (IFI), enquanto *Aspergillus* spp. pode causar infeções respiratórias graves em doentes imunocomprometidos, conduzindo a aspergilose invasiva, representando 10 a 20% das IFI em UCI (31).

1.2.2 O micobioma cutâneo

A pele é o órgão mais extenso do organismo humano, o compartimento mais externo do corpo e, muitas vezes, o primeiro ponto de contato com um grande número de microrganismos ambientais. Constitui a primeira barreira entre o ambiente e o corpo humano, protegendo-o contra potenciais agentes patogénicos (34). A superfície da pele é um nicho único, servindo de habitat para uma comunidade distinta de microrganismos. A microbiota da pele é composta por milhões de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e vírus. Alguns destes microrganismos são simbióticos com papéis essenciais na barreira protetora, contribuindo para a prevenção da invasão de agentes patogénicos, e manutenção da homeostase, através da produção de péptidos antimicrobianos (21). Embora as análises metagenómicas tenham evidenciado em amostras da pele que o microbioma é maioritariamente constituído por bactérias, alguns locais podem ter proporções relativamente elevadas de fungos e/ou vírus (20, 21).

As primeiras abordagens da microbiota cutânea forneceram dados sobre os géneros fúngicos cultiváveis mais abundantes sendo o género leveduriforme lipofílico *Malassezia*, o predominante. Adicionalmente, os géneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* e *Cryptococcus* também podem estar presentes na pele. Porém, a composição do microbioma da pele é caracterizada por uma grande diversidade e variabilidade, que pode ser influenciada por vários factores, como a idade, o estilo de vida e o clima (35). Os géneros fúngicos leveduriformes, *Candida*, *Trichosporon*,

Rhodotorula, *Malassezia* e *Cryptococcus*, relevantes no oportunismo fúngico em ambiente de UCI são enfatizados ao longo do texto seguinte.

***Candida* spp.**

O género *Candida* é um grupo de fungos pertencente ao filo Ascomycota da ordem Saccharomycetales e classe Saccharomycetes. Este género é composto por inúmeras espécies que são comensais da pele, membranas mucosas e trato gastrointestinal e são detectáveis em até 60% dos indivíduos saudáveis (30). No entanto, quando o equilíbrio da microbiota é perturbado, como acontece em doentes internados em UCI com sistemas imunitários comprometidos, as espécies do género *Candida* podem desenvolver-se em excesso e causar infeção, dependendo da interação entre os seus factores de virulência e os mecanismos de defesa do hospedeiro (36, 37). O enfoque no género *Candida* será desenvolvido em seção específica.

***Trichosporon* spp.**

Trichosporon é um basidiomicete, amplamente distribuído na natureza, e é também comum na microbiota humana (38). Apesar de ser considerado um agente clássico de micose superficial, as espécies de *Trichosporon* são reconhecidas como agentes patogénicos oportunistas emergentes, capazes de causar infeções fúngicas invasivas potencialmente fatais (33, 39). Estes fungos leveduriformes foram isolados de doentes imunodeprimidos com IFI na China, e estão associados a uma mortalidade elevada que varia de 30-90%, dependendo das condições subjacentes do hospedeiro (39). Os factores de risco incluem procedimentos invasivos, cirurgias abdominais e torácicas, neutropenia prolongada, e uso de corticosteroides (33). Mais de metade dos doentes com fungémia por *Trichosporon* desenvolvem abscessos profundos no pulmão, fígado, baço, e até lesões metastáticas na pele (39). *T. asahii* é a espécie mais associada a doença invasiva, mas já foram referidas infeções por *T. asteroides*, *T. inkin* e *T. faecale*. As espécies de *Trichosporon* são intrinsecamente resistentes às equinocandinas, apresentam baixa susceptibilidade *in vitro* à anfotericina B e há registo de isolados clínicos de *T. asahii*

resistentes aos triazóis. Perante o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos descrito, o tratamento da infecção por *Trichosporon* traduz-se num desafio (Tabela 1.1) (33).

Tabela 1.1. Sumário de vários géneros fúngicos leveduriformes não *Candida* spp. associados a infecção fúngica. Adaptado de (33, 43, 48 e 51).

Espécie	Impacto	Distribuição geográfica	População em risco	Susceptibilidade antifúngica
<i>Trichosporon</i> spp.	Mortalidade elevada 42-88%	Global, especialmente sudoeste asiático	Imunocomprometidos, cirurgia abdominal	Resistência intrínseca ou CMI elevada às equinocandinas
<i>Rhodotorula</i> spp.	4-6% das infeções por espécies leveduriformes não <i>Candida</i>	Ásia, especialmente na China	Procedimentos cirúrgicos	Baixa resposta aos azóis e equinocandinas
<i>Malassezia</i> spp.	Emergente	Global	Recém-nascidos e doentes sob nutrição parentérica rica em lípidos	Baixa resposta aos azóis
<i>Cryptococcus</i> spp.	Mortalidade entre 41-61%, especialmente em doentes com infeção pelo HIV (<i>C. neoformans</i>)	Global	Imunocomprometidos: HIV/SIDA; transplantados; hemato-oncológicos; Terapias imunossupressoras.	Anfotericina B convencional + 5-flucitosina

A identificação de isolados de *Trichosporon* ao nível do género utilizando características fenotípicas é simples. A pesquisa de urease é importante para distinguir *Trichosporon* (urease-positivo) de *Magnusiomyces* (urease-negativo), género que também apresenta características morfológicas similares com produção de artroconídios. A sequenciação de marcadores moleculares (DNA) é obrigatória para identificar as espécies individuais de *Trichosporon*. Especificamente para estas espécies, a região IGS do gene que codifica o rRNA é a preferida para distinguir as espécies, uma vez que a região ITS não tem poder discriminatório suficiente (40).

***Rhodotorula* spp.**

Rhodotorula spp. apresenta uma distribuição ambiental diversa, podendo ser isolada do ar, solo e plantas e tem sido utilizada na indústria agrícola. Esta levedura pode ser encontrada como contaminante da pele, das unhas, dos pulmões, da urina, das fezes, do sistema nervoso central e do sangue (25). A infecção pode ocorrer por via endógena ou exógena, como por exemplo, pelas mãos de profissionais de saúde, materiais contaminados e fontes ambientais inanimadas (41). É um agente patogénico oportunista no Homem, sendo uma causa pouco frequente de meningite e endocardite fúngica, fungémia e outras infeções sistémicas em doentes imunocomprometidos (42).

Estes organismos distinguem-se facilmente pela sua cor rosa-alaranjada em meio de cultura de Sabouraud e apresentam-se morfológicamente somente na forma de blastóporo. As espécies clinicamente mais importantes deste género são *R. mucilaginosa* e *R. glutinis*. A doença invasiva por *Rhodotorula* spp., especialmente *R. mucilaginosa*, tem sido cada vez mais notificada na Ásia, especialmente na China, onde constitui 4-6% das infeções por leveduras não *Candida* (Tabela 1.1) (43). *R. mucilaginosa* apresenta uma Concentração Mínima Inibitória (CMI) elevada aos azóis, bem como às equinocandinas, sendo as opções terapêuticas limitadas à anfotericina B e à 5-flucitosina (44).

***Malassezia* spp.**

As leveduras deste género estão incluídas na ordem Basidiomycota, classe Malasseziomycetes e família Malasseziaceae. A base de dados do *Mycobank* lista 18 espécies para este género (45). O género *Malassezia* é o colonizador mais comum da pele humana saudável e é predominante em várias localizações do corpo humano, tais como o lado interior dos cotovelos, costas, ouvido externo, fossas nasais e várias áreas faciais (35, 46). Das espécies de *Malassezia*, *M. globosa*, *M. restricta* e *M. auris* são as mais frequentemente encontradas em vários locais da pele de indivíduos saudáveis (47). *M. pachydermatis* é a espécie mais reconhecida, provavelmente porque pode crescer em meios fúngicos sem suplementação lipídica, contrariamente às restantes espécies lipofílicas (40). As espécies de *Malassezia* podem causar infeções superficiais conhecidas como pitíriase versicolor, bem como fungémia e outras infeções sistémicas em bebés e

adultos (Tabela 1.1) (48). Os mecanismos pelos quais estas leveduras podem desencadear patologia são pouco estudados e ainda não estão claramente identificados. No entanto, a hipótese proposta é que a doença pode ser induzida pela invasão direta de filamentos fúngicos nos tecidos ou indiretamente por mecanismos imunológicos e metabólicos (49).

***Cryptococcus* spp.**

O género *Cryptococcus* compreende leveduras ambientais, recorrentes na natureza (solo, fezes de animais, entre outros) e de carácter patogénico oportunista (50). No contexto *Cryptococcus* spp. e microbiota humana, estão em curso investigações para determinar a forma como estes fungos interagem com o hospedeiro e quais as implicações que a sua presença pode ter para a saúde (25). Das 37 espécies identificadas, *C. neoformans* e *C. gattii* são as espécies mais associadas a patologia humana (50). *C. neoformans* afeta essencialmente indivíduos imunocomprometidos (idosos, indivíduos HIV/SIDA e doentes transplantados), sendo um dos principais responsáveis por meningite fúngica (Tabela 1.1) (51). Estima-se que anualmente, 223.000 indivíduos com HIV/SIDA desenvolvam meningite criptocócica, resultando em aproximadamente 181.000 mortes (25). Já *C. gattii* consegue infetar tanto indivíduos imunocompetentes como imunocomprometidos, e está associado a um índice de mortalidade de cerca de 33% (52).

1.3 O género *Candida* no micobioma

No micobioma humano, destaca-se o género *Candida*, colonizador frequente da maioria dos indivíduos saudáveis em diferentes locais anatómicos (Fig. 1.2) (27, 53).

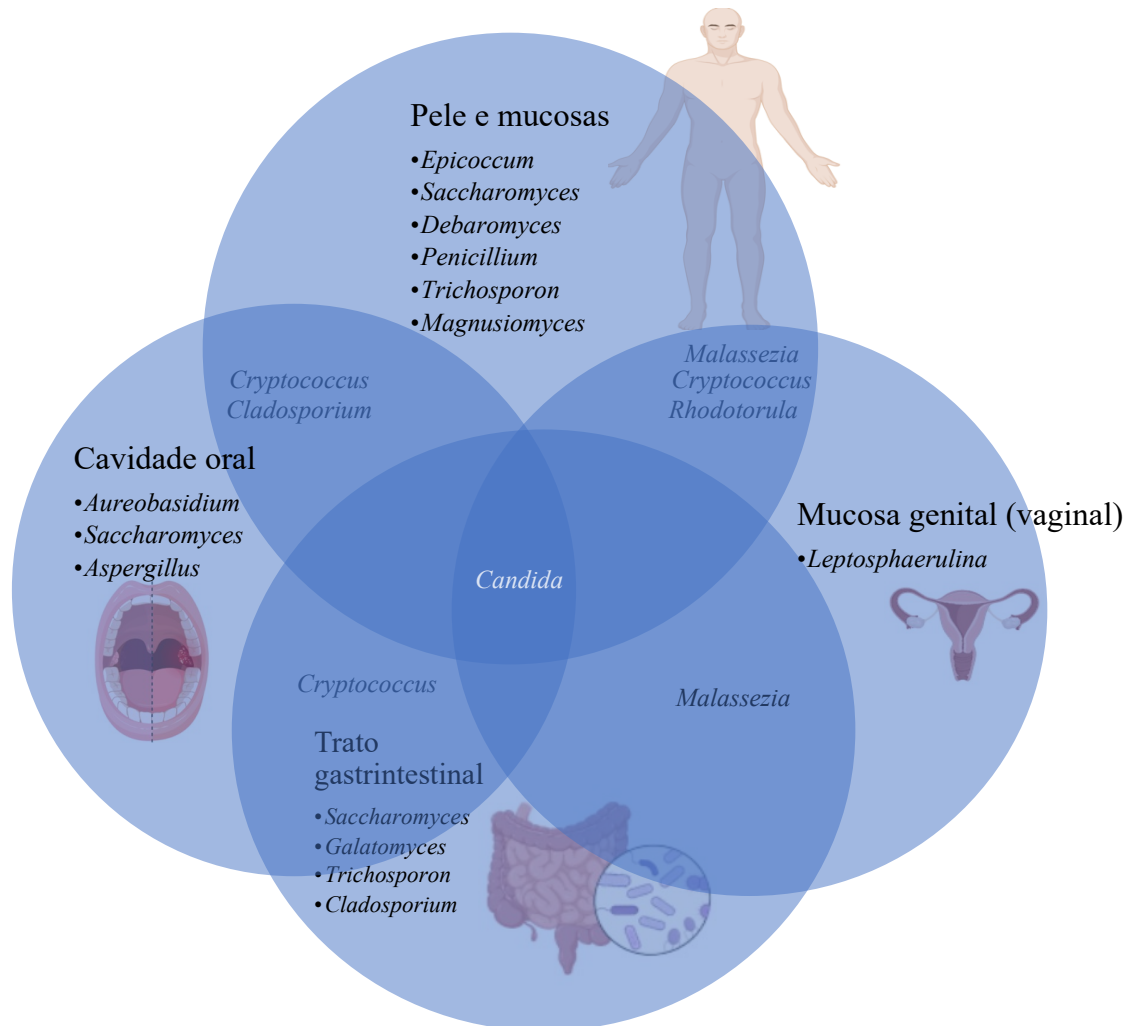


Figura 1.2. Sumário das diferentes comunidades fúngicas que influenciam a micobiota da pele, vagina, intestino e cavidade oral. O género *Candida* intersecta com os vários ecossistemas. Adaptado de (27).

No organismo humano, a colonização por *Candida* pode ser transitória, permanente ou mesmo dar origem a doença, dependendo da interação entre os seus factores de virulência e os mecanismos de defesa do hospedeiro. Assim, estes organismos podem transitar de comensais a patogénicos, sendo por isso considerados organismos patogénicos oportunistas (Fig. 1.3). O espectro da doença é proporcional ao défice imunitário do hospedeiro e pode variar desde a candidose (candidíase) mucocutânea à

candidose invasiva/disseminada (54). A candidose é a causa mais frequente de infecção fúngica em todo o mundo e compreende infecções superficiais e doença invasiva (27).

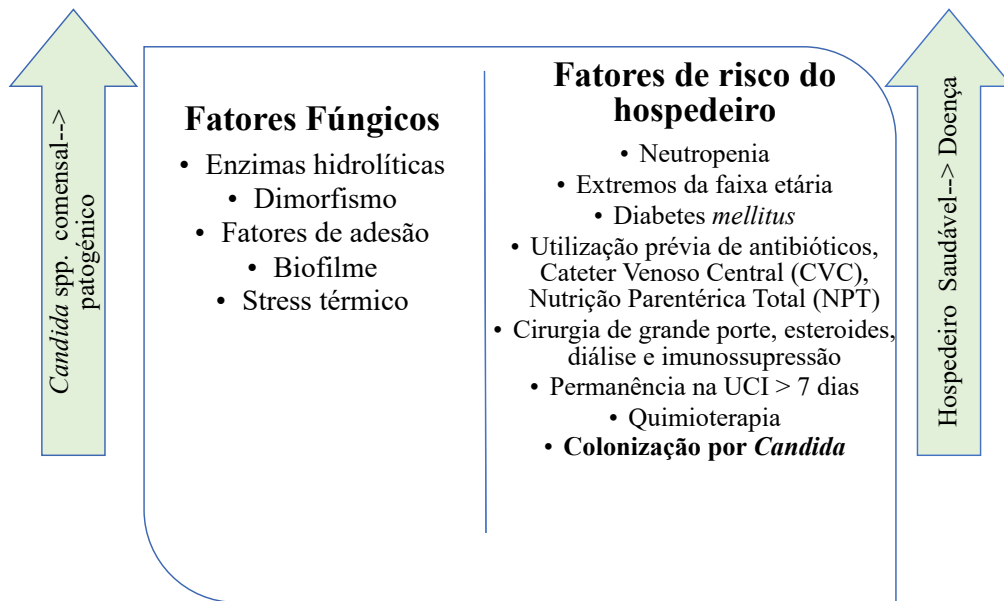


Figura 1.3. Interação entre *Candida* spp. e o hospedeiro humano. Destaca-se a transição de comensal para patogênico, influenciada por factores de virulência fúngica e factores de risco do hospedeiro. Adaptado de (30).

Nos doentes internados em UCI, o delicado equilíbrio da micobiota é frequentemente perturbado, criando um ambiente propício para o crescimento excessivo de espécies do género *Candida*, que podem conduzir a infeções graves (36, 37).

1.3.1 Factores de risco para infeção por *Candida* spp.

O género *Candida* apresenta alguns atributos de virulência, como a morfogénese, dimorfismo, adesão, enzimas hidrolíticas envolvidas na adesão e invasão, ou ainda a capacidade de formar biofilme, que se expressos conjuntamente vão condicionar o desenvolvimento de doença e explicar as diferenças de patogenicidade entre as várias espécies de *Candida* (55, 56) (Fig.1.3). Estas espécies leveduriformes estimulam a imunidade do hospedeiro com uma resposta Th17 através de múltiplos recetores de reconhecimento de padrões do hospedeiro, incluindo o TLR2, TLR4, Dectina-1 e Dectina-2, que funcionam sinergicamente para a proteção induzida pela colonização (57). Esta resposta imunitária está ligada à acumulação de neutrófilos circulantes ativos e

protege contra a infecção invasiva por *Candida* spp. e outros agentes patogénicos suscetíveis à imunidade Th17, como *Staphylococcus aureus* (58). Os estudos *in vitro* efetuados por Shao e colaboradores mostraram que em *C. albicans* o regulador transcricional da filamentação, *UME6*, é essencial para ativar a resposta imunitária sistémica do tipo Th17. As estirpes com deleção e sobre expressão constitutiva de *UME6* não são imunogénicas durante a colonização (59). Se estes resultados forem confirmados em estudos que envolvam um número maior de participantes, a identificação das flutuações dinâmicas da expressão dos genes de *C. albicans* pode preparar a imunidade do hospedeiro contra a infecção disseminada e predizer quais os doentes com risco elevado para serem colonizados e posteriormente desenvolverem candidose invasiva.

As infeções por *Candida* spp., especialmente *C. albicans*, são influenciadas não apenas pela interação imunológica entre o agente patogénico e as células do hospedeiro, mas também por vários factores de risco do hospedeiro. Estes, aplicam-se a todos os indivíduos hospitalizados, especialmente aos internados em UCI e incluem: (i) a quebra das defesas de barreira, como a pele, a mucosa e as barreiras intestinais, resultante de situações como queimaduras, mucosite, perfuração do trato, presença de cateter venoso central, cateter vesical, ventilação assistida, cirurgia de grande porte recente, pancreatite necrosante, qualquer tipo de diálise, nutrição parentérica e a imunossupressão iatrogénica (53, 60, 61); e (ii) os factores de risco individuais que levam a um compromisso na resposta imunológica como a neutropenia (neutrófilos inferiores a $500/\text{mm}^3$), idade superior a 65 anos, diabetes *mellitus*, utilização prévia de antibióticos e/ou corticosteroides, período de internamento prolongado (permanência superior a sete dias em ambiente de cuidados intensivos), quimioterapia e, colonização por *Candida* spp. (Tabela 1.2) (53, 61, 62).

Tabela 1.2. Factores de risco do hospedeiro associados à candidose em UCI. Adaptado de (31).

Factores de risco do hospedeiro predisponentes para infeção por <i>Candida</i> spp. em UCI	
• Cirurgia (principalmente abdominal) • Tratamento com corticosteroides • Nutrição parentérica (NP) • Idade avançada • Uso de agentes imunossupressores • Uso prolongado de antibióticos de largo espectro • Quimioterapia • Neutropenia ($<500/\text{mm}^3$) • Traumatismo importante • Cateter venoso central ou vesical	• Colonização por <i>Candida</i> spp. em múltiplos locais • Hemodiálise • Infeção e/ou sépsis • Estadia prolongada na UCI • Ventilação mecânica • Diabetes <i>mellitus</i> • Pontuação elevada na classificação APACHE II • Desnutrição • Queimaduras graves • Pancreatite

APACHE: *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation* (31).

Por conseguinte, qualquer variável que altere a relação comensal entre *Candida* spp. e o hospedeiro pode ser interpretado como um factor de risco para infeção, inclusive infeção invasiva (Fig. 1.3). Destes factores de risco, a colonização prévia por *Candida* destaca-se como o principal factor predisponente para a infeção (Fig.1.3) (63). Por colonização entende-se, o isolamento de *Candida* de qualquer um dos locais sépticos do corpo humano, incluindo a região axilar, inguinal, oral ou retal de um indivíduo assintomático. A colonização prévia por *Candida* não indica quais os indivíduos que irão desenvolver candidose, mas a infeção é rara em indivíduos que não estejam previamente colonizados (8). Os doentes colonizados podem ainda constituir reservatórios de espécies multirresistentes aos fármacos antifúngicos e potenciar a transmissão horizontal (54, 64). Em contraste com a infeção bacteriana, o processo decorrente entre a colonização e infeção por *Candida* spp. requer tempo, cerca de sete dias, para a maioria das espécies (27). De uma forma relevante, uma parte substancial das infeções fúngicas diagnosticadas em doentes críticos é causada por isolados colonizadores (8, 65). Por conseguinte, embora ainda sob investigação, a redução da carga fúngica geral nos doentes colonizados provavelmente melhorará a sua evolução clínica (29).

1.3.2 Candidemia e candidose invasiva

A candidose sistêmica, também denominada de candidose invasiva ou disseminada (CI), é uma forma grave de infecção fúngica causada por espécies de *Candida* (53). A CI caracteriza-se pela presença de espécies de *Candida* na corrente sanguínea que disseminam para todo o organismo, provocando infecções em vários órgãos e tecidos (60).

Os progressos alcançados na medicina intensiva com um número crescente de procedimentos invasivos, a utilização generalizada de antibióticos de largo espectro, os tratamentos imunossupressores cada vez mais agressivos, o aumento da sobrevivência e incidência de doentes idosos admitidos, têm contribuído para o aumento da CI (36, 66). Atualmente, a infecção por *Candida* spp. constitui a terceira principal causa de infecções nosocomiais da corrente sanguínea (candidemia), estando associada a custos e índices de morbidade e mortalidade hospitalar elevados (39-60%) (9, 27, 61). A incidência de candidemia varia entre 3,5 e 16,5/1000 admissões hospitalares, particularmente em UCI (66-68). A CI desenvolve-se principalmente em doentes internados nas UCI cirúrgica e médica, devido à perda de barreiras físicas do sistema imunológico. A integridade dessas barreiras é crucial para prevenir a invasão de *Candida* spp., especialmente num ambiente onde a imunidade celular pode estar comprometida devido ao estado crítico do doente e às intervenções invasivas necessárias para o tratamento. Nestes ambientes, a perda das barreiras físicas é um factor de risco mais significativo do que a imunidade celular comprometida (31).

Apesar do conhecimento da fisiopatologia da CI, as variações epidemiológicas observadas na etiologia da CI podem alterar as recomendações locais sobre o uso dos fármacos antifúngicos (69). Cada espécie distinta de *Candida* exibe as suas próprias características em termos de potencial invasivo, virulência, padrão de epidemiologia e susceptibilidade antifúngica (53, 60, 70, 71).

1.3.3 Espécies clinicamente relevantes

Do género *Candida* fazem parte aproximadamente 500 espécies, incluindo espécies comensais e potencialmente patogénicas para o Homem, animais e plantas (72). Destas,

pelo menos 30 espécies de *Candida* foram reconhecidas como causas de infecção humana, sejam infecções superficiais, sistêmicas, ou formas invasivas (73).

A taxonomia do género *Candida* sofreu mudanças recentes devido à descrição de novas espécies geneticamente relacionadas. Várias espécies de *Candida* foram renomeadas em géneros não *Candida* (74), e já não se qualificam estritamente como agentes causadores de candidose, embora sejam aqui discutidas com as outras espécies de *Candida* devido às semelhanças em termos epidemiológicos e clínico laboratoriais. Por outro lado, várias espécies de *Candida* anteriormente conhecidas como entidades individuais, são atualmente consideradas complexos formados por várias espécies. Nas décadas de 1990 e 2000, vários estudos demonstraram que algumas espécies de *Candida* eram geneticamente heterogêneas. Em primeiro lugar, as espécies individuais foram divididas em grupos com base nas diferenças na sequência de alguns genes. Posteriormente, estes grupos foram designados como espécies crípticas em homenagem ao adjetivo grego *kruptós*, que significa oculto. Estas espécies foram definidas como fenotipicamente indistinguíveis e só são identificadas através das suas sequências de DNA (40).

Por conseguinte, muitas espécies de *Candida* são atualmente consideradas complexos formados por várias espécies crípticas. Os complexos de *Candida* spp. incluem todas as espécies que compartilham as mesmas características fenotípicas e uma homologia no cistão de 97 a 99%, sendo denominados de acordo com as espécies mais prevalentes dentro do complexo (75). Estas espécies são denominadas pelo nome de espécie seguido de *stricto sensu*. O complexo *C. albicans* é composto pelas espécies: *C. albicans stricto sensu* (ss), que é a espécie mais estudada; *Candida dubliniensis*, descrita por Sullivan e colaboradores (76), e uma terceira espécie, *Candida africana*, rara, descrita como uma variação de *C. albicans* ss (77). O complexo *Candida glabrata* (denominada atualmente *Nakaseomyces glabratus*) compreende *C. glabrata* ss, *Candida bracarensis* (78) e *Candida nivariensis* (79). Tavanti e colaboradores descreveram a existência de um complexo de *Candida parapsilosis* compreendendo três espécies distintas: *C. parapsilosis* ss, *Candida orthopsilosis*, e *Candida metapsilosis* (80). O complexo *Candida haemulonii* inclui leveduras oportunistas emergentes como *Candida haemulonii* ss, *Candida haemulonii* var. *vulnera* e *Candida duobushaemulonii*. Além disso, espécies como *Candida pseudohaemulonii* e *Candida auris* são filogeneticamente

relacionadas, compartilhando características genéticas e fenotípicas. Estas leveduras têm ganhado atenção devido à sua capacidade de causar infecções graves, resistência a antifúngicos, e desafios na identificação laboratorial, tornando-as uma preocupação crescente na micologia clínica (81, 82).

As espécies destes complexos foram reconhecidas como patogénicos humanos, de carácter oportunista, sendo que, cerca de 90% das infecções invasivas são causadas por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (denominada atualmente *Pichia kudriavzevii*) (70). Embora *C. albicans* seja considerada a levedura mais frequentemente responsável por infecções, tem vindo a ser observada uma mudança a nível global para espécies de *Candida* não-*albicans* (CNA), mas com heterogeneidade regional (31). A prevalência de CNA na maioria das regiões é geralmente determinada por factores como os padrões locais de utilização de antifúngicos, factores de risco individuais dos doentes e surtos clonais, ou seja, surtos que envolvem uma estirpe molecular de *Candida* spp. que é única num ambiente de cuidados de saúde (31, 83). Refere-se, que o aumento no número de espécies patogénicas resulta igualmente de mudanças epidemiológicas que levaram espécies menos virulentas a causarem infecção, do surgimento de espécies resistentes a antifúngicos e de uma melhoria nos métodos de identificação (9, 84). Sobretudo, tem-se observado a emergência significativa de espécies de leveduras pouco frequentes, como são exemplo, o complexo *C. guilliermondii* (denominada atualmente *Meyerozyma guilliermondii*), *C. orthopsilosis*, *C. inconspicua*, *C. nivariensis* e *C. auris* (85). Destas, *C. auris* é única na escala da sua expansão e na persistência dos surtos nosocomiais, razões que justificaram a atribuição de um capítulo neste trabalho, bem como uma introdução detalhada sobre o tema (86).

1.3.3.1 Complexo *Candida albicans*

C. albicans apresenta uma grande variabilidade genética e alguns isolados inicialmente considerados como estirpes "atípicas" são agora classificadas como espécies próximas mas distintas (Tabela 1.3) (75). Das espécies crípticas deste complexo, a mais conhecida é *C. dubliniensis* que é indiscutivelmente considerada diferente uma vez que partilha uma baixa homologia nas regiões ITS com *C. albicans* (87).

Tabela 1.3. Sumário das principais características de *Candida* spp. com relevância clínica. Adaptado de (88).

Espécie	Impacto	Distribuição geográfica	População em risco	Susceptibilidade antifúngica	Obs.
Complexo <i>Candida albicans</i> <i>Candida albicans</i> ss	Espécie mais comum em todo o mundo, exceto na Índia	Global	Neonatologia; Doentes em UCI (CVC), procedimentos invasivos, imunossupressão	Bastante susceptível a todos os antifúngicos	Morfogénese, resposta <i>in vivo</i> aos antifúngicos, regida pela produção de biofilme
<i>Candida dubliniensis</i>	Casos esporádicos	Global	HIV	Semelhante à de <i>C. albicans</i> ss	Candidose mucocutânea
<i>Candida africana</i>	> 50 casos de CI notificados	África (predomínio)	Não especificado	Referida resistência ao fluconazol e voriconazol	O diagnóstico microbiológico convencional identifica-a como <i>C. albicans</i>
Complexo <i>C. glabrata</i> (<i>Nakaseomyces glabratus</i>)	20-25% de CI no mundo desenvolvido; Mortalidade elevada	Global	Idade avançada Doentes infetados pelo HIV Associada ao uso de antibióticos específicos (piperacilina/tazobactam, vancomicina)	Resistência ao fluconazol	11% são resistentes a mais de uma classe de antifúngicos (MDR)
<i>Candida tropicalis</i>	Espécie mais comum na Índia	Global	Neutropenia; antibioterapia de largo espectro Relevante em doentes oncológicos (principalmente hematológicos)	Aumento da resistência aos azóis na Ásia. Estirpes MDR (azol + anfotericina B)	Infeção persistente, mudança de fenótipo, formação de biofilme

CI- Candidose Invasiva, CVC cateter venoso central, CMI concentração mínima inibitória, HIV vírus da imunodeficiência humana, MDR- multirresistentes.

Tabela 1.3. Sumário das principais características de *Candida* spp. com relevância clínica. Adaptado de (88) (continuação).

Espécie	Impacto	Distribuição geográfica	População em risco	Susceptibilidade antifúngica	Obs.
Complexo <i>C. parapsilosis</i>	Infeção bimodal, doentes críticos e recém-nascidos	Global	Doentes em estado crítico com CVC e recém-nascidos prematuros com alimentação parentérica total	Boa susceptibilidade, < 3% de estirpes resistentes a azóis ou anfotericina B; CMI superiores às equinocandinas	Colonização da pele; Formação de biofilmes nos CVC.
<i>C. krusei</i> (<i>Pichia kudriavzevii</i>)	Espécie mais comum em neonatologia	3% na Europa e América do Norte, menos no Sudoeste asiático	Oncologia; Associada ao uso de antibióticos específicos (piperacilina/tazobactam, vancomicina)	Resistência aos azóis (intrinsecamente resistente ao fluconazol)	Considerado patogénico emergente, responsável por surtos em unidades neonatais
<i>C. lusitaniae</i> (<i>Clavispora lusitaniae</i>)	0,2 a 9% dos casos de CI	Global	Neutropénicos, pediatria ou sob antibioterapia de largo espectro	Mudança de susceptibilidade à anfotericina B	O fenótipo não permite a identificação
Complexo <i>C. guilliermondii</i> (<i>Meyerozyma guilliermondii</i>)	Mortalidade elevada	Global	quimioterapia, imunodeficiência, cirurgia gastrointestinal ou cardiovascular e doenças oncológicas	Susceptibilidade diminuída às equinocandinas e fluconazol	Patogenicidade baixa
<i>Candida kefyr</i> (<i>Khuyveromyces marxianus</i>)	Baixo	Global	Hemato-oncologia	Reportados perfis de multirresistência	Identificada por sequenciação
<i>Candida blankii</i>	> 12 casos de CI	India	Recém-nascidos	Reportados perfis de multirresistência	Surto neonatal com mortalidade > 40%
<i>Candida auris</i>	Espécie mais comum em doentes indianos em estado crítico, MDR, mortalidade elevada	Global Ambientes de cuidados de saúde em todo o mundo	Doente em estado crítico, colonização	Varia com o <i>clade</i> : I, MDR; II, baixa resistência; III, susceptível à anfotericina B; IV, variável	Aumento durante a pandemia COVID-19; facilmente transmissível

CI- Candidose Invasiva, CVC cateter venoso central, CMI concentração mínima inibitória, HIV vírus da imunodeficiência humana, MDR- multirresistentes.

Candida albicans stricto sensu

C. albicans é a espécie mais frequentemente isolada da pele e mucosas do trato gastrointestinal e urogenital, que atuam como reservatórios endógenos e fonte de infecção (88). Em ambiente nosocomial, esta espécie é responsável por infecção invasiva e por infecções oportunistas associadas a dispositivos médicos *in situ*.

A infecção invasiva segue um modelo de patogênese trifásica e neste processo, *C. albicans* utiliza múltiplos factores de virulência. A primeira fase consiste na adesão a superfícies bióticas (células do hospedeiro) e/ou abióticas (superfícies de dispositivos médicos, como cateteres e implantes) e pouco tempo depois da fixação tem início a formação do biofilme. Segue-se a morfogénese, transição da forma leveduriforme para a filamentosa. Esta espécie apresenta a capacidade de alternar entre diferentes formas morfológicas, incluindo levedura, hifas (estruturas filamentosas longas) e pseudohifas. A forma filamentosa (hifa) está particularmente associada à invasão e disseminação nos tecidos (89). Na forma filamentosa, estas leveduras secretam enzimas extracelulares (proteases, lípases e fosfolipases) que desempenham um papel relevante na invasão dos tecidos do hospedeiro, assim como na aquisição de nutrientes essenciais para a sua sobrevivência e crescimento (90). Finalmente ocorre o amadurecimento do biofilme numa estrutura bifásica de matriz extracelular, com potencial invasivo (91, 92). Quando a estrutura do biofilme está madura protege o fungo do sistema imunitário do hospedeiro e dos agentes antimicrobianos, tornando difícil a erradicação da infecção (91). Além disso, ao longo do processo, *C. albicans* demonstra a capacidade de evadir-se do sistema imunitário do hospedeiro através de vários mecanismos, como por exemplo, mascarar os componentes da sua parede celular para evitar a deteção pelas células imunitárias e comprometer a fagocitose (93). Embora quase 95% dos isolados de *C. albicans* mostrem susceptibilidade *in vitro* aos agentes antifúngicos, *in vivo*, a resposta clínica é dificultada pela presença da levedura na forma de biofilme (Tabela 1.3) (93, 94).

Candida dubliniensis

C. dubliniensis é um agente patogénico oportunista que foi identificado pela primeira vez em Dublin, em 1995, na cavidade oral de indivíduos infetados pelo HIV (76). Desde então, esta espécie tem sido associada a infeções fúngicas orais e invasivas em indivíduos imunocomprometidos, sobretudo indivíduos HIV positivos, com uma taxa de prevalência global de 0,5 a 7,0% (87, 95-99). No decorrer da pandemia COVID-19, *C. dubliniensis* foi igualmente isolada em doentes infetados por SARS-CoV-2 (100).

O aumento da sensibilização clínica para *C. dubliniensis* é atribuído à reduzida susceptibilidade aos fármacos antifúngicos como por exemplo, fluconazol, flucitosina, voriconazol e anfotericina B (87, 101, 102). De facto, muitas das primeiras estirpes de *C. dubliniensis* foram isoladas de amostras orais de indivíduos infetados pelo HIV sob fluconazol para tratamento de candidose mucocutânea, e apresentaram valores de CMI elevados para o fluconazol (103). No entanto, investigações mais recentes de isolados da corrente sanguínea e de outros locais estéreis obtidos em estudos de vigilância mostraram perfis de susceptibilidade *in vitro* semelhantes aos de *C. albicans* (104). Estes resultados sugerem que a especiação pode ser necessária para uma investigação de um surto ou outros fins epidemiológicos, mas para a maioria dos isolados esporádicos, não se justifica separar *C. dubliniensis* de *C. albicans* (40, 103).

Candida africana

C. africana apresenta um estatuto taxonómico controverso. *C. africana* foi inicialmente considerada uma espécie diferente, tendo-lhe sido posteriormente concedido o estatuto de variedade (*C. albicans* var. *africana*) e mais tarde foi incluída num grupo de estirpes de *C. albicans* atípicas (77). *C. africana*, apesar de uma distribuição quase mundial, é principalmente isolada no continente africano, sendo a maioria dos isolados provenientes de mulheres africanas com vaginite (97, 105-107). Porém, *C. africana* é outro agente emergente de CI, tendo sido identificada em mais de 50 casos de CI, maioritariamente de países africanos, especialmente Madagáscar e Angola (Tabela 1.3) (97, 105, 108). Note-se que os casos podem estar subnotificados, uma vez que *C. africana* está intimamente relacionada com *C. albicans* e os métodos fenotípicos de identificação

convencionais não permitem a diferenciação (108). O significado clínico da distinção de *C. albicans* e *C. africana* está também em discussão, uma vez que os estudos apontam para perfis de susceptibilidade desta espécie semelhantes aos de *C. albicans* ss (108).

1.3.3.2 Complexo *Candida glabrata* (denominada atualmente *Nakaseomyces glabratus*)

Em 2005, algumas estirpes atípicas de *C. glabrata* foram isoladas em Espanha, com resultados fenotípicos incongruentes como colónias brancas em meio cromogénico CHROMagar® e incapacidade em assimilar a trealose como fonte de carbono, enquanto as estirpes ditas “típicas” de *C. glabrata* apresentavam-se como colónias de rosa a lilás e a prova da trealose positiva (79). Além disso, em sistemas comerciais de identificação (ID) com base fenotípica, foram obtidos resultados discrepantes para esses isolados. Com as galerias de identificação bioquímica ID32C® foi obtida uma identificação de *C. glabrata* duvidosa (85% ID) enquanto no sistema Vitek2® com os cartões ID-YST a identificação de *C. glabrata* foi de 97% (79).

Um ano depois, outra estirpe atípica de *C. glabrata* foi isolada em Portugal (78). As estirpes atípicas espanholas e portuguesas de *C. glabrata* mostraram diferenças suficientes na região variável do gene 26S rDNA D1/D2 para justificar a sua separação em novas espécies: *C. nivariensis* e *C. bracarensis*, respetivamente (78, 79).

Com base nestes estudos, *C. glabrata* é agora considerada um complexo de espécies incluído no género *Nakaseomyces* composto por três espécies potencialmente patogénicas para o Homem: *Nakaseomyces glabratus* (*C. glabrata stricto sensu*), *Nakaseomyces nivariensis* (*C. nivariensis*) e *Nakaseomyces bracarensis* (*C. bracarensis*) e um patógeno não humano, *Nakaseomyces delphensis* (109). *C. nivariensis* e *C. bracarensis* raramente têm sido identificadas como comensais da microbiota humana. No entanto, nos seres humanos, apresentam habitats semelhantes: vias digestivas (orofaringe, fezes) e urogenitais (110). A prevalência destas espécies em amostras clínicas é baixa, estimada entre 1% e 2% dos isolados inicialmente identificados fenotipicamente como *C. glabrata*. Apesar disso, ambas as espécies foram reconhecidas como agentes causadores de infeções invasivas, destacando a sua relevância clínica em cenários específicos (Tabela 1.3). Ainda assim, a ocorrência de *C. nivariensis* e *C. bracarensis* entre os isolados

clínicos fenotípicos de *C. glabrata lato sensu* de diferentes cenários geográficos permanece desconhecida (108, 111).

Candida glabrata stricto sensu

Candida glabrata é a espécie mais virulenta do complexo e é a segunda espécie de *Candida* mais isolada em infecções da corrente sanguínea nos EUA e nos países do Norte da Europa Ocidental, representando 20 a 25% de todos os casos e um índice de mortalidade de 40 a 60% (31, 66, 68, 88, 112, 113). Ao contrário de *C. albicans*, *C. glabrata* carece de toda a virulência relacionada com a formação de hifas e mudança fenotípica. Ao invés, para persistir no hospedeiro, utiliza a fagocitose induzida para a evasão às defesas do hospedeiro. A elevada tolerância ao *stress* e a rápida adaptação ambiental também contribuem para a sua virulência (91). Com estes mecanismos, não é surpreendente que cause uma doença de evolução lenta e consequentemente, o seu isolamento tem estado mais ligado a doentes em idade avançada (88). No estudo efetuado por Zhang e colaboradores, o grupo etário com idade superior a 70 anos mostrou uma taxa significativamente mais elevada de infeção por *C. glabrata* do que as outras idades (58% vs 42%) (114). O uso profilático de fluconazol ao longo dos anos tem sido implicado na emergência de *C. glabrata* e muitos isolados apresentam resistência intrínseca ou adquirida ao fluconazol (110, 115, 116).

Candida nivariensis e *Candida bracarensis*

Vários estudos têm descrito *C. bracarensis*, juntamente com *C. nivariensis*, como agentes etiológicos da candidose vulvovaginal e orofaríngea (117). *C. nivariensis* é uma espécie rara de *Candida* identificada em vários países do mundo, sendo que em Portugal não foi identificada nenhum isolado até à data (108, 117, 118). *C. nivariensis* tem sido associada a diferentes tipos de infeções, incluindo infeções invasivas, como candidemia, peritonite e abscesso pélvico (108, 119, 120). No entanto, ainda há falta de informação sobre a epidemiologia e factores de virulência destas espécies filogeneticamente próximas de *C. glabrata*, apesar de já ter sido descrito a capacidade de *C. bracarensis* em formar biofilme (108).

1.3.3.3 Complexo *Candida parapsilosis*

Tavanti e colaboradores, ao analisarem fenótipos de *C. parapsilosis*, observaram polimorfismos e diferenças moleculares entre estirpes desta espécie, as quais foram, então, divididas em três grupos e, posteriormente, classificadas em três espécies distintas, dentro de um complexo, composto por: *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (80). As espécies deste complexo são uma importante causa de fungemia em todo o mundo (20 a 30%) e a sua incidência aumentou dramaticamente desde o início deste século (53).

Candida parapsilosis stricto sensu

C. parapsilosis é uma espécie de *Candida* distribuída amplamente na natureza e é frequentemente isolada de uma variedade de fontes não humanas, tais como animais domésticos, insetos, solo e ambientes marinhos (121). Esta levedura coloniza com sucesso a pele humana e as membranas mucosas, em que as mãos dos profissionais de saúde são reconhecidas como um importante vetor de aquisição nosocomial (122). Além disso, a capacidade seletiva de *C. parapsilosis* para crescer nas superfícies dos materiais biocompatíveis utilizados em ambiente hospitalar (123) e em soluções de nutrição parentérica promove o risco de infecção por este agente patogénico (54). *C. parapsilosis* representa um risco elevado para indivíduos imunocomprometidos, tais como os portadores do HIV e doentes cirúrgicos, particularmente os submetidos a cirurgia do trato gastrointestinal (Tabela 1.3, pág. 19 e 20). Adicionalmente, os doentes que requerem o uso prolongado de um cateter venoso central ou de outros dispositivos médicos apresentam risco elevado de colonização sistémica, devido à capacidade inata de *C. parapsilosis* aderir a superfícies abióticas e de formar biofilmes (71, 124).

C. parapsilosis encontra-se frequentemente associada a uma vasta gama de infeções, tais como endocardite, endoftalmite, artrite séptica e peritonite (125). Na realidade, *C. parapsilosis* apresenta um padrão bimodal de infeção; um entre os doentes críticos da UCI em que forma biofilmes nos cateteres e causa doenças invasivas, e o segundo entre os recém nascidos prematuros e de muito baixo peso cuja porta de entrada é através da

alimentação parentérica (88). Porém, as infecções por *C. parapsilosis* apresentam taxas de mortalidade mais baixas do que as causadas por *C. albicans* (7% vs 56%) (126).

A epidemiologia de *C. parapsilosis* varia conforme a região, mostrando diferenças na sua presença relativa. Na África do Sul, *C. parapsilosis* é a principal causa de CI, no Japão, China e América do Sul encontra-se em segundo lugar (53, 71, 127), nos EUA em terceiro (128) e na Índia em quarto (53, 71, 127, 129). Na Europa, a incidência de infecções por *C. parapsilosis* varia geograficamente. Nos hospitais do sul da Europa (Portugal, Espanha, Itália e Grécia), é a segunda espécie mais isolada, enquanto nos países do centro e norte da Europa, ocupa o terceiro lugar, após *C. albicans* e *C. glabrata* (53, 130-133).

Candida orthopsilosis e *Candida metapsilosis*

As duas espécies crípticas, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, são também agentes patogénicos oportunistas, associados a doença local e sistémica (71, 134).

Tal como para *C. parapsilosis* a sua frequência e distribuição difere de acordo com a área geográfica (124, 135-137), mas com uma prevalência baixa, de aproximadamente 1% (40). No entanto, estudos efetuados em Espanha, referem percentagens de *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* de 1,0% a 8,2% e 1,1% a 4,2% respetivamente (135, 138). É de referir que um estudo efetuado no Brasil verificou que das candidemias por *C. parapsilosis*, 28,3% eram causadas por *C. orthopsilosis* e 4,8% por *C. metapsilosis* (139). Igualmente, estudos mais recentes realçam a importância da deteção exata destas espécies, uma vez que se observou uma incidência de *C. orthopsilosis* superior à de *C. krusei* (140).

1.3.3.4 *Candida tropicalis*

C. tropicalis é considerada como uma das espécies mais importantes de *Candida* spp., sendo apenas precedida por *C. albicans* no que se refere à virulência (141). Esta espécie produz uma vasta gama de factores de virulência, incluindo a adesão às células epiteliais e endoteliais orais, a secreção de enzimas líticas, tais como proteases, fosfolipases e hemolisinas, a morfogénese e mudança fenotípica e formação de biofilme (Tabela 1.3-

pág. 20 e 21) (54, 142). Trata-se de uma espécie estreitamente relacionada com *C. albicans* e é facilmente identificada através de métodos fenotípicos e moleculares.

Para *C. tropicalis*, ainda não foram descritas na literatura espécies crípticas. *C. tropicalis* é uma espécie clinicamente relevante como agente etiológico de candidemia. O facto de *C. tropicalis* continuar a ser a espécie de *Candida* mais frequentemente notificada na Índia (129), a segunda espécie mais comum na América Latina (143), e a terceira espécie mais comum na China (144) enfatiza a sua natureza emergente. As razões para a sua elevada prevalência em certas regiões geográficas do mundo não são claras (40). As infeções são geralmente observadas entre os doentes neutropénicos e aqueles com a microbiota intestinal alterada após toma de antibióticos de largo espectro.

Comparativamente a *C. albicans*, a CI por *C. tropicalis* está associada a uma infeção mais persistente, levando assim a um aumento da estadia hospitalar, e a uma mortalidade mais elevada do que para qualquer outra espécie de *Candida* (88, 145). De acordo com uma meta análise relativamente recente, *C. tropicalis* foi a espécie prevalente na formação de biofilme (67,5%) mostrando diferenças estatisticamente significativas quando comparada com outras espécies de *Candida* (142). Embora *C. tropicalis* e *C. albicans* partilhem vários factores de virulência, a maior morbilidade e mortalidade de *C. tropicalis* pode ser devida a uma maior resistência antifúngica (141).

1.3.3.5 *Candida krusei* (denominada atualmente *Pichia kudriavzevii*)

C. krusei, amplamente utilizada na indústria alimentar, está mais estreitamente relacionada geneticamente com *Pichia (Candida) norvegensis* e *Candida inconspicua*, ambas raras causas de infeção humana (Tabela 1.3- pag. 20 e 21). Porém, esta espécie é considerada emergente em casos de CI em doentes oncológicos (146). A sua prevalência varia de 1,8% na Ásia-Pacífico a 3% na Europa e América do Norte (88).

A sua resistência intrínseca ao fluconazol, antifúngico frequentemente administrado de forma empírica resulta em infeções em doentes sob profilaxia com este antifúngico (147).

1.3.3.6 *Candida lusitaniae* (denominada atualmente *Clavispora lusitaniae*)

O habitat natural de *C. lusitaniae* abrange uma variedade de nichos ecológicos, refletindo sua adaptabilidade e resistência ambiental. Esta espécie foi inicialmente isolada do trato respiratório humano, mas também pode estar presente no solo, água e plantas (108).

As infecções invasivas por *C. lusitaniae* constituem 0,2 a 9% de todos os casos de candidemia a nível mundial (Tabela 1.3) (148). Historicamente, as infecções eram fatais na era pré-fluconazol, mas as taxas de mortalidade atuais raramente excedem 5% (149). Está tipicamente associada a doentes com neoplasias hematológicas e submetidos a quimioterapia. Na população pediátrica, *C. lusitaniae* é responsável por cerca de 4 a 7% de todos os casos de candidemia (150). Esta espécie tem ganhado destaque devido à sua resistência inerente a vários antifúngicos, nomeadamente à anfotericina B e aos azóis (151).

1.3.3.7 Complexo *Candida guilliermondii* (denominada atualmente *Meyerozyma guilliermondii*)

C. guilliermondii foi aceite como um complexo composto por *C. guilliermondii*, *Meyerozyma carophila* e *Meyerozyma caribbica* (152). *Candida guilliermondii* é uma levedura saprófita encontrada no meio ambiente, na mucosa e pele humanas. Porém, pode provocar infecções graves em doentes com factores de risco como o tratamento com quimioterapia, imunodeficiência, cirurgia gastrointestinal e/ou cardiovascular (Tabela 1.3) (152). A taxa de incidência de infecções invasivas por *C. guilliermondii* é muito inferior à de *C. albicans*, mas a sua taxa de mortalidade é mais elevada (108).

1.3.3.8 *Candida auris*

C. auris, assim denominada após ser descrita pela primeira vez num isolado do canal auditivo de um doente no Japão em 2009 (153), embora tenha sido identificada retrospectivamente em 1996 (154). Nos últimos quinze anos, *C. auris* emergiu globalmente como um patogénico nosocomial em populações pediátricas e adultas sendo

considerada pela OMS uma grande ameaça para a saúde pública (Tabela 1.3- pág. 20 e 21) (155-160).

1.3.3.8.1 Filogenia

C. auris está incluída no *cluster* CTG juntamente com a maioria das espécies de *Candida* com interesse clínico (sendo *Candida glabrata* uma exceção) (75). O *cluster* CTG é caracterizado pela tradução única de codões CUG como serina em vez de leucina (161).

Embora a relação filogenética evolutiva de *C. auris* com as outras espécies de *Candida* ainda não esteja totalmente esclarecida devido à raridade de algumas das espécies mais próximas de *C. auris*, esta levedura é colocada com *C. haemulonii stricto sensu*, *C. duobushaemulonii*, *C. pseudohaemulonii*, *C. ruelliae* e recentemente *C. heveicola* para formar um único *cluster* de fungos patogênicos humanos multirresistentes (162). Todas estas espécies formam um grupo haploide distantemente relacionado com os patogênicos humanos diploides mais comuns como *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, sendo *C. lusitaniae* a espécie filogeneticamente mais próxima (64, 127, 161, 163).

1.3.3.8.2 Epidemiologia

As origens de *C. auris* e os seu(s) nicho(s) ecológico(s) inicial(is) ainda são maioritariamente desconhecidos. O surgimento de ramos filogeográficos (*clades*) muito diferentes em diferentes lugares do mundo num período muito curto é particularmente intrigante. Alguns autores sugeriram que o aquecimento global possa ter desempenhado um papel na seleção deste organismo (164). Com base nesta suposição, a sua propagação pode ter sido assegurada graças a animais com temperatura corporal elevada, por exemplo, as aves, que teriam sido responsáveis por distribuir o fungo em áreas urbanas, onde estes, posteriormente poderiam infectar o organismo humano (165). Os primeiros isolados ambientais de *C. auris* proveem do ambiente marinho na Índia, mais concretamente de uma praia arenosa tropical nas Ilhas Andaman com várias estirpes evidenciando estreitas relações genéticas com os isolados clínicos na Índia continental (166). Esta descoberta marcante de que o ambiente marinho tenha sido identificado como

um nicho natural de *C. auris* é crucial para a compreensão da epidemiologia, ecologia e emergência de *C. auris* como um patógeno humano (166). Curiosamente, em comparação com a característica comum de multirresistência entre as estirpes clínicas, a estirpe ambiental foi sensível a todos os antifúngicos testados. Estes resultados permitiram aos investigadores levantar a hipótese de que a estirpe de *C. auris* susceptível às moléculas antifúngicas de um habitat aquático sem atividade humana conhecida pode representar um estado ancestral do patógeno que posteriormente desenvolveu resistência aos fármacos durante a sua adaptação a ambientes antrópicos (166). A investigação de Yadav e colaboradores sugere que o ambiente pode contribuir para o desenvolvimento e disseminação da resistência em *C. auris*, especialmente através do contato com fungicidas agrícolas e frutas armazenadas, como maçãs (167). No entanto, a confirmação dos possíveis reservatórios ambientais de *C. auris* requer mais estudos (168).

A presença de *C. auris* em humanos foi até à data documentada em dezenas de países dos seis continentes (169). Na Índia, foram relatados vários casos entre 2009 e 2011 (n= 12) e 2010 a 2014 (n= 90) (64, 170, 171). De 2010 a 2020, ficou evidente a propensão notável de *C. auris* para gerar surtos (157). Os surtos hospitalares de *C. auris* com rápida propagação e mortalidade elevada (30% a 72%) foram notificados na Ásia (Índia, Paquistão), Europa (Reino Unido, Espanha, Itália), América Latina (Colômbia, Venezuela), África do Sul, EUA (30, 172) e Canadá (173). No entanto, a transmissão contínua foi limitada a aproximadamente uma dúzia de países (169) (Fig. 1.4). Nos países desenvolvidos, *C. auris* não parece ter uma prevalência elevada, causando apenas infecções esporádicas e não epidémicas. Efetivamente, após a ocorrência de surtos no Reino Unido e em Espanha, os casos tornaram-se mais esporádicos e *C. auris* representa apenas uma minoria dos casos de candidose, por vezes agrupados em pequenos surtos (174, 175). Porém, em alguns países, como a África do Sul e Índia, *C. auris* pode representar de 14 a 40%, respetivamente das espécies causadoras de candidemia (176, 177).

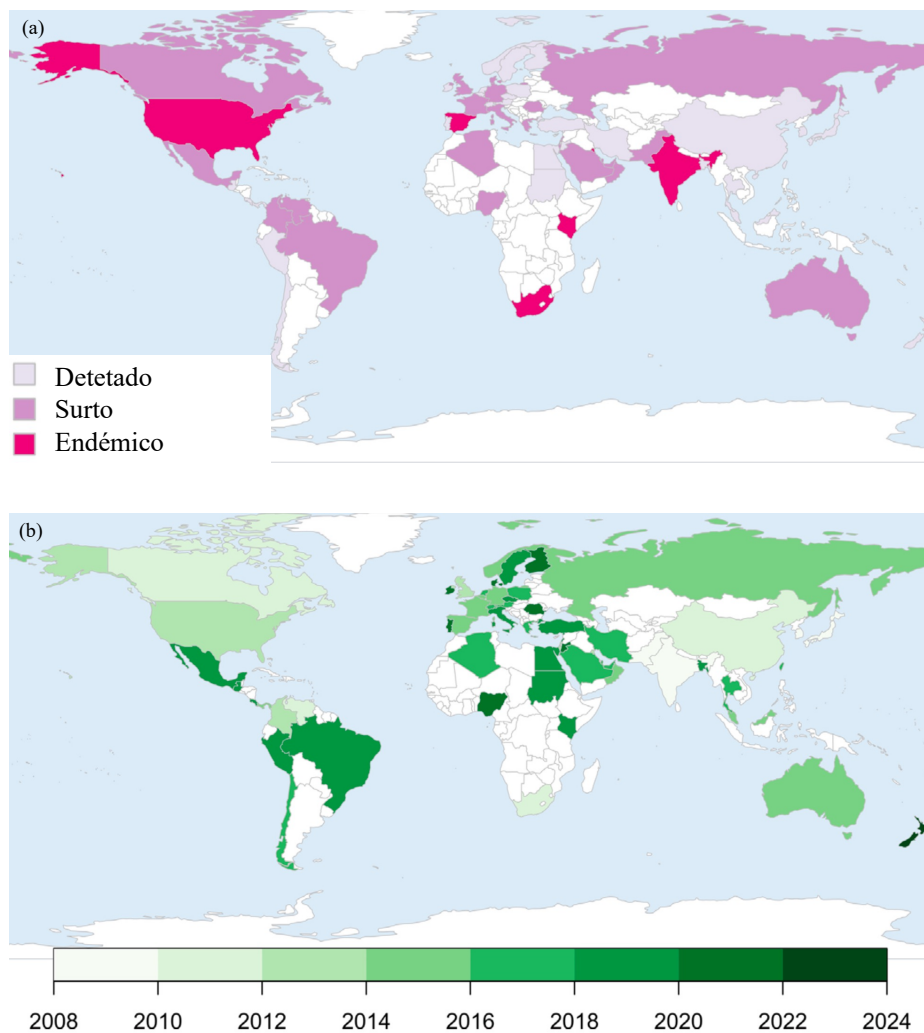


Figura 1.4. Distribuição global de *Candida auris* de 2009 a 2023 nos 6 continentes. (a) Os países onde *C. auris* foi notificada são apresentados e categorizados por associação com casos isolados, surtos ou evidência de endemicidade. (b) Os países onde *C. auris* foi notificada são apresentados de acordo com o ano em que o primeiro caso foi detetado. Adaptado de (184).

No contexto da pandemia de COVID-19, vários países da América do Sul relataram surtos de *C. auris* pela primeira vez em 2020 (178). Da mesma forma, na Índia, *C. auris* foi responsável por 60% dos casos de candidemia numa única enfermaria de COVID-19 (179). Considerando o tempo de permanência na UCI dos doentes infetados por SARS-CoV-2, a infeção viral pode representar um factor predisponente indireto para a (re)emergência de *C. auris* (180). Em Portugal, foi detetado apenas um caso clínico de *C. auris*, em 2022, de um doente proveniente de Angola (181). A República da Irlanda e os países escandinavos (exceto a Noruega) são os únicos países da Europa Ocidental que não declararam nenhum caso colonização/infeção por *C. auris* (84, 182-184) (Fig. 1.4).

Apesar da natureza clonal de *C. auris*, a sequenciação total do genoma (WGS) e os estudos genéticos populacionais revelaram que a espécie *C. auris* é dividida em quatro *clades* principais (163). A variação substancial entre os *clades* e homogeneidade dentro do mesmo sugerem que a espécie emergiu independentemente em múltiplas regiões geográficas (185). A distribuição genética segue a origem geográfica das linhagens com o *clade* I, denominado *cluster* sul-asiático, formado por linhagens de origem indo-paquistanesa, *clade* II, referido como *clade* leste, composto por linhagens coreanas e japonesas, o *clade* III é o *clade* sul-africano e o *clade* IV referenciado como o *clade* sul-americano composto por linhagens colombianas e venezuelanas. Nos EUA, é predominante o *clade* I, exceto nos estados do Illinois e Indiana, onde os *clade* III e IV são os mais prevalentes (185), sugerindo um momento diferente para a introdução dessas estirpes. Na Europa, a maioria dos isolados de *C. auris* pertence ao *clade* I (157), embora as estirpes do hospital de Valência (Espanha) fossem englobadas no *clade* III, apesar de ligeiramente distintas genotipicamente de todas as notificadas anteriormente (186). O isolado de *C. auris* identificado em Portugal pertencia ao *clade* III (181). É digno de nota que um isolado do *clade* II também foi identificado na Áustria (187).

Em 2019, alguns autores iranianos sugeriram a existência de um potencial quinto *clade*, separado dos outros *clades* por mais de 200.000 polimorfismos únicos de nucleótido (SNP) (188). Um isolado do *clade* V foi isolado no Irão numa rapariga de 14 anos que nunca tinha viajado para fora do país e a quem foi diagnosticada otomicose, seguido de um outro caso resistente ao fluconazol distinto do primeiro (188, 189). O *clade* V, é pouco frequente e possui um grau elevado de proximidade filogenética com os *clades* I, III e IV (190). Um sexto ramo filogenético (*clade* VI) foi identificado em doentes em Singapura e no Bangladesh (191).

É de referir que enquanto os *clades* I, III e IV são responsáveis por surtos de infeção invasiva por estirpes multirresistentes, o *clade* II não foi associado a surtos nosocomiais. Este último apresenta um perfil de susceptibilidade aos antifúngicos mais benigno e foi fundamentalmente descrito em isolados de otites (153, 163).

1.3.3.8.3 Virulência

Desde que a colonização e/ou infecção por *C. auris* se tornou um grande problema de saúde pública, têm vindo a ser desenvolvidos estudos com abordagens diferentes para investigar o grau de virulência dos isolados de *C. auris* (192). Foram efetuados estudos *in vitro* que avaliaram diferentes perfis transcricionais de isolados com fenótipos diferentes, assim como, estudos *in vivo* (193). Estes últimos, incluíram modelos de invertebrados como *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, e o modelo popularizado em larvas de traça da cera, *Galleria mellonella*, bem como vertebrados como o tradicional murino, e, o último modelo introduzido, o peixe-zebra *Danio rerio* (194). Apesar dos modelos experimentais de infecção em murinos e invertebrados sugerirem que a virulência de *C. auris* pode ser comparável à de *C. albicans*, os dados ainda são limitados (195).

Os factores de virulência identificados em *C. auris* incluem as vias necessárias para a síntese da parede celular e aquisição de nutrientes, produção de enzimas hidrolíticas, mecanismos de evasão ao sistema imunitário do hospedeiro e sistemas de efluxo para múltiplos fármacos (196-198).

C. auris apresenta dois fenótipos importantes claramente distinguíveis, com comportamento e virulência diferentes (199):

- Fenótipo não agregativo (associado a uma maior virulência): as células de levedura organizam-se como células isoladas ou, às vezes, ligadas, à semelhança de outras espécies de *Candida*.
- Fenótipo agregativo: alguns isolados apresentam elementos leveduriformes que mantêm as células filhas ligadas após a blastese, criando grandes agregados que não são separados por rutura física após agitação vigorosa durante vários minutos.

A adesão das leveduras às células hospedeiras é essencial para a colonização, e expressão da sua virulência. Diferentes investigações sobre o genoma de *C. auris* indicam que este codifica adesinas de *C. albicans*, nomeadamente a família de genes *ALS*, *ALS1*, *ALS3* e *ALS5*, que promovem a ligação física às células e superfícies do hospedeiro e medeiam a formação de biofilmes (200). Curiosamente, estas adesinas estão presentes em estirpes do *clade* I, III e IV associadas a surtos, mas não nas estirpes do *clade* II compreendendo este *clade* principalmente organismos suscetíveis aos antifúngicos e

associados a infecções localizadas (163). A produção de enzimas líticas extracelulares está envolvida na etapa de invasão do hospedeiro. O genoma de *C. auris* codifica enzimas líticas, como as aspartil proteases secretadas (SAP), bem como lípases e fosfolípases (200). No entanto a produção de fosfolípases e proteases é dependente da estirpe da levedura (197).

Um factor crucial para a invasão de um agente patogénico é a sua capacidade de se adaptar às condições do ambiente hospedeiro. A capacidade termoe estável de *C. auris* é importante, mantendo a sua viabilidade a 42°C, assim como é de referir a sua tolerância a ambientes hipersalinos que induzem a formação de pseudohifas (193).

Os primeiros estudos morfológicos em *C. auris* sugeriram que a levedura era incapaz de formar tubos germinativos, pseudohifas ou hifas. No entanto, vários estudos já demonstraram que essa capacidade ocorre em condições específicas. Além disso, verificou-se que, em *C. auris*, a proteína Hsp90 — que facilita o desenrolamento de outras proteínas e as estabiliza em situações de *stress* térmico — é essencial para a sua morfogénese e está envolvida na resistência aos compostos azoicos (201-203). Os estudos efetuados por Wang e colaboradores mostraram que os isolados de *C. auris* podem formar hifas verdadeiras sob certas condições definidas. Por exemplo, o crescimento de *C. auris* em meio de extrato de levedura peptona dextrose (YPD) suplementado com 10% de cloreto de sódio (p/v) induziu a formação de células alongadas/semelhantes a pseudohifas a 37°C e 42°C (204). No entanto, ao contrário das formas filamentosas de *C. albicans*, que são observadas a 37°C, temperaturas abaixo de 25°C promoveram o crescimento de *C. auris* na forma de hifas, enquanto a temperatura de 37°C reprimiu esse crescimento (198, 201).

Embora *C. auris* seja capaz de aderir a superfícies biocompatíveis (plásticos) e formar biofilmes, essas capacidades são significativamente reduzidas em relação às de *C. albicans* (205). Por outro lado, *C. auris* expressa uma maior capacidade de formar biofilmes quando comparada com espécies do complexo *C. haemulonii* (197). *C. auris* possui 686 proteínas (proteínas ribossómicas, transportadores, enzimas diversas, factores de transcrição), relacionadas com a formação de biofilmes, sendo estes principalmente compostos por células de levedura, envolvidas numa quantidade limitada de matriz extracelular (206). Kean e colaboradores mostraram que sete genes que codificam para as adesinas (*IFF4*, *CSA1*, *PGA26*, *PGA52*, *PGA7*, *HYR3* e *ALS5*) são regulados

positivamente durante a formação do biofilme. Destes, quatro genes (*IFF4*, *CSA1*, *PGA26* e *PGA52*) que codificam para o glicosilfosfatidilinositol (GPI) ancorado na parede celular, foram regulados positivamente em todos os pontos de tempo estudados (4, 12 e 24 h) durante a formação de biofilme *in vitro*, enquanto dois genes que codificam para adesinas (*HYR3* e *ALS5*) foram regulados positivamente apenas em biofilmes maduros (24 h) (162). Além disso, vários genes, particularmente aqueles que codificam bombas de efluxo, como os homólogos de *MDR* e *CDR* e enzimas modificadoras de glicano com papel fundamental na formação da matriz extracelular do biofilme, foram sobre regulados durante a formação do biofilme, e a sua inibição melhorou a susceptibilidade dos biofilmes ao fluconazol (206).

In vivo, *C. auris* foi isolada sob a forma de biofilme a partir de vários dispositivos médicos, como cateteres, pontas de cateter central/periférico e derivações neurológicas (207). Esta espécie é igualmente capaz de formar biofilmes em superfícies e equipamentos ambientais (como sondas de temperatura reutilizáveis) no hospital e, por conseguinte, promover a transmissão nosocomial (208). A capacidade de formação de biofilme de *C. auris* ajudou a compreender o seu papel como um colonizador persistente e agente patogénico difícil de erradicar do ambiente hospitalar (207).

A espécie *C. auris* apresenta também a capacidade de evasão à resposta imunitária do hospedeiro. Assim, no modelo de pesquisa *in vivo* de peixe-zebra e em linhagens celulares de neutrófilos, foi demonstrado que a presença de *C. auris* recrutou um pequeno número de neutrófilos, sendo que esses neutrófilos careciam de atividade fagocítica efetiva e não libertavam no espaço extracelular as armadilhas extracelulares de neutrófilos NET (estruturas extracelulares compostas por DNA e proteínas antimicrobianas) (209). O estudo de Navarro-Arias e colaboradores observou que *C. auris* não induziu uma resposta inflamatória em células mononucleares do sangue periférico humano (monócitos), embora as células fúngicas tenham sido reconhecidas e fagocitadas por macrófagos. Estes resultados são sugestivos que o sistema imunológico do hospedeiro reconhece *C. auris*, mas não consegue montar uma resposta defensiva eficaz (210). Porém, Bruno e colaboradores observaram que *C. auris* está associada a um transcriptoma específico em células mononucleares humanas, tornando-se um forte indutor da defesa inata do hospedeiro (211).

Por outro lado, vários autores sugerem que *C. auris* é um agente invasivo apenas em condições de imunodeficiência ou imunossupressão do hospedeiro, como demonstrado em animais experimentais neutropênicos, deficientes na produção de elastase neutrofílica (murinos KnockoutNE^{-/-}), ou deficientes na fração C5 do sistema do complemento (murinos A/J deficiente em C5) (162, 212, 213).

É de referir que *C. auris* apresenta na sua parede celular uma composição de mananos, diferente de outras espécies de *Candida* spp., pois é rica em ligações β -1,2 que são importantes para a sua interação com as IgG-Anti *C. auris* presentes no sangue e nas glândulas sudoríparas do hospedeiro (214, 215). Outros autores observaram que um grupo de isolados clínicos de *C. auris*, incluindo estirpes resistentes ao fluconazol, mostrou-se sensível à histatina 5, péptido salivar, e à proteína anti-inflamatória anexina A, que regula a resposta dos neutrófilos no processo infeccioso por este agente patogénico (216, 217).

1.3.3.8.4 Colonização vs Infecção

Ao contrário de outras espécies de *Candida*, como *C. albicans*, *C. auris* não faz parte da microbiota do trato gastrointestinal (199, 218). *C. auris* apresenta especial predileção pela pele, sendo frequentemente isolada não apenas de exsudados axilares e inguinais, mas também de exsudados nasofaríngeos e anorretais (Fig. 1.5) (165). Além disso, é frequentemente isolada na urina e ouvido externo, e coloniza facilmente feridas (186). No entanto, o tecido com maior permissividade à multiplicação e transmissão entre hospedeiros parece ser a pele (169, 206). A partir da pele, esta levedura pode contaminar profissionais de saúde, equipamentos ou outras fontes inanimadas, fornecendo assim um reservatório para surtos hospitalares (219). Após colonizar a pele do doente, estas leveduras produzem um biofilme complexo de múltiplas camadas com adesão e densidades elevadas, proliferando em zonas do organismo, como dobras e superfícies cobertas que reproduzem as condições húmidas do suor (208). Este processo ocorre com frequência consideravelmente mais elevada ao de outras espécies, como *C. albicans* (192).



Figura 1.5. Colonização, factores de risco para infecção e manifestações clínicas de *Candida auris*. Adaptado de (199).

A transmissão horizontal de *C. auris* é amplamente facilitada pela sua capacidade de persistir sob formas viáveis no ambiente por longos períodos de tempo (199). *C. auris* é uma levedura funcionalmente bem adaptada ao ambiente nosocomial, resiste aos desinfetantes comuns, persiste em equipamentos médicos e nas superfícies secas do hospital até quatro semanas e coloniza rapidamente as mucosas axilar, inguinal e nasal dos doentes (219). Em meio hospitalar foram recuperadas leveduras viáveis de superfícies nos quartos e casas de banho, colchões, travesseiros, lençóis, mesas, pias, sanitas, paredes, maçanetas de portas e torneiras, bem como de material médico, como termómetros axilares, mangas de pressão arterial, ventiladores mecânicos e tubos, máscaras de oxigénio e dispositivos pessoais, como telemóveis (198, 199, 220). A presença de dispositivos médicos nos quais *C. auris* pode formar biofilmes acresce o risco

de colonização multifocal e persistência da colonização, o que diminui drasticamente as possibilidades da sua erradicação (180).

Alguns doentes podem ser colonizados de forma assintomática com *C. auris* durante longos períodos, e dessa forma contribuir para a contaminação ambiental e transmissão em hospitais ou outras unidades de cuidados de saúde. A transmissibilidade de *C. auris* e a alarmante estatística de que 5 a 10% dos doentes colonizados desenvolvem posteriormente candidemia tornam *C. auris* um grave problema de saúde pública (221). Num ambiente clínico, a colonização dos doentes ocorre rapidamente, poucas horas após a exposição, podendo durar semanas, meses ou até anos, apesar do uso de agentes como gluconato de clorhexidina (GCH), nistatina e equinocandinas (220, 222, 223). Face ao exposto, a colonização persistente pode levar a episódios repetidos de infeção invasiva ao longo de vários meses, independentemente de uma terapêutica antifúngica adequada (223, 224).

O estudo efetuado por Biswal e colaboradores, sobre a prevalência de colonização desta espécie nas mãos dos profissionais de saúde, verificou que 3% dos profissionais de saúde rastreados estavam colonizados (225). Por conseguinte, protocolos adequados de higienização das mãos devem ser implementados em ambiente clínico, pois a colonização de profissionais de saúde pode ser um importante veículo de transmissão de *C. auris* (220). Sobre a transmissão comunitária de *C. auris*, o conhecimento é quase nulo (187). Especula-se que a transmissão comunitária não seja detetada com frequência, pois os indivíduos colonizados não correm risco de infeção invasiva (226). Até ao momento, quase todos os casos de colonização documentados foram em doentes em unidades de saúde (227).

Estudos recentes nos EUA, demonstraram a eficácia da vigilância das águas residuais na deteção de *C. auris* (228, 229). O estudo efetuado no Nevada associou estirpes de *C. auris* isoladas de águas residuais a surtos hospitalares locais (228). Um estudo a nível nacional em 190 estações de tratamento de águas residuais em 41 estados dos EUA revelou uma ocorrência generalizada de *C. auris*, com deteções não limitadas aos estados que notificam casos clínicos (229). Estes estudos destacam o potencial da epidemiologia baseada em águas residuais como uma ferramenta de alerta precoce para a propagação de *C. auris*, oferecendo informações valiosas sobre a sua distribuição e prevalência para além dos dados de vigilância clínica.

1.3.3.8.5 Factores de risco para infeção em doentes colonizados por *C. auris*

A identificação precoce de factores de risco do hospedeiro pode ajudar a estimar a probabilidade de infeção e identificar uma população que poderá beneficiar do tratamento antifúngico precoce ou profilático. Os dados disponíveis sugerem que os factores de risco do hospedeiro predisponentes para infeções por *C. auris* não diferem dos associados às infeções por outras espécies de *Candida*. Assim, compreendem: cirurgia abdominal (25% a 77%), toma de antibióticos de largo espectro (25% a 100%), admissão em UCI (58%), diabetes *mellitus* (18%), presença de cateteres venosos centrais (CVC) (25% a 94%) e neoplasias (11% a 43%) (177, 186, 220, 230-232). O factor idade não parece constituir um factor de risco pois têm sido observadas infeções em doentes de todas as idades, desde bebés prematuros até adultos de idade avançada (177).

Compreender o mecanismo inato e adaptativo de defesa do hospedeiro contra as espécies de *Candida* é relevante para compreender as infeções por *C. auris* em diversos ambientes de saúde e comunitários. À semelhança da resposta imunitária para as outras espécies de *Candida*, a resposta imunitária inata tem um papel preponderante. Assim, a pele e a mucosa servem como barreira física inicial, enquanto os neutrófilos, monócitos e os macrófagos são responsáveis pela resposta inflamatória (209, 233). Além disso, o reconhecimento de padrões moleculares associados a organismos patogénicos fúngicos (PAMP) e à libertação de citocinas inflamatórias são cruciais para moldar a imunidade adquirida e induzir uma defesa a longo prazo contra *C. auris* (233). A atividade reduzida nestas barreiras protetoras pode permitir a colonização por *C. auris* em vários locais do organismo (ou seja, fossas nasais, canais auriculares externos, orofaringe, feridas e locais de saída de cateter) (234). Perante o exposto, compreende-se que os doentes hospitalizados ou institucionalizados são os mais suscetíveis ao desenvolvimento de infeção por *C. auris* (31, 64).

A apresentação clínica da infeção por *C. auris* é semelhante à de outras infeções por *Candida*. Como tal, para além da candidemia (195, 198), muitas outras infeções associadas a dispositivos intravasculares têm sido descritas, incluindo infeções associadas a cateteres venosos centrais e endocardite (186, 235-237), infeções do trato urinário e ou candidúria (223, 224), vulvovaginite (238), infeções do sistema nervoso central (239), infeções do trato respiratório (235), infeções intra-abdominais (240, 241), infeções de

pele e tecidos moles (170, 242), otite externa (153, 187, 243), otomastoidite (244), panoftalmite (245) e até osteomielite e espondilodiscite (246, 247).

1.3.3.8.6 Complicações, mortalidade e prognóstico

A candidemia é a manifestação clínica mais frequente da infecção por *C. auris*, e as suas complicações dependem de diversos factores. Alguns desses factores incluem características do agente patogénico, como o padrão de resistência ou virulência da estirpe. Refere-se ainda os factores dependentes da própria infecção, como a sua origem ou extensão, e os factores do hospedeiro, como a presença de comorbilidades e limitações terapêuticas devido a parâmetros farmacodinâmicos ou farmacocinéticos na disponibilidade dos fármacos (37).

Nos doentes com candidemia pode ocorrer disseminação sanguínea para órgãos diferentes, conduzindo a uma infecção generalizada, metástase séptica, choque séptico, falência de órgãos múltipla e, finalmente, em muitas ocasiões, morte, apesar da instituição de uma terapêutica antifúngica adequada. Além disso, a colonização e infecções localizadas podem levar ao aparecimento, perpetuação ou recidiva da candidemia meses após o tratamento adequado (231, 234).

A mortalidade das infecções invasivas causadas por *C. auris* é comparativamente superior à maioria das espécies de *Candida* e varia de 30% a mais de 70%, de acordo com os estudos disponíveis (113, 248). A deteção precoce e o tratamento imediato estão associados a uma maior taxa de sobrevivência (180).

1.3.3.9 Outras espécies de *Candida* não-*albicans*

Candida palmioleophila é outra espécie de levedura frequentemente mal identificada como *C. famata* ou *C. guilliermondii*. Um estudo na Dinamarca identificou entre os isolados da corrente sanguínea, oito isolados de *C. palmioleophila*, todos com valores elevados de CMI para o fluconazol (40).

Candida kefyr, *Candida norvegensis*, *Candida zeylanoides*, *Candida blankii* e *Candida famata*, entre outras espécies menos relevantes (Tabela 1.3-pág. 20, 21), causam menos de 1 % das infecções da corrente sanguínea e outras infecções profundas. Todas estas

espécies são dignas de nota porque podem ser detetados isolados ocasionais resistentes a antifúngicos (40, 88). Por outro lado, algumas destas espécies podem não ser corretamente identificadas porque foram recentemente reclassificadas taxonomicamente e atualmente são incluídas em géneros que não o género *Candida*: *Pichia* (*Candida norvegensis*), *Lindnera* (*Candida utilis*), *Debaryomyces* (*Candida famata*), *Khuyveromyces* (*Candida kefir*), *Trichomonascus* (*Candida cifferii*), *Yarrowia* (*Candida lipolytica*) (74).

1.4 Metodologias aplicadas ao estudo da micobiota e do micobioma

A comunidade fúngica pode ser estudada através de abordagens microbiológicas baseadas em métodos culturais ou moleculares. Embora a identificação de fungos baseada em culturas continue a ser a técnica de referência na prática clínica, está associada a um elevado consumo de tempo, à capacidade limitada de identificar uma vasta gama de microrganismos, particularmente espécies com exigências de crescimento elevadas e à incerteza na discriminação entre espécies diferentes devido às análises fenotípicas das colónias obtidas.

O desenvolvimento das técnicas de biologia molecular revolucionou o estudo do micobioma, permitindo a identificação rápida e fiável de fungos através de métodos como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) (140). Acrescente-se que graças às técnicas de sequenciação de nova geração (NSG), tornou-se possível a identificação exaustiva das comunidades microbianas presentes em numerosos micronichos do corpo humano (23). Porém, convém referir que embora a sequenciação permita a identificação de um espectro mais alargado de fungos não cultiváveis, as culturas realçam o potencial relativo de crescimento de diferentes espécies de fungos em condições favoráveis. Além disso, para determinar o perfil de susceptibilidade a agentes antifúngicos ainda é necessário a utilização de métodos baseados em culturas (249). As comunidades fúngicas podem ser ainda estudadas através da utilização de uma combinação de métodos microbiológicos convencionais e análise molecular. Esta abordagem metodológica é relativamente comum e foi utilizada, entre outros, por Hamm e colaboradores para ajudar a discriminar a variação sazonal e a preferência de micro-habitat de fungos queratinofílicos (250).

A identificação precoce, rápida e precisa de fungos potencialmente patogénicos é importante para orientar a seleção da terapêutica antifúngica adequada e, assim, melhorar os resultados dos doentes, bem como para fins epidemiológicos. No entanto, os atuais métodos fenotípicos de identificação baseados nas características morfológicas, de crescimento, bem como em aspetos fisiológicos e bioquímicos, não são precisos, e requerem conhecimentos consideráveis para a identificação morfológica correta de fungos menos comuns (251, 252).

A identificação fenotípica dos fungos é um método tradicional que se baseia na análise das características morfológicas e bioquímicas dos organismos. Este processo tem início com a observação de colónias fúngicas em diferentes meios de cultura, particularmente no meio universal para fungos, Sabouraud Dextrose Agar. A avaliação compreende as características macroscópicas, como cor, textura e forma, e a análise microscópica para observar as estruturas vegetativas e de reprodução assexuada (conidiogénese e esporangiógenese). No que se refere aos fungos leveduriformes, os meios cromogénicos têm sido uma ferramenta básica para a identificação de espécies de *Candida* durante algumas décadas (253).

As espécies de *Candida* são identificadas com base na cor da colónia e, no caso de *C. krusei*, na textura da colónia. Existem muitas formulações diferentes comercialmente disponíveis (CHROMagar Candida®, BBL CHROMagar Candida®, CAN2®, Candida ID® e Brilliance Candida Agar®), mas a maioria permite a identificação apenas de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e, dependendo da formulação, *C. glabrata* (254). A identificação fenotípica também pode envolver testes bioquímicos, como a assimilação de carboidratos [auxonograma (API20CAUX®) e (API32C®)] e a produção de enzimas específicas (API Candida®). Estes testes ajudam a diferenciar espécies com características morfológicas semelhantes. Apesar da sua utilidade, a identificação fenotípica pode ser limitada pela variabilidade dentro das espécies e pelas condições de cultura, que podem influenciar a expressão das características fenotípicas (2).

O surgimento de novas espécies fúngicas, nomeadamente do género *Candida* representa um desafio, pois nem sempre é possível dispor de metodologias atualizadas para uma identificação correta. Uma ferramenta de diagnóstico ideal deve ser rápida, sensível, específica, barata, e capaz de detetar a maioria das variáveis desejadas. Os métodos de identificação de leveduras baseados em fenótipo, como os meios

cromogénicos, testes bioquímicos ou sistemas automatizados, podem ser utilizados para identificar as espécies mais comuns de *Candida*, mas não detetam as espécies raras, nem tão pouco as espécies crípticas dos diferentes complexos (255, 256).

Assim, a identificação adequada de espécies de *Candida* requer a utilização de métodos moleculares fundamentados em plataformas diferentes, como a espectrofotometria de massa e as técnicas proteómicas, *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS), a PCR (257, 258) ou a identificação molecular baseada na sequenciação da região ITS/D1-D2 do DNA ribossómico (259). Por conseguinte, a utilização de métodos moleculares tem revolucionado a taxonomia e a ecologia dos fungos, ligando-as cada vez mais à genómica e à biologia funcional (260).

A tecnologia de espectrofotometria de massa associada ao MALDI-TOF é utilizada frequentemente na identificação de uma variedade de espécies fúngicas (particularmente fungos leveduriformes) com base nos seus perfis de espectrofotometria de massa (261). Esta metodologia tem sido usada para identificar corretamente e de uma forma rápida, os isolados de espécies inicialmente mal identificados como espécies de *Candida* por diferentes sistemas (256, 262). No entanto, a disponibilidade de uma base de dados espectral atualizada, contendo as assinaturas digitais de massa do péptido específico da espécie que se está a tentar identificar é a principal limitação desta metodologia. Acrescente-se ainda que se trata de uma tecnologia dispendiosa (263).

A utilização das metodologias moleculares tem permitido a identificação de forma mais fiável de algumas espécies de *Candida* não-*albicans*. Por exemplo a identificação de *C. lusitaniae* fica comprometida com o recurso a técnicas micológicas convencionais, incluindo os meios cromogénicos e os testes de assimilação de açúcares (148). É igualmente difícil distinguir com precisão as espécies do complexo *guilliermondii* das espécies relacionadas, tais como *Candida famata* e *C. haemulonii*, utilizando métodos baseados no fenótipo, devido à grande heterogeneidade na morfologia e nos perfis de assimilação de carbono (264). *C. kefyr* e *C. palmioleophila* são outras espécies de *Candida* apenas distinguíveis por sequenciação e perfil MALDI-TOF (88).

Tem-se observado um aumento no desenvolvimento de métodos moleculares para a discriminação específica de espécies crípticas de *Candida* (130, 257, 265). Estes métodos moleculares pretendem ser alternativas económicas para implementação em diagnósticos

microbiológicos de rotina. Porém, apresentam a desvantagem de necessitarem de uma identificação prévia ou, pelo menos, de uma suspeita de qual o complexo de *Candida* a estudar. Face à variedade de ensaios moleculares com diferentes formatos e aplicações, pode ser difícil selecionar o método mais apropriado. Um aspeto significativo são os requisitos de equipamentos e o custo associado a cada teste.

As metodologias de sequenciação baseadas no DNA, tais como a sequenciação de amplicões e a metagenómica *shotgun*, têm vindo a ser utilizadas em Micologia, particularmente em estudos sobre o micobioma humano (266). Porém, a falta de uma metodologia robusta e normalizada que caracterize com exatidão toda a diversidade fúngica de comunidades complexas continua a ser uma limitação neste domínio (267). Nas bactérias, o gene 16S rRNA, com as suas regiões conservadas e hipervariáveis intercaladas, permite uma seleção eficaz da maior parte do domínio bacteriano conhecido, bem como uma diferenciação razoável entre os taxa bacterianos. Um alvo comparável para os fungos ainda não foi utilizado de forma consistente em todos os estudos. Os principais candidatos a alvos genómicos fúngicos são regiões do cistrão ribossómico dos eucariotas, incluindo os genes rDNA das subunidades pequena (SSU; 18S) e grande (LSU; 28S), separados pela região do espaço interno transcrito (ITS) — que contém o gene 5.8S ladeado pelas sequências ITS1 e ITS2 (Fig. 1.6).

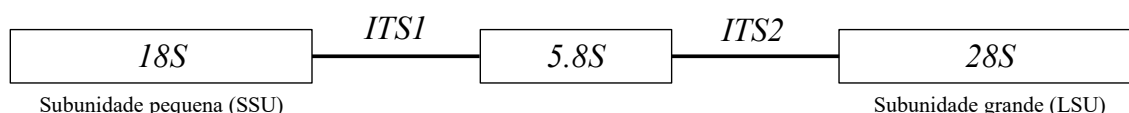


Figura 1.6. O cistrão ribossómico fúngico. ITS, espaço interno transcrito; SSU, subunidade pequena; LSU, subunidade grande. Adaptado de (266).

A sequenciação da região ITS do DNA ribossómico fúngico, foi proposta como a principal ferramenta para a identificação de fungos (Fig. 1.6) (268). Esta zona que dispõe de um número de cópias elevado, oferece a melhor precisão ao nível de espécie e permite a criação de *primers* universais (268, 269). Trata-se de uma plataforma com especificidade elevada, que permite detetar novas espécies, rapidamente (cerca de 8 h) mas precisa de amplificação prévia por PCR. Apesar da disponibilidade de bases de dados públicas é ainda necessário uma interpretação cuidada dos resultados (259). Assim, as sub-regiões ITS1 e ITS2 têm sido utilizadas por vários autores que desenvolveram

diversos protocolos de biologia molecular tendo em conta os objetivos das investigações (16, 107, 265, 270-272). Cada alvo tem limitações, e ainda não está claro como esses vieses afetam especificamente os esforços para caracterizar a diversidade taxonómica típica da microbiota humana (267).

1.4.1 Identificação dos complexos *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*

As espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis* apresentam a mesma cor das colónias em meios cromogénicos, produzem tubos germinativos (prova da blastese positiva) e clamidósporos em meios de farinha de milho (*Corn Meal*) (Tabela 1.4). Vários meios de cultura seletivos foram propostos para distinguir *C. albicans* de *C. dubliniensis*, nomeadamente o meio de Pal (semente de girassol) e de tabaco (87). Os isolados de *C. africana* estudados até à data, apresentam um crescimento e produção de hifas mais lento relativamente às outras espécies do complexo e podem ser distinguidos tanto pela incapacidade de assimilar vários açúcares (como a trealose) ou de produzir clamidósporos, como pelas suas características macroscópicas em meio cromogénico (Tabela 1.4) (273, 274).

Tabela 1.4. Características fenotípicas do complexo *Candida albicans*. Adaptado de (105).

Espécies	Prova da blastese	Cultura em <i>Corn Meal Agar</i>		Crescimento ^a			Assimilação da trealose	Cor das colónias em CHROMagar	Crescimento em meio com cicloheximida	Velocidade de crescimento ^b
		Hifas	Clamidósporos	30°C	37°C	42°C				
<i>C. albicans</i>	+	Abundantes	Presentes	+++	++++	+++	+	Verde-maçã	+	100
<i>C. dubliniensis</i>	+	Abundantes	Presentes	++	+++	+/-	+	Verde-maçã	+	85
<i>C. africana</i>	+	Raras	Ausentes	++	++	+	-	Verde-turquesa	+	50

^a Crescimento: -, não detetável; +/-, escasso; +, detetável; ++, bom; +++, abundante; +++++, prolífico.

^b Velocidade de crescimento expressa como uma percentagem relativa à observada em isolados de *C. albicans*.

No entanto, nenhum destes métodos fenotípicos utilizados isoladamente é completamente fiável na sua separação, sendo necessária a identificação molecular para a identificação correta das espécies do complexo *C. albicans* (87, 105).

Apesar dos dados epidemiológicos considerarem que clinicamente não é necessário distinguir as espécies do complexo *albicans*, como referido anteriormente, várias metodologias moleculares foram desenvolvidas para diferenciar *C. dubliniensis* e *C.*

africana de *C. albicans*. Os métodos baseados em diferenças nas sequências do intrão do gene *ACT1* de *C. dubliniensis* e *C. albicans*, são reprodutíveis, mas não distinguem todas as estirpes (275). Portanto, têm sido utilizadas as sequências de aproximadamente 35 pb da região ITS2 e do gene *HWPI* para permitir a identificação, sendo amplamente empregadas em estudos epidemiológicos (270, 272, 276, 277).

C. nivariensis e *C. bracarensis* partilham muitas características fenotípicas com *C. glabrata*, incluindo a incapacidade de formar tubos germinativos, pseudohifas, clamidósporos ou ascósporos (78, 79). A identificação molecular das espécies do complexo *C. glabrata* inclui métodos demorados como hibridação *in situ* com sondas específicas e uma hibridação *in situ* com ácido nucleico peptídico fluorescente (PNA-FISH), além de protocolos de PCR seguidos por digestão enzimática (278). Outros protocolos utilizam PCR com análise por eletroforese capilar ou HPLC desnaturante, mas são demorados e requerem equipamentos caros (279, 280).

Tal como para o complexo *C. albicans* e *C. glabrata*, os métodos microbiológicos convencionais não permitem discriminar as espécies do complexo *C. parapsilosis*, uma vez que as três espécies têm as mesmas características morfológicas, crescimento e assimilação de glúcidos e perfis de fermentação. Embora estas espécies sejam tipicamente brancas em CHROMagar Candida®, foram observadas neste meio duas estirpes de *C. orthopsilosis* com uma pigmentação rosa e podem ser confundidas com *C. glabrata* (colônia rosa) se não forem realizados testes complementares (252). Apenas as metodologias moleculares permitem a discriminação entre as espécies do complexo, sendo possível utilizar métodos de PCR, como PCR-RFLP (genes *SADH*, *FSK1* e *MnSOD*) ou PCR em tempo real (ITS1, mtDNA, IGS1, gene *SADH*) (258, 262).

Atualmente, os métodos mais fiáveis para separar as espécies crípticas destes complexos contemplam a sequenciação dos domínios ITS e /ou D1/D2 do rDNA e/ou MALDI-TOF MS (111, 252, 264).

1.4.2 Identificação de *Candida auris*

1.4.2.1 Cultura, crescimento e fenótipos

Com base apenas em métodos microbiológicos convencionais, é particularmente desafiante para os micologistas distinguir corretamente esta espécie. Após 24 h de incubação a 37°C em Sabouraud dextrose agar (SDA), é possível observar colônias de *C. auris* lisas, opacas e de cor branca a creme. A maioria das formulações de meios cromogênicos não são capazes de distinguir de forma confiável esta espécie, pois as colônias podem aparecer de cor creme, rosa ou roxo pálido e são semelhantes a outras espécies de *Candida* spp. (Fig. 1.7) (169).

Face ao exposto, o crescimento em meio cromogênico não pode ser usado como método primário de identificação. No entanto, estes meios de cultura são úteis para triagem, para identificar colônias suspeitas em culturas mistas, incluindo a presença de *C. albicans*. Se houver evidência de espécies não-*albicans* em agar cromogênico devem ser reinoculadas em meio de Sabouraud e identificadas de acordo com protocolos laboratoriais localmente instituídos.

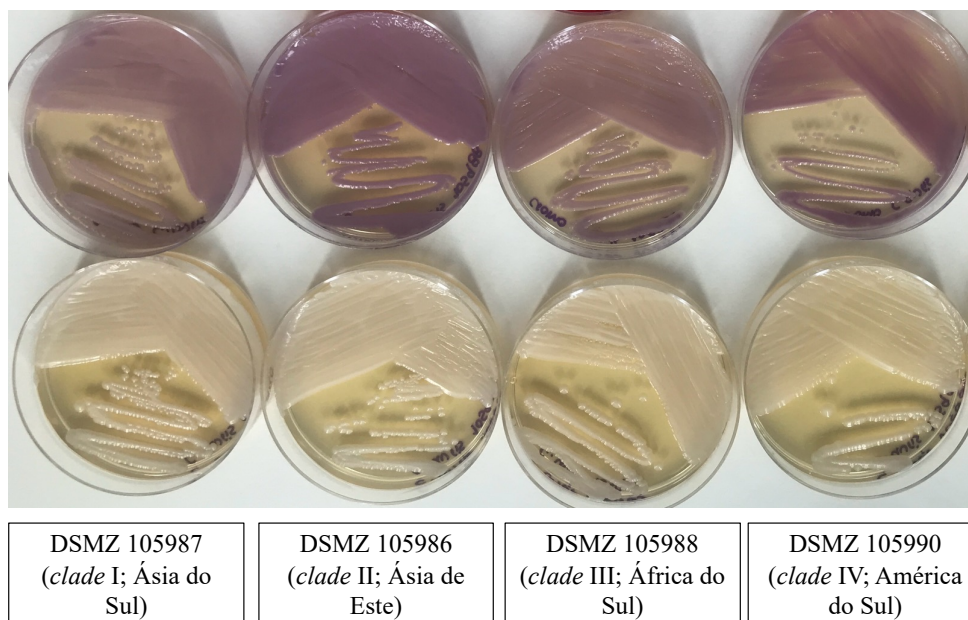


Figura 1.7. Observação macroscópica das colônias de *C. auris* dos *clades* I, II, III e IV, após 48 horas de incubação a 37°C em CHROMagar Candida. As colônias de *C. auris* apresentam-se pequenas e normalmente desenvolvem uma cor com várias tonalidades de rosa (painel superior). Após 48 horas de incubação a 37°C em Sabouraud Dextrose Agar (SDA), as colônias permanecem geralmente brancas e cremosas (painel inferior) (Figura criada pelo autor).

Recentemente, duas novas formulações de meios cromogénicos foram desenvolvidas especificamente para a identificação adicional de *C. auris*, CHROMagar Candida plus® (CHROMagar, França) e o meio seletivo HiCrome *C. auris* MDR® (HiMedia, Mumbai, Índia) (281, 282).

Quando testados lado a lado contra 49 isolados de *Candida* spp., incluindo representantes dos quatro principais *clades* de *C. auris*, apenas CHROMagar Candida plus® distinguiu corretamente todos os isolados de *C. auris* (283) (Fig. 1.8). No entanto, com CHROMagar Candida plus®, houve identificações falso-positivas com as espécies intimamente relacionadas, *Candida vulturna* e *C. pseudohaemulonii*. Por esta razão, a identificação das colónias suspeitas de serem *C. auris* apenas com base na cor da colónia em meio cromogénico, deve ser confirmada por sequenciação ou espectrometria de massa MALDI-TOF MS (283, 284).

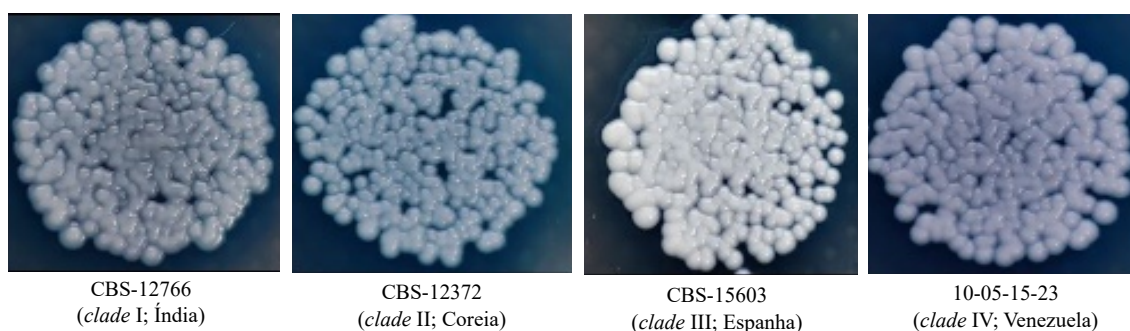


Figura 1.8. Aspeto das colónias de *C. auris* dos quatro *clades* descritos no CHROMagar TM Candida Plus após 48 h de incubação a 35 °C. Os isolados de *C. auris* desenvolveram colónias semelhantes em termos de tamanho (pequeno) e textura (convexas brilhantes). Os isolados de *C. auris* da Venezuela, Índia e Coreia exibiram colónias de tonalidade azul, enquanto os isolados de Espanha exibiram uma tonalidade rosa-claro com uma auréola azulada que se difunde no agar circundante. Adaptado de (284).

Embora *C. auris* não seja capaz de crescer em meios com cicloheximida, pois o seu crescimento é inibido pela cicloheximida a 0,1 e 0,01% (v/v), *C. auris* apresenta uma termo e halo tolerância marcadas. Esta espécie é capaz de se multiplicar num intervalo de temperatura de 37 a 42°C, característica que ajuda a diferenciar *C. auris* de *C. haemulonii*, que não cresce a temperaturas elevadas (171). *C. auris* é também capaz de crescer na presença de 10% (p/v) de cloreto de sódio, ao contrário de outras espécies de *Candida* ou fungos filamentosos (199). Estas características particulares, além dos meios cromogénicos modificados, também podem ser utilizadas para a sua identificação presuntiva.

Ao microscópio, as células leveduriformes de *C. auris* apresentam-se ovais, redondas a ovoides, de forma isolada ou em gemulação de 2 a 3 por 2,5 a 5 μm , semelhantes a *C. glabrata*, sem capacidade de formarem hifas verdadeiras (Fig. 1.9) (285). Esta espécie não forma tubos germinativos no soro, nem clamidósporos em *Corn meal* agar (199). No entanto, *C. auris* pode exibir múltiplos fenótipos morfológicos sob diferentes condições culturais, incluindo formas arredondadas a ovoides, alongadas e pseudohifas. Por exemplo, concentrações elevadas de cloreto de sódio induzem a formação de pseudohifas, sendo demonstrado por Fan e colaboradores, a possibilidade de formação de pseudohifas para os quatro ramos fileogeográficos principais (203).

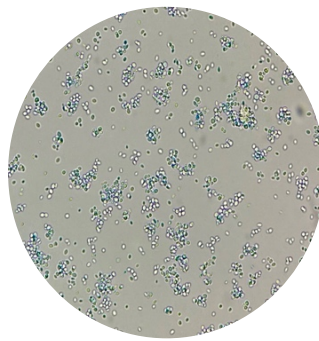


Figura 1.9. Observação microscópica de *C. auris* numa preparação com azul de lactofenol após 72h de incubação em SDA a 37°C. Pequenas células leveduriformes em gemulação (ampliação 400x), imagem de autor.

Em termos metabólicos, *C. auris* fermenta a glucose e fracamente a sacarose e a trealose, mas não é capaz de fermentar a galactose, maltose, lactose ou rafinose. A assimilação de carboidratos é observada para a glucose, sacarose, maltose, D-trealose, D-rafinose, D-melesitose, inulina (fraca), amido solúvel, ribitol (fraco), galactitol, D-manitol, sorbitol e citrato. *C. auris* assimila N-acetilglucosamina, succinato e gluconato como fontes de carbono. Esta propriedade de assimilação parece diferir entre espécies de diferentes origens geográficas, sendo observada em isolados indianos, brasileiros e sul-africanos, mas não em japoneses e coreanos (169). Como fonte de azoto, a levedura utiliza o sulfato de amónio, cadaverina e L-lisina; o nitrito de sódio, nitrato de potássio e etilamina não são utilizados por *C. auris*. A formação de amido, a atividade da urease e a reação de diazónio azul B não são evidenciadas por esta espécie de *Candida* (169).

Este perfil de assimilação e fermentação glucídica também possibilita o desenvolvimento de meios de cultura sensíveis e específicos baseados em manitol, dextrose e dulcitol para isolar e identificar presuntivamente *C. auris* na prática clínica.

Welsh e colaboradores descreveram o uso de um caldo de enriquecimento para triagem de *C. auris* a partir de amostras clínicas e ambientais com 100% de especificidade e sensibilidade (205). Mais recentemente, dois outros meios de cultura seletivos não comerciais para *C. auris* foram desenvolvidos por Das e colaboradores e Ibrahim e colaboradores (286, 287).

Devido à estreita relação genética com o complexo *C. haemulonii*, *C. auris* é, com frequência mal identificada, como *C. haemulonii* em laboratórios de diagnóstico de rotina com os métodos bioquímicos. De facto, os testes bioquímicos comercialmente disponíveis, incluindo API20C AUX®, VITEK-2 YST, BD Phoenix e MicroScan, identificam esta espécie incorretamente como *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* ou, menos frequentemente, como outras espécies de *Candida*, como *C. haemulonii*, *C. famata*, *C. duobushaemulonii*, *C. sake*, *C. lusitaniae*, *C. catenulate*, *C. albicans*, *C. guilliermondii* ou *C. parapsilosis* (84, 171, 180, 253, 288-291). Assim, *C. auris* pode ser identificada como outras espécies de *Candida* ou mesmo como outros géneros de fungos leveduriformes quando se recorrem a sistemas comerciais como API20C® (*Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae*), VITEK-2 YST® (*C. haemulonii*, *C. duobushaemulonii*), BD Phoenix® (*C. haemulonii*, *C. catenulate*), e MicroScan® (*C. famata*, *C. guilliermondii*) (289).

1.4.2.2 Metodologias moleculares na identificação de *C. auris*

A sequenciação de DNA desempenhou um papel importante, primeiro, na descoberta inicial de que *C. auris* era uma nova espécie e, em seguida, na identificação correta de *C. auris* e na sua delimitação das espécies intimamente relacionadas no complexo de espécies *haemulonii* (242). A identificação molecular de *C. auris* pode ser realizada por sequenciação de vários *loci* genéticos (incluindo D1 / D2, RPB1, RPB2, ITS1 e ITS2) (163, 171). Infelizmente, a sequenciação do DNA não está disponível na maioria dos laboratórios de microbiologia clínica e a maioria das sequenciações é realizada em laboratórios de referência. A PCR convencional, usando *primers* específicos da espécie e/ou análise de RFLP, pode ser incorporada num fluxograma para deteção e identificação de *C. auris* no qual o meio cromogénico é usado para rastrear possíveis isolados e a PCR tradicional é utilizada para confirmar a identidade (Fig. 1.10) (292).

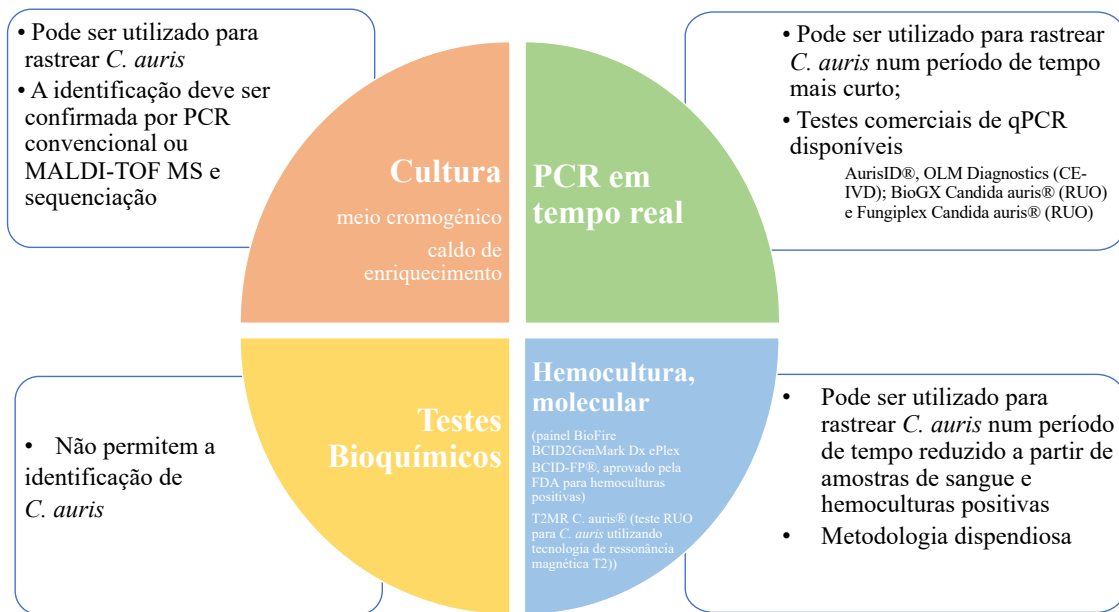


Figura 1.10. Métodos disponíveis para o isolamento e identificação de *C. auris* (Figura criada pelo autor).

Uma série de ensaios de PCR em tempo real e um ensaio de amplificação isotérmica (LAMP) foram desenvolvidos para *C. auris* com diversos métodos de extração de DNA, *primers* e programas de amplificação (293-295). Desde há alguns anos, já existem protocolos de PCR em tempo real disponíveis comercialmente: Auris ID® (OLM, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido) e Fungiplex Candida Auris RUO® (Bruker, Bremen, Alemanha), que demonstraram identificar de forma confiável *C. auris*, mesmo para baixas concentrações de DNA (296). Estes ensaios incluem *primers* e enzimas pré-misturadas e podem ser usados em amostras de vigilância ou diretamente do sangue, de uma forma semi automatizada, como é exemplo a utilização do kit BioGX Candida auris® (BioGX, Birmingham, AL) para o equipamento BD Max® (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) (Fig. 1.10) (296-298).

Outros testes moleculares incluem um ensaio de ressonância magnética (RM). A T2 Biosystems® (Lexington, MA) desenvolveu originalmente este teste rápido de diagnóstico específico para a deteção de *C. auris* em amostras de sangue, já adaptado para amostras de pele em estudos de triagem de colonização (299). O painel T2Cauris® está apenas comercializado para uso em investigação (RUO) e ainda não foi autorizado para utilização em diagnóstico. Nos Estados Unidos, a FDA aprovou o painel GenMark

Dx ePlex BCID-FP® e o painel BCID 2® da BioFire para a detecção de *C. auris* em hemoculturas positivas (253).

A tecnologia de espectrometria de massa (MALDI-TOF) pode diferenciar com segurança *C. auris* de outras espécies de *Candida*, desde que o espectro de *C. auris* esteja incluído no banco de dados de referência e seja efetuado o método de extração apropriado (261, 288). Atualmente, a identificação precisa de *C. auris* pode ser conseguida com as novas versões dos sistemas MALDI-TOF, com inclusão dos espectros específicos nos bancos de dados, ou ensaios de PCR específicos para *C. auris* (178, 283). Por conseguinte, é importante suspeitar da presença desta espécie na presença das características fenotípicas seguintes: levedura oval a alongada, colónias rosa a bege formadoras de pseudohifas em agar cromogénico, ou rosa com um halo azul em CHROMagar Candida plus®, capaz de crescer a 42°C, inconsistente com o resultado da identificação obtido a partir do perfil bioquímico e uma CMI elevada para o fluconazol (superior a 8 µg/mL) (253, 300). Por conseguinte, pode concluir-se que metodologias como MALDI-TOF MS e a sequenciação permitem a identificação de *C. auris* com um elevado grau de confiança, mas são técnicas relativamente dispendiosas (253).

1.5 Susceptibilidade às moléculas antifúngicas

O facto de os fungos serem seres eucarióticos com estreita relação evolutiva com os hospedeiros humanos, animais e plantas faz com que os grupos de antifúngicos utilizados no combate às infeções fúngicas sejam limitados. No entanto, o conhecimento detalhado da estrutura, composição e bioquímica das células fúngicas, e das várias facetas das infeções que elas causam, tem contribuído para a compreensão dos alvos e do mecanismo de ação de muitos desses agentes (54).

Apesar dos esforços de investigação em curso sobre novos compostos terapêuticos e estratégias de tratamento, apenas um número limitado de opções está disponível para o tratamento da candidose (301). Atualmente, o arsenal de antifúngicos sistémicos disponíveis para o tratamento da candidose em UCI compreende os polienos, azóis, equinocandinas e fluoropirimidinas, sendo os três primeiros mais relevantes (302). Estes antifúngicos atuam na membrana citoplasmática interferindo no metabolismo do ergosterol e/ou inibindo a via metabólica de resposta ao *stress*, como é o caso dos polienos

e azóis, ou inibindo a síntese do DNA, alvo das fluoropirimidinas, ou ainda sobre a síntese da parede celular fúngica, ação das equinocandinas (Fig. 1.11).

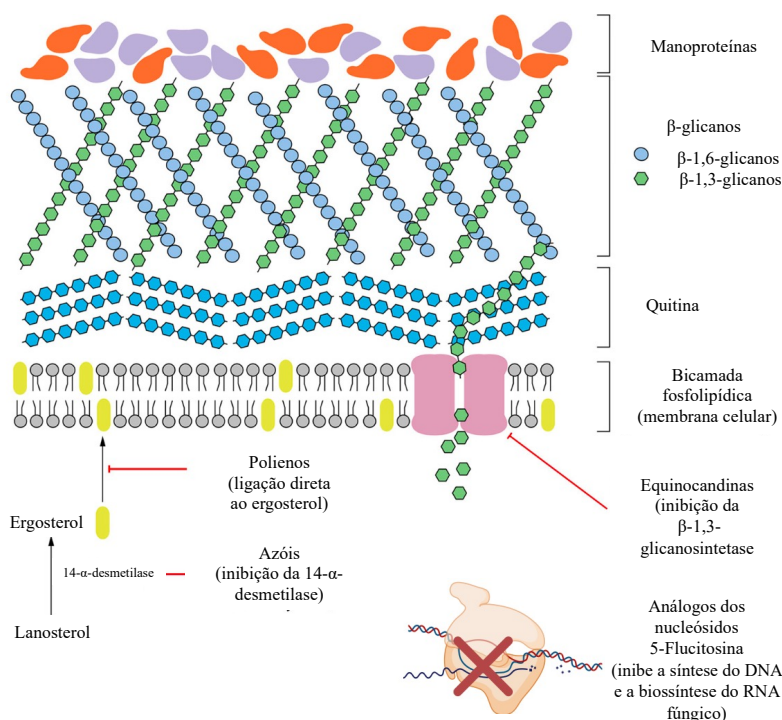


Figura 1.11 Representação da estrutura da parede, membrana celular e síntese de DNA/RNA de *Candida* spp., destacando as classes de fármacos antifúngicos e os seus mecanismos de ação (Figura criada pelo autor).

1.5.1 Fármacos Antifúngicos

Polienos

Os polienos (anfotericina B e nistatina) ligam-se ao ergosterol da membrana celular fúngica, criam poros e promovem desta forma o desequilíbrio hidroeletrolítico e, conseqüentemente, a morte celular (Fig. 1.11). O desoxicolato de anfotericina B é um composto anfotérico, produto da fermentação de *Streptomyces nodosus*. A anfotericina B (AnfoB) ainda é considerada o tratamento de eleição para a maioria das infecções fúngicas, especialmente das infecções invasivas graves (303). O desoxicolato de AnfoB apresenta um espectro de ação largo, atividade fungicida, e ação sobre a maioria das espécies de *Candida* (301). A anfotericina B é igualmente tóxica para as células de mamíferos, sendo particularmente nefrotóxica. Para ultrapassar este efeito secundário, foram introduzidas várias formulações lipídicas de anfotericina B que são melhor toleradas (304).

Azóis

Os triazóis bloqueiam a síntese do esterol principal das membranas fúngicas, o ergosterol, por inibição da 14- α -desmetilase, uma proteína membranar envolvida na sua biossíntese (codificada pelo gene *ERG11* em leveduras) (Fig. 1.11). Este bloqueio tem três efeitos principais: (a) esgotamento do ergosterol e alterações na permeabilidade da membrana, (b) alterações na atividade das proteínas ligadas à membrana, algumas das quais estão envolvidas na síntese da parede celular e (c) síntese de esteróis tóxicos como resultado da acumulação de 14- α esteróis metilados (Fig. 1.11) (305). Os triazóis incluem o fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, e mais recentemente, o isavuconazol (306).

Esta classe de antifúngicos apresenta principalmente atividade fungistática e um largo espectro de ação, o que se traduz no facto dos azóis serem os antifúngicos de primeira linha na terapêutica profilática (307). Muitos azóis estão disponíveis para administração intravenosa e oral com elevada biodisponibilidade, embora de absorção não controlada (formulações de suspensões orais) (2). Apresentam atividade sobre a maioria das espécies de *Candida* e são geralmente bem tolerados (308). O isavuconazol, é o triazol mais recente, apresenta largo espectro, pode ser administrado com uma toma diária e com significativa atividade *in vitro* em fungos leveduriformes (306). A inibição enzimática destas moléculas não é apenas limitada às células fúngicas e a classe é associada com a inibição das enzimas do citocromo P450 conduzindo a interações potencialmente perigosas entre fármacos (303). A utilização clínica da classe é também restringida por vários efeitos secundários, incluindo alucinações, hepatotoxicidade, e prolongamento da onda QTc no eletrocardiograma (intervalo QT cardíaco que determina o tempo entre a contração e o relaxamento dos ventrículos cardíacos) (309).

Equinocandinas

As equinocandinas, caspofungina, micafungina e anidulafungina, pertencem a uma classe de lipopéptidos semissintéticos. Estes antifúngicos atuam por inibição da 1,3- β -D-glicano sintetase, que catalisa o primeiro passo no alongamento de 1,3- β -D-glicano, um componente importante da parede celular das células leveduriformes juntamente com a quitina e as manoproteínas (Fig. 1.11) (309). As equinocandinas apresentam um espectro de atividade largo, com ação fungicida sobre as espécies de *Candida*. Por conseguinte,

continuam a ser uma das opções de tratamento de primeira linha na candidemia e CI (30, 70). As equinocandinas são bem toleradas, com efeitos adversos ou interações medicamentosas limitadas. A sua utilização é limitada pela falta de formulações orais, com todas as equinocandinas atualmente disponíveis apenas como infusões intravenosas (301).

1.5.2 Mecanismos de resistência aos antifúngicos

A resistência aos antifúngicos refere-se a uma variante genética (intrínseca ou adquirida) que é transmitida geracionalmente e permite que o fungo cresça sob concentrações elevadas de fármacos antifúngicos (310).

A resistência antifúngica é normalmente adquirida devido a alterações que afetam direta ou indiretamente a interação fármaco-alvo. Causalmente, a resistência pode surgir através de alterações genéticas no local de ligação ao alvo (por exemplo, para os azóis, a mutação dos genes que codificam a lanosterol desmetilase ou para as equinocandinas, a β -glicano sintetase), através da sobre expressão da quantidade de alvo disponível e/ou através da alteração da concentração eficaz do fármaco (através de uma elevada atividade de efluxo para antifúngicos intracelulares como os azóis) (Tabela 1.5). Por outro lado, a tolerância antifúngica refere-se à capacidade das células sensíveis aos antifúngicos crescerem na presença de concentrações de fármacos acima da concentração mínima inibitória (CMI) e envolve uma vasta gama de respostas gerais ao *stress* e/ou vias epigenéticas. A tolerância é mais evidente em antifúngicos de atividade fungistática, e tem sido caracterizada mais extensivamente nos isolados de *C. albicans* e com fluconazol (311). No entanto, a sua importância clínica permanece em aberto (158).

Tabela 1.5. Mecanismos de resistência aos antifúngicos. Adaptado de (158).

Mecanismos de Resistência	Azóis	Polienos	Equinocandinas
Modificação do local alvo	Sim		Sim
Abundância do alvo	Sim	Sim	
Sobre expressão do local alvo	Sim		
Bombas de efluxo	Sim		
Formação de biofilme	Sim	Sim	Sim

A heterogeneidade fenotípica também pode alterar a susceptibilidade antifúngica. Por exemplo, a formação de biofilme, um estado fisiológico de células multimórficas, é uma via não genética para a resistência e/ou tolerância (Tabela 1.5). As células fúngicas nos biofilmes produzem uma matriz extracelular, que atua como um depurador de fármacos, reduzindo a sua concentração efetiva nas células no interior do biofilme (158). Além disso, os estados epigenéticos que são mantidos por processos hereditários transitórios, tais como modificações de cromatina, podem afetar a resistência e/ou tolerância aos antifúngicos. Isto é exemplificado por inibidores de desacetilases de histonas que quando mutantes, alteram as respostas antifúngicas *in vitro* (311).

As vias de aquisição de resistência e/ou tolerância aos fármacos antifúngicos variam consoante o modo de ação. Os mecanismos generalizados de resistência e tolerância antifúngica estão ilustrados na Figura 1.12.

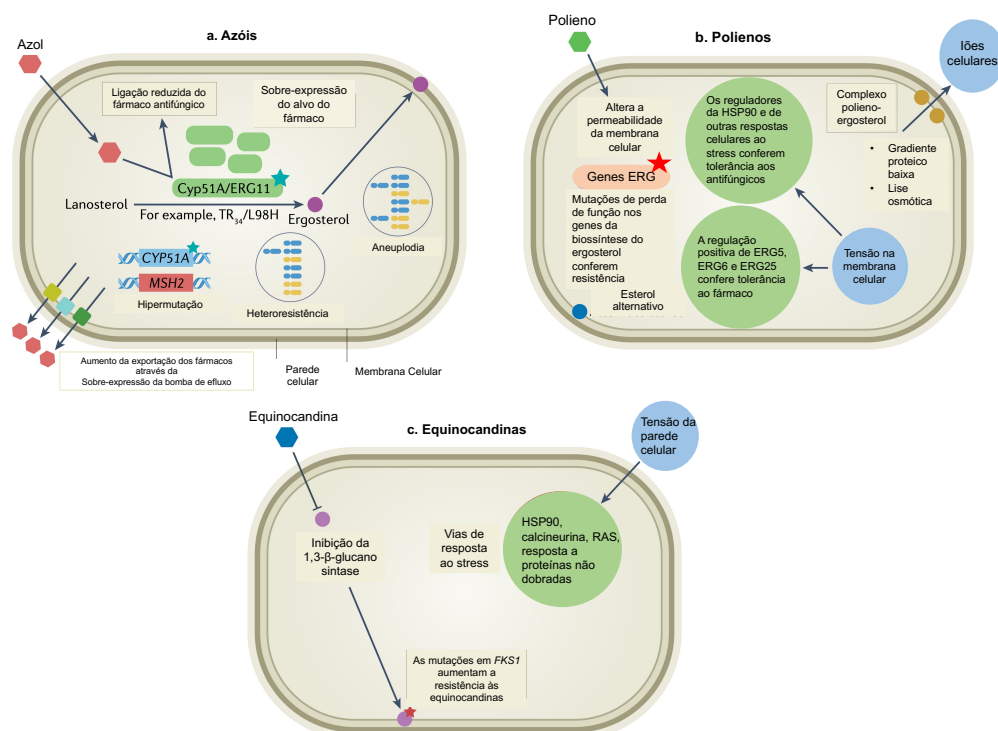


Figura 1.12 Principais mecanismos de aquisição de resistência e/ou tolerância a fármacos antifúngicos nos principais agentes patogênicos fúngicos humanos. As vias de aquisição de resistência e/ou tolerância aos fármacos antifúngicos variam consoante o modo de ação. (a) A resistência aos azóis deve-se principalmente ao aumento do efluxo do fármaco a partir da célula fúngica, à sobre expressão do alvo do fármaco e à ação das bombas de efluxo causada por aneuploidia cromossômica e hipermutação. (b) Os polienos alteram a permeabilidade da membrana celular ao formarem um complexo com o ergosterol, e a resistência é causada por mutações de perda de função nos genes de biossíntese do ergosterol. (c) As equinocandinas inibem a 1,3-β-D-glucano sintetase (*FKS1*), e as mutações neste gene causam resistência. A exposição às equinocandinas pode também levar ao *stress* da parede celular através da inibição da β-glucano sintetase, com ativação indireta a jusante das vias Ca^{2+} /calcineurina ou HSP90/mTOR, que estão envolvidas na tolerância aos fármacos. Adaptado de (158).

O uso dos azóis tem sido afetado por aumentos da resistência primária e adquirida por várias espécies fúngicas (116, 312). A diminuição da susceptibilidade ou resistência adquirida aos azóis em *Candida* spp. é mediada por vários mecanismos moleculares, que podem ocorrer simultaneamente num isolado, após aquisição sequencial sob pressão antifúngica. Consequentemente, os mecanismos subjacentes em isolados com resistência azólica são raramente detetados. O efluxo é o mecanismo mais importante de resistência para esta classe e é mediado por mutações em genes que codificam os reguladores de transportadores *ATP Binding Cassette* (ABC) e *Major Facilitator Superfamily* (MFS) (313). A sobre expressão do transportador ABC está associada à resistência cruzada a diversos azóis, enquanto a sobre expressão do transportador MFS está limitada à resistência a menos azóis (fluconazol e voriconazol) (Tabela 1.6) (310).

Tabela 1.6. Resumo dos mecanismos moleculares de resistência às principais classes de fármacos antifúngicos em *Candida* spp. Adaptado de (310 e 313).

Antifúngico	Gene associado com a resistência	<i>Candida</i> spp.
Azóis ^a	<i>ERG3, ERG11</i>	Mutações que alteram a afinidade da enzima 14- α desmetilase pelo azol. Sobre expressão do gene e/ou aumento do número de cópias no cromossoma que contém o gene, levando a um grande aumento da quantidade da enzima.
	<i>CDR1 e MDR1</i>	Sobre expressão dos sistemas de bombeamento ABC e MFS ao nível da membrana celular, levando à expulsão ativa do fármaco para o exterior da célula.
	<i>TAC1B</i>	Mutações associadas à sobre expressão do <i>CDR1</i> , que conferem resistência através de sistemas de bombeamento.
Equinocandinas	<i>FKS1 e FKS2</i>	Mutações que provocam alterações na enzima β -1,3-D-glicano sintetase, reduzindo a capacidade da sua afinidade pelas equinocandinas.
Polienos	<i>ERG2, ERG3, ERG5, ERG6 e ERG13</i>	Mutações que promovem alterações na síntese e composição do componente da membrana celular, o ergosterol.

^a Vários mecanismos de resistência podem estar presentes num único isolado.

Um segundo mecanismo importante é o aumento da produção da enzima alvo Erg11p (314). As substituições de aminoácidos na Erg11p também podem diminuir a afinidade dos fármacos para esta enzima (315). Finalmente, as mutações no *ERG3* são associadas a uma resistência cruzada aos azóis através de um *bypass* metabólico que leva à

acumulação de 14 α -metilfecosterol, que é menos prejudicial para as membranas celulares, permitindo assim um crescimento contínuo na presença de azóis (Fig. 1.12) (158, 314). Outras alterações genéticas importantes podem diminuir a susceptibilidade aos azóis. A aneuploidia, através de duplicação cromossômica ou perda de heterozigotia, aumenta o número de cópias de genes envolvidos na resistência aos azóis em *C. albicans* e *C. glabrata*. Nestas espécies, as deficiências respiratórias e mitocondriais também podem contribuir para a resistência aos azóis (71).

Os mecanismos de resistência aos polienos têm sido pouco descritos e permanecem pouco claros, em parte devido ao pequeno número de isolados clínicos que apresentam uma susceptibilidade alterada *in vitro*. A resistência está associada sobretudo a alterações na composição do esterol de membrana devido a mutações nos genes da via da biossíntese do ergosterol: *ERG2*, *ERG3*, *ERG5*, *ERG6* e *ERG11* (71). A resistência à anfotericina B também pode ser mediada pelo aumento da atividade catalítica, com diminuição da susceptibilidade aos danos oxidativos (304) (Fig. 1.12). A maioria das espécies de *Candida* spp., incluindo *C. albicans*, *C. glabrata*, e *C. parapsilosis*, são geralmente consideradas suscetíveis à Anfotericina B, com valores próximos de 100% (134, 304). No entanto, a emergência da resistência à Anfotericina B tem sido mencionada em espécies emergentes, como *C. auris* (316).

As equinocandinas apresentam atividade fungicida contra a maioria das espécies de *Candida*, incluindo as estirpes resistentes aos azóis e as que se encontram na forma de biofilme (317). No entanto, à medida que a utilização desta classe de antifúngicos se expandiu, os relatos de resistência clínica aos tratamentos com equinocandinas entre *Candida* spp. aumentaram (95). A diminuição da susceptibilidade às equinocandinas pode ocorrer através de dois mecanismos principais (Fig. 1.12):

- (i) mecanismo de resposta ao *stress* adaptativo, envolvendo um aumento compensatório da síntese de quitina (um componente essencial da parede celular). A ativação das vias de resposta ao *stress*, ao nível da parede celular é mediada pela proteína de choque térmico 90 (Hsp90) e calcineurina (Ca²⁺). A Hsp90 estabiliza a calcineurina, permitindo respostas ao *stress* dependentes da calcineurina que são necessárias para sobreviver à exposição ao fluconazol e equinocandinas em *C. albicans* (318). *In vitro*, este mecanismo é responsável pelo crescimento paradoxal (PG) ou "efeito Eagle" (crescimento em

concentrações significativamente superiores à CMI) e ocorre mais frequentemente com a caspofungina do que com a anidulafungina e micafungina (71, 319);

- (ii) mutações adquiridas ou intrínsecas nos genes *FKS1* e *FKS2*, que codificam a enzima β -1,3-D-glicano sintetase, caracterizados por substituições de aminoácidos em regiões específicas agrupadas em torno de duas regiões altamente conservadas (denominadas *hot spots* 1 e 2, HS1 e HS2) de Fksp (Tabela 1.6) (320). As mutações em HS1 e HS2, induzem assim uma diminuição da afinidade da enzima à ação das equinocandinas tornando o antifúngico ineficaz. Estudos prévios referiram a presença de mutações adquiridas para *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, e *C. glabrata* mas não para *C. parapsilosis* (62). Em *C. parapsilosis*, verificou-se que a reduzida susceptibilidade intrínseca desta espécie às equinocandinas é decorrente das mutações naturais em *FKS1* na região HS1 (71, 134).

1.5.3 Novos fármacos antifúngicos

Tendo em conta os espectros, toxicidade e formulações, as opções antifúngicas existentes ainda deixam lacunas na gestão e oportunidades significativas para o desenvolvimento de novos agentes. Alguns desenvolvimentos têm-se concentrado na adição de novos agentes dentro das classes existentes (rezafungina), além de melhorar as formulações de agentes previamente aprovados (SUBA-itraconazol, cocleato de Anfotericina B) (303, 321).

Três agentes antifúngicos, incluindo duas moléculas de duas novas famílias de antifúngicos (ibrexafungerp e fosmanogepix) e uma molécula de uma família pré-existente com propriedades farmacológicas melhoradas (rezafungina), concluíram ou estão atualmente em ensaios de fase II/III para o tratamento da CI (322).

A rezafungina é uma nova equinocandina, recentemente aprovada, com uma semivida prolongada e concentrações terapêuticas prolongadas nos tecidos periféricos, permitindo a administração semanal *versus* diária, em comparação com as equinocandinas existentes. Estas propriedades farmacodinâmicas simplificam o tratamento de doentes em

ambulatorio que requerem uma terapia alargada e tornam a rezafungina uma alternativa viável para a profilaxia da CI em doentes hematológicos (Tabela 1.7) (323).

O ibrexafungerp é um antifúngico triterpenóide que inibe a biossíntese de 1,3- β -D-glicano na parede celular dos fungos por inibição da enzima 1,3- β -D-glicano sintetase. Este antifúngico apresenta um espectro alargado e fungicida sobre *Candida* spp., incluindo sobre as espécies resistentes aos azóis (por exemplo *C. auris*) e foi aprovado para o tratamento de candidose vulvovaginal (Tabela 1.7). Embora o mecanismo de ação do ibrexafungerp e das equinocandinas seja semelhante, os locais de ligação de ambos os fármacos antifúngicos são diferentes, com uma sobreposição apenas parcial. Este facto resulta numa resistência cruzada muito limitada entre o ibrexafungerp e as equinocandinas (321).

O fosmanogepix (APX001, E1211), que é convertido na sua substância ativa manogepix (APX001A, E1210) por fosfatases sistémicas, é o primeiro antifúngico da classe N-fosfomonoximetileno que inibe a Gwt1, uma enzima localizada no retículo endoplasmático e envolvida na via de biossíntese do glicosilfosfatidilinositol (GPI). Como o GPI é necessário para a ancoragem das manoproteínas na parede celular e na membrana citoplasmática, a sua ausência resulta em *stress* do retículo endoplasmático, alteração da integridade da parede celular, perturbação da morfogénese (formação de tubo germinativo, alongamento de hifas) e inibição da adesão e formação do biofilme (324). O fosmanogepix apresenta uma atividade alargada contra espécies de *Candida* (exceto *C. krusei*) e pode ser administrado por via oral e parentérica (Tabela 1.7).

Tabela 1.7. Características das novas abordagens terapêuticas para as infecções por *Candida* spp. Adaptado de (322).

AF	Classe	Forma	Mecanismo de ação	Espectro de ação	Outras características
Rezafungina	Equinocandina (2ª geração)	IV toma semanal	Inibição da β -1,3-glicanosintetase	Infeção invasiva por <i>Candida</i> spp. (aprovado) Eficaz contra a maioria dos isolados de <i>Candida</i> ($\downarrow$ <i>C. parapsilosis</i>) Resistência adquirida: 1-5% (principalmente <i>C. glabrata</i> , <i>C. auris</i>)	Equinocandina com T semivida prolongado; análogo da anidulafungina Alternativa interessante para tratamento e profilaxia Falta de penetração no SNC e no olho Efeito fungicida
Ibrexafungerp	Triterpenoide	O	Inibidor da glicanosintetase com local de ligação alternativo	Infeção invasiva por <i>Candida</i> spp., incluindo <i>C. auris</i> e <i>C. glabrata</i> . Em comparação com as equinocandinas, apresenta espectro alargado contra a maioria dos isolados de <i>Candida</i> resistentes às equinocandinas ($\downarrow$ <i>C. krusei</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. guilliermondii</i>) Resistência adquirida: ainda não registada Candidose vulvovaginal (aprovado)	Primeiro fármaco aprovado de uma nova classe em mais de 20 anos Utilização em ambulatório; Elevada penetração tecidual Falta de penetração no SNC e no olho Efeito fungicida
Fosmanogepix (APX001) / Manogepix	N-fosfomoximetileno	O; IV	Inibição de Gwt1, alvo da maturação das proteínas GPI ancoradas	Infeções invasivas por <i>Candida</i> spp. com exceção de <i>C. krusei</i> ($\downarrow$ <i>C. kefyr</i>) Eficaz contra a maioria dos isolados de <i>Candida</i> resistentes aos azóis e às equinocandinas Resistência adquirida: registada <i>in vitro</i>	Penetração aceitável no SNC e no olho Efeito fungistático

O- Oral, IV- Intravenosa, GPI- glicosilfosfatidilinositol, SNC- Sistema Nervoso Central.

1.5.4 Factores influenciadores da eficácia dos antifúngicos

A seleção de um regime antifúngico é baseada em vários factores, incluindo dados epidemiológicos, características do doente, ambiente hospitalar, estirpe fúngica, local da infeção e perfis de segurança dos agentes antifúngicos. Embora diferentes antifúngicos possam mostrar eficácia comparável no tratamento das infeções por *Candida* spp., as suas diferenças em termos de farmacocinética e farmacodinâmica (incluindo atividade fungistática *versus* fungicida, necessidade de ajuste da dose em caso de insuficiência hepática ou renal e interações medicamentosas), toxicidade e seleção seletiva de estirpes resistentes permanecem significativas e podem afetar o resultado clínico de populações frágeis de doentes, como os doentes em UCI (Fig. 1.13). Face ao exposto está inerente o conceito de dois tipos de resistência: microbiológica e clínica. Na resistência microbiológica, o fungo não é susceptível ao agente antifúngico, quer devido à resistência intrínseca, quer à resistência adquirida após o doente ter sido exposto ao agente antifúngico, através da expressão genética alterada. A resistência clínica indica que o antifúngico mostra atividade *in vitro* contra o fungo, mas não consegue eliminar a infeção (325). Por conseguinte, existem diretrizes específicas disponíveis para ajudar a direccionar as melhores opções antifúngicas.

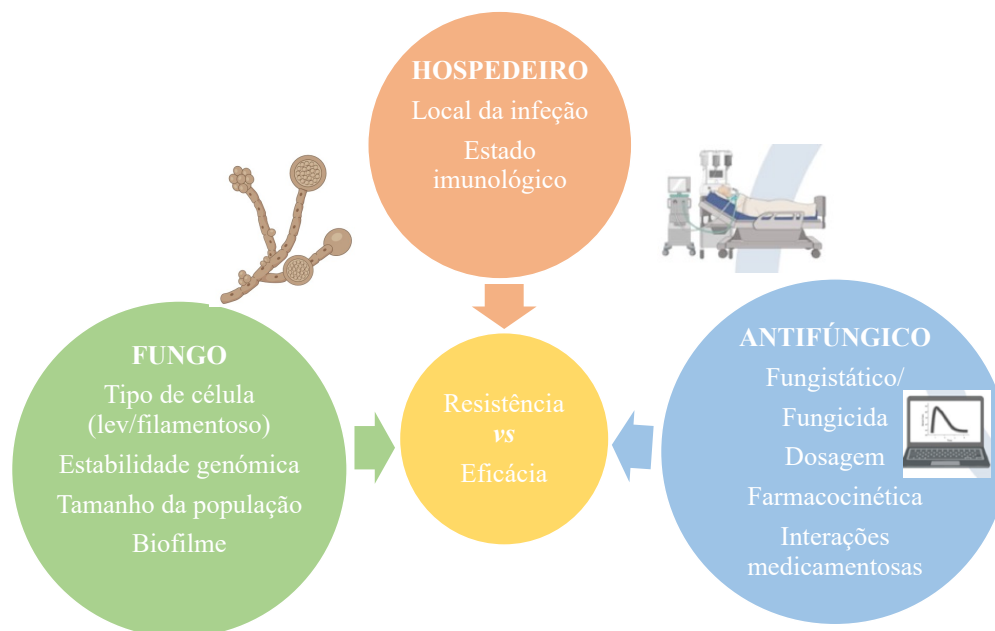


Figura 1.13. Factores que influenciam a contribuição da resistência antifúngica para o insucesso clínico. Todos os factores associados ao insucesso no tratamento de infeções fúngicas invasivas também estão relacionados com a resistência antifúngica. Adaptado de (158).

Com o desenvolvimento da classe terapêutica das equinocandinas, nos últimos 10 anos, as recomendações internacionais, da Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infeciosas (ESCMID) e da Sociedade de Doenças Infeciosas da América (IDSA) para o tratamento da CI foram alteradas e, atualmente, as equinocandinas são recomendadas como a terapêutica de primeira linha para o tratamento (60, 70, 326). As recomendações internacionais preconizam ainda a terapêutica antifúngica empírica (febre sem evidência microbiológica de infecção) e preventiva (evidência microbiológica de candidose, mas não de infecção invasiva) com equinocandinas em doentes colonizados e clinicamente instáveis para reduzir a mortalidade em doentes com risco elevado de CI (70). A justificação para estas diretrizes é que, comparativamente ao fluconazol, as equinocandinas mostram um espectro de ação maior, efeito fungicida, um perfil de segurança excelente e menos interações medicamentosas. Acresce referir que todas as equinocandinas disponíveis penetram bem no biofilme formado nos dispositivos vasculares. No entanto, o fluconazol continua a ser um antifúngico bem tolerado, com um custo significativamente menor e que pode ser útil em doentes clinicamente estáveis, sem exposição prévia recente ou cujos agentes etiológicos sejam sensíveis *in vitro* (327, 328).

1.5.5 Testes de susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos

Os avanços recentes nas técnicas laboratoriais permitem a identificação rápida dos fenótipos/genótipos de resistência a fármacos antifúngicos e identificação de microrganismos patogénicos, o que pode orientar a seleção empírica dos regimes de tratamento, facilitar a redução do uso de antifúngicos desnecessários e apoiar as decisões de controlo de infeção (329).

Os testes de susceptibilidade são realizados principalmente por métodos fenotípicos *in vitro*, que avaliam a capacidade de um determinado antifúngico inibir o crescimento de um organismo numa gama de concentrações. A leitura determina a CMI, que corresponde à concentração mais baixa do antifúngico que inibe o crescimento do organismo. Vários formatos diferentes estão disponíveis para os testes de susceptibilidade a antifúngicos (TSAF). O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), são as organizações que estabelecem e padronizam os métodos, posteriormente utilizados como referência para as outras

metodologias. Os ensaios utilizados pelo CLSI e EUCAST são métodos de microdiluição em meio líquido sob condições padronizadas mas com algumas variações técnicas entre as duas instituições de referência (330).

Outro formato disponível para os testes de susceptibilidade a antifúngicos é o dos ensaios de gradiente de difusão em meio sólido (Etest®, bioMérieux, Marcy-l'Étoile, França). Estes testes utilizam tiras de plástico que contêm um gradiente de concentração pré-definido de um agente antifúngico que, após colocação e incubação numa placa de agar inoculada, resulta numa elipse de inibição do crescimento que é utilizada para determinar a CMI do fármaco a ser testado (249). O antifúngico durante o período de incubação vai difundir para o agar e gerar uma zona elíptica de inibição, a CMI é lida como a concentração onde a zona elíptica de inibição se intersecta com a tira (Tabela 1.8). Com o objetivo de validar os resultados obtidos com esta metodologia, foram efetuados estudos de correlação, em que os resultados das tiras de gradiente são comparados com os obtidos pelas técnicas de referência de microdiluição, seguindo os critérios CLSI ou EUCAST. Os dois principais parâmetros utilizados para comparação são a concordância essencial (EA) e a concordância categórica (CA). A EA é a percentagem de isolados para os quais os valores de CMI obtidos pelo método das tiras de gradiente estão dentro das diluições mais ou menos uma ou mais ou menos duas do logaritmo ao quadrado ($\log^2$) dos valores obtidos pelo método de referência. Na maioria dos estudos, é utilizado um limiar de diluição de mais ou menos duas do $\log^2$. A CA é a percentagem de isolados para os quais a mesma categorização (S, I e R) é obtida através dos dois métodos. A disponibilidade das concentrações clínicas de corte (CBP) de referência é um pré-requisito para o cálculo das percentagens de CA. Na maioria dos casos, os valores de CMI obtidos através da difusão de gradiente comparam-se favoravelmente aos valores gerados por microdiluição em caldo (331, 332). Os resultados de EA apontam para valores de 92% a 96,8% para o género *Candida*, respetivamente, segundo os critérios do CLSI e EUCAST (333, 334).

Tabela 1.8. Metodologias mais frequentemente utilizadas nos testes de susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos. Adaptado de (249 e 332).

Sistema	Metodologia	Vantagens	Desvantagens
Microdiluição em caldo (CLSI e EUCAST)	Microdiluição	Técnica de referência; as metodologias estão normalizadas e disponíveis; as placas podem ser produzidas em laboratório; pode ser utilizada para qualquer novo antifúngico que seja descoberto.	Interpretação subjetiva pela metodologia CLSI, atenuada pela utilização do espectrofotómetro (EUCAST); A preparação das placas é trabalhosa e a sua aquisição comercial é dispendiosa; A exigência de formação técnica é elevada.
SYO ¹ /Thermofisher®; Micronaut-AM®/Bruker	Placa colorimétrica Os poços da placa de microdiluição são doseados com as diluições adequadas do antifúngico, bem como com o indicador colorimétrico. A CMI é definida pelo poço que não apresenta alterações de cor (ausência de crescimento) após 24-48 h de incubação.	A interpretação é menos subjetiva do que a microdiluição em caldo padrão; Tecnicamente menos exigente do que a microdiluição em caldo; Não requer armazenamento em congelador.	A interpretação do crescimento com arrasto (<i>trailing</i>) nos azóis pode ser problemática; Deve ser adquirido comercialmente Apesar de ser uma técnica de microdiluição, não segue as diretrizes do CLSI ou EUCAST para interpretação.
Etest ® ² e LiofilchemT	Métodos de concentração em gradiente	Económico em comparação com a microdiluição em caldo; Fornece um valor de CMI; Discriminação melhorada entre os isolados suscetíveis e resistentes à anfotericina B; melhor discriminação entre resistência verdadeira e o fenómeno de crescimento em <i>trailing</i> .	A interpretação é subjetiva; Tem de ser adquirido comercialmente; Não disponível para antifúngicos em desenvolvimento.
Automated Vitek-2® ³	Sistema automatizado que fornece, de forma espectrofotométrica e simultânea, o isolamento, a identificação e os resultados da CMI do agente patogénico.	Sem subjetividade na interpretação; Muito fácil de preparar e efetuar; Dupla utilização para laboratórios que já utilizam o VITEK 2 para identificação.	Custo elevado; Disponível apenas para um número limitado de antifúngicos. Aumenta a resistência de algumas espécies (como <i>C. auris</i>).

¹ Sensititre Yeast One panel/plate, TREK Diagnostic Systems, EUA. ² Etest, bioMérieux Marcy-l'Etoile, França ³ Automated Vitek-2, bioMérieux, France.

No estudo de Cuenca-Estrella e colaboradores, em que 93 isolados de espécies de *Candida* foram testadas com o fluconazol, a EA entre o E-test® e os testes de referência, seguindo os critérios do EUCAST foi de 90% (335). Para a CA, foram referidos valores de 94,6% e 98,1% para o fluconazol e voriconazol, respetivamente (143). Além disso, o E-test® permite uma melhor discriminação entre os isolados suscetíveis e resistentes à anfotericina B (Tabela 1.8) (332). Desta forma, as faixas de difusão de gradiente podem distinguir entre isolados que são suscetíveis, resistentes, ou suscetíveis com fenómeno de arrasto (*trailing*) e serem utilizadas para confirmação dos valores de CMI para isolados muito resistentes. No entanto, é ainda controversa a noção de que o efeito de observação de *trailing* possa ou não ter relevância na determinação da CMI. Contudo, há autores que referem que isolados que evidenciam fenómeno de *trailing* apresentam potencial resistência clínica (332). Refere-se ainda que a leitura do E-test® pode apresentar alguma subjetividade para técnicos menos experientes, o que poderá induzir a leituras de CMI falsamente elevadas.

Encontram-se disponíveis comercialmente várias outras metodologias, mais ou menos automatizadas, sendo a Sensititre Yeast One® (Thermo Fisher Scientific), Micronaut-AM® (Bruker) e o sistema de susceptibilidade aos antifúngicos do Vitek-2® (bioMérieux) as técnicas mais utilizadas em ambiente clínico laboratorial. Globalmente, as metodologias *in vitro* referidas previamente podem apresentar limitações, como o tempo de resposta lento (24 h após o isolamento) e, não menos importante, a subjetividade na leitura e interpretação correta dos valores de CMI obtidos (336).

A deteção molecular da resistência aos azóis em *Candida* spp. não apresenta muitas vantagens face à plethora de mecanismos de resistência que podem coexistir e já descritos previamente. Os testes fenotípicos são, portanto, uma ferramenta mais eficaz na deteção da resistência aos azóis do que os métodos genéticos (337). Ainda assim, a deteção molecular de mutações no gene *ERG11*, conhecidas como causadoras de resistência aos azóis, pode ser utilizada para detetar ou confirmar a resistência (315). No entanto, a resistência não poderá ser excluída na ausência destas alterações. Na Tabela 1.8 apresentam-se os principais TSAF e as vantagens e limitações associadas.

Concentrações clínicas de corte

Para poder classificar um organismo como susceptível ou resistente é necessário recorrer aos pontos de corte clínicos, também referidos como CBP. Um ponto de corte clínico é um valor limiar de CMI, abaixo do qual um determinado organismo é considerado susceptível ao antifúngico a testar, e acima do qual o organismo é considerado resistente. Os critérios interpretativos do CLSI para o fluconazol e *Candida* spp. incluem as categorias susceptível (S), susceptível dependente da dose (SDD), e resistente (R). A categoria SDD para o fluconazol significa que são necessárias doses mais elevadas contra infeções causadas por isolados que se enquadram nesta categoria para alcançar o sucesso clínico (249). Para o voriconazol e as equinocandinas, o critério interpretativo é susceptível, intermédio e resistente, e a categoria intermédio não é permutável com a SDD utilizada para o fluconazol. O EUCAST utiliza categorias semelhantes de interpretação, incluindo (1) suscetíveis ao regime de dose padrão (S), (2) suscetíveis à exposição aumentada (I) (semelhante à categoria SDD do CLSI), (3) resistentes (R), e (4) área de incerteza técnica, que é aplicada quando os resultados se enquadram numa área onde não é possível obter uma interpretação reprodutível (338, 339).

É importante referir que os pontos de corte clínicos não são fenómenos naturais, mas sim estabelecidos por comités, como o CLSI, EUCAST, e agências reguladoras tais como a FDA. Vários factores são levados em conta quando se consideram os pontos de corte. Nestes, estão incluídas as distribuições da CMI, valores de corte epidemiológicos (ECOFF), parâmetros farmacocinéticos/ farmacodinâmicos que preveem o sucesso em estudos *in vitro* e *in vivo*, e resultados de estudos clínicos que correlacionam respostas terapêuticas ou falhas de tratamento com diferentes valores de CMI (249). Os CBP estão sujeitos a revisão e tanto o CLSI como o EUCAST fazem alterações dos valores quando os estudos realizados o justificam.

Valores de corte epidemiológicos

Os valores de corte epidemiológicos determinados pelo EUCAST (ECOFF) ou pelo CLSI (ECV) definem a população de tipo selvagem (WT) (334). Como o ECOFF e o ECV representam o mesmo parâmetro, para simplificação, o termo ECOFF é utilizado ao

longo desta revisão. Na ausência de concentrações clínicas de corte, os ECOFF estão por vezes disponíveis e podem fornecer orientações.

Os ECOFF são valores de CMI limiares para um determinado antifúngico e são utilizados para discriminar entre estirpes do tipo selvagem e não selvagem de uma espécie específica. Geralmente, abrangem 97,5% dos isolados dentro de uma distribuição de CMI do tipo selvagem. Os ECOFF, são utilizados para identificar isolados que possam ter adquirido resistência a um determinado antifúngico e, por conseguinte, podem ser menos suscetíveis de responder à terapêutica (249).

Tanto o CLSI quanto o EUCAST publicaram ECOFF para várias espécies e combinações de antifúngicos, com base em dados obtidos de diferentes relatórios, que utilizaram os métodos de microdiluição em caldo (332, 340). Na prática clínica, na ausência de pontos de corte definidos, os clínicos podem utilizar os ECOFF para tomar decisões no tratamento de infeções causadas por espécies conhecidas por desenvolverem resistência antifúngica. Embora a presença de um isolado com CMI do tipo selvagem não assegure uma resposta clínica positiva, um isolado com CMI acima do ECOFF pode sugerir o desenvolvimento de resistência, sendo prudente considerar o uso de um antifúngico alternativo (332). Os ECOFF também podem ser utilizados para comparar resultados obtidos pelo E-test® e microdiluição (334). Contudo, os ECOFF não são substitutos dos pontos de corte clínicos, e não devem ser utilizados em sua substituição quando estes estão disponíveis (339).

Questões e limitações no TSAF para Candida spp.

A resistência antifúngica emergente em *Candida* spp. é preocupante e levou à crescente incorporação dos TSAF para orientar as decisões clínicas. No entanto, a interpretação dos resultados dos TSAF e a sua contribuição para a gestão das infeções fúngicas continua a ser uma questão de debate. Ambas as organizações de referência, CLSI e EUCAST harmonizaram os CBP para *Candida* spp. e azóis (249). Dados relativamente robustos apoiam o CBP de *C. albicans* para o fluconazol, enquanto para as espécies não-*albicans* a interpretação ainda não é clara. Particularmente para *C. glabrata*, quer o CLSI, quer o EUCAST abstêm-se de uma categorização clara e consideram que a maioria dos isolados se enquadra respetivamente na categoria SDD ou I. Para a espécie emergente, *C. auris*, não existem atualmente CBP estabelecidos. Esta espécie exibe uma

grande variabilidade de valores de CMI e uma capacidade notável de induzir rapidamente resistência às três classes de antifúngicos (322). Ainda assim, existe a necessidade de conhecimento específico para leitura dos valores de *C. auris*, nomeadamente a possibilidade de ocorrência do efeito Eagle ou efeito de crescimento paradoxal na presença de equinocandinas, que é o comportamento antifúngico reduzido *in vitro* para doses do fármaco mais elevadas. Este efeito *in vitro* é particularmente relevante na leitura dos TSAF por microdiluição. O efeito Eagle não reflete a resposta potencial *in vivo* de *C. auris* às equinocandinas, conforme indicado num modelo de CI em murinos (341). No caso das equinocandinas, o papel da caspofungina no TSAF e a sua interpretação ainda estão em discussão. Tanto o CLSI como o EUCAST recomendam confiar nas CMI da anidulafungina ou micafungina para a interpretação (340).

Face ao exposto, tona-se relevante considerar que na interpretação dos resultados dos testes de susceptibilidade aos antifúngicos existem quatro princípios básicos: (a) a CMI não é uma medição física ou química; (b) muitas vezes, certos factores do doente são mais importantes do que os resultados dos testes de susceptibilidade *in vitro* na determinação da evolução clínica; (c) a susceptibilidade *in vitro* nem sempre prediz o sucesso de uma terapia específica e (d) a resistência *in vitro* correlaciona-se frequentemente com o fracasso do tratamento.

1.6 Fundamento da tese e objetivos

Embora o microbioma da pele seja maioritariamente composto por bactérias, os fungos constituem elementos essenciais que desempenham funções cruciais no desenvolvimento, manutenção e reparação da pele em hospedeiros vertebrados (24). Esta informação é particularmente relevante para os doentes em UCI, onde a integridade da pele é frequentemente comprometida devido à exposição a factores extrínsecos relacionados com os procedimentos invasivos realizados no ambiente hospitalar. A compreensão da composição da micobiota e micobioma da pele neste grupo de doentes pode fornecer informações sobre potenciais fontes de agentes patogénicos fúngicos e auxiliar nas estratégias de controlo de infeções.

Os dados epidemiológicos globais mais recentes indicam que aproximadamente 1.565.000 indivíduos desenvolvem candidemia anualmente, com índices de mortalidade compreendidos entre os 63 e 66% (6). Porém, ainda não é claro se a presença de *Candida* spp. na pele é um marcador da doença subjacente, do tratamento na UCI ou se contribui para um mau resultado clínico. Por outro lado, as espécies de *Candida* colonizadoras e/ou responsáveis por infeção variam consoante a área geográfica, como tal, o tratamento deve basear-se em estudos realizados regularmente nas mesmas regiões através de projetos bem planeados (342). Neste contexto, os testes de susceptibilidade antifúngica *in vitro* desempenham um papel cada vez mais importante na orientação da decisão terapêutica.

Face ao exposto, este projeto de investigação teve por base um estudo observacional prospetivo multicêntrico durante dois anos em Unidades de Cuidados Intensivos da área metropolitana de Lisboa. O estudo foi elaborado com o objetivo de dar resposta a diversas questões, nomeadamente:

- Qual a diversidade da micobiota da pele em doentes admitidos nas UCI de hospitais terciários? Será o género *Candida* o mais prevalente, e *C. albicans* a principal espécie isolada nas amostras de doentes em UCI? Será *C. parapsilosis* a espécie não-*albicans* mais prevalente? Os isolados de *Candida* são de espécies crípticas ou de espécies *stricto sensu*?
- Há isolados (colonização/infeção) de *C. auris* na amostra populacional em estudo?

- Existem factores do hospedeiro predisponentes para a colonização fúngica?
- Qual a influência do internamento em UCI sobre o micobioma da pele? Ocorrem variações significativas na diversidade e abundância relativa do micobioma após a admissão na UCI?
- Existem perfis de resistência nos isolados colonizadores de *Candida* spp.?
- Os perfis de susceptibilidade mantêm-se ao longo do tempo de internamento dos doentes na UCI? Estão relacionados com os factores do hospedeiro predisponentes para a infeção?

Por conseguinte, a presente tese compreende os seguintes objetivos gerais:

- Caracterizar demográfica e clinicamente uma amostra de doentes representativa das Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) em Lisboa, Portugal;
- Obter e caracterizar uma coleção de isolados fúngicos de amostras clínicas cutâneas (exsudado combinado da zona axilar e inguinal) de doentes internados em UCI;
- Avaliar a prevalência e diversidade de *Candida* spp. na coleção de isolados clínicos provenientes de exsudados da zona axilar/inguinal de doentes admitidos em UCI;
- Avaliar a intensidade de colonização da micobiota em doentes internados em UCI;
- Criar um algoritmo de diagnóstico microbiológico para rastreio de *C. auris* através de metodologias clássicas e moleculares;
- Determinar os factores de risco do hospedeiro para colonização fúngica em UCI, assim como, a influência das UCI na diversidade e intensidade de colonização fúngica, nomeadamente o tempo de internamento na unidade;
- Caracterizar o micobioma num grupo de doentes monitorizados à admissão (D1) e ao dia oitavo (D8) de permanência na UCI;
- Determinar os perfis de susceptibilidade aos quatro antifúngicos mais utilizados na prática clínica, nos isolados de *Candida* spp. obtidos nesta coorte de doentes.

O conteúdo principal desta tese está dividido em sete capítulos principais. Após a introdução geral abordada no Capítulo 1, nos Capítulos 2, 3, 4 e 5 estudou-se a

composição e subsequente quantificação da micobiota e microbioma em amostras cutâneas de doentes em UCI. Nestes capítulos descrevem-se os protocolos experimentais desenvolvidos com base em metodologias convencionais e translacionais. O objetivo desenvolvido no Capítulo 2 teve como finalidade identificar a diversidade de espécies fúngicas colonizadoras na admissão e durante o internamento na UCI. No Capítulo 3, foi elaborado um algoritmo de diagnóstico laboratorial para a deteção de isolados de *C. auris*, uma espécie fúngica patogénica emergente em Saúde Pública e à data da elaboração do estudo, ainda não descrita em Portugal, nem tão pouco descrita pela OMS como agente fúngico prioritário em Saúde Pública. O Capítulo 4 teve por objetivo determinar os factores predisponentes do hospedeiro com relevância na colonização fúngica em UCI. O Capítulo 5 teve por objetivo caracterizar o microbioma de uma coorte de doentes na admissão e ao oitavo dia de permanência na UCI. O Capítulo 6 complementou o estudo ao determinar os perfis de susceptibilidade dos isolados de *Candida* spp. às principais moléculas antifúngicas empregadas na prática clínica, integrando os dados obtidos numa análise abrangente sobre a colonização e a resistência fúngica em contexto hospitalar. Os seis Capítulos são seguidas de um Capítulo final (Capítulo 7) no qual é apresentada uma discussão geral e as conclusões relativas aos principais resultados.

2. Caracterização da micobiota cutânea em doentes de unidades de cuidados intensivos nos hospitais terciários de Lisboa

2.1 Introdução

A pele humana é um órgão complexo e multifuncional, que serve como a primeira linha de defesa contra os agentes patogénicos. No entanto, a pele não é apenas uma barreira passiva; ela é habitada por uma comunidade diversificada de microrganismos, a microbiota cutânea, que inclui bactérias, fungos e vírus (24). A colonização da pele por fungos é um processo natural que começa imediatamente após o nascimento (20). Estes microrganismos desempenham papéis cruciais na manutenção da saúde da pele, incluindo a prevenção da colonização por microrganismos patogénicos através de mecanismos como a competição por nutrientes e a produção de substâncias antimicrobianas (25). No entanto, quando há um desequilíbrio nesta comunidade microbiana - seja por factores internos (como alterações imunológicas) ou externos (como procedimentos médicos invasivos) - a pele pode tornar-se uma fonte endógena de infeção (18).

Embora a investigação sobre a micobiota cutânea ainda esteja num estágio inicial comparada à microbiota bacteriana, estudos prévios mostraram que os fungos desempenham um papel importante na saúde da pele (19). Como exemplo positivo tem-se a ação competitiva dos fungos comensais com microrganismos patogénicos, ou a modulação do sistema imunológico do hospedeiro (24).

O conhecimento da micobiota é particularmente relevante para doentes em unidades de cuidados intensivos (UCI), onde a integridade da pele é frequentemente comprometida, e uma compreensão detalhada do microbioma cutâneo pode influenciar positivamente as abordagens terapêuticas e preventivas, reduzindo o risco de complicações graves neste grupo de doentes (343).

Porém, a importância da microbiota fúngica da pele em doentes internados em UCI ainda não foi investigada adequadamente. Por conseguinte, estudar a micobiota da pele e as alterações decorrentes nesse contexto poderá fornecer informações sobre a fonte e/ou patogénese das infeções fúngicas. Vários estudos efetuados sugerem que a prevalência e o impacto das infeções relacionadas com a micobiota nas UCI pode variar consoante as práticas específicas da UCI, as populações de doentes e a epidemiologia local (11, 27, 344).

Um exemplo marcante da micobiota cutânea é o género *Candida*, que em condições de homeostase, coexiste de forma inofensiva com os outros microrganismos. Porém, nos

doentes em UCI, cuja barreira cutânea pode estar comprometida, resulta numa multiplicação excessiva e em eventual infeção (345). A investigação focada no papel de *Candida* spp. e outros fungos no microbioma cutâneo é assim essencial para desenvolver estratégias de prevenção e tratamento que possam melhorar significativamente os cuidados aos doentes em situações críticas.

No estudo da comunidade fúngica podem ser utilizadas abordagens baseadas em métodos culturais ou moleculares. Embora a identificação de fungos baseada em culturas continue a ser a técnica de referência na prática clínica, está também associada a um elevado consumo de tempo, à capacidade limitada de investigar uma vasta gama de microrganismos, particularmente espécies com elevadas exigências de crescimento e à incerteza na discriminação entre espécies diferentes devido às análises fenotípicas das colónias obtidas (15). Importa realçar que neste capítulo não foi dada relevância aos géneros fúngicos menos virulentos e já caracterizados como fazendo parte da micobiota da pele de um indivíduo saudável, como é exemplo o género *Malassezia*. Salienta-se a pretensão de estudar os principais géneros fúngicos que possam vir a desencadear infeção nosocomial invasiva.

Assim, neste capítulo serão abordadas as diferentes metodologias a utilizar para o conhecimento da diversidade da micobiota com um enfoque nas espécies do género *Candida* por forma a responder às seguintes questões de investigação:

- Qual a composição da micobiota em amostras cutâneas de doentes em UCI?
- Será *C. albicans* a principal espécie isolada?
- Qual a espécie não-*albicans* mais prevalente?
- Os isolados de *Candida* são de espécies crípticas ou de espécies *stricto sensu*?
- Qual a diversidade e distribuição quantitativa de espécies de *Candida*?
- Qual a prevalência e índice de colonização por *Candida* spp. ao longo da primeira semana de internamento na UCI?
- A abundância e diversidade da micobiota reproduzem-se nas unidades hospitalares em estudo?

2.2 Objetivos

Objetivo geral

- Caracterizar a micobiota da pele em doentes internados em UCI.

Objetivos específicos

- Identificar os isolados de *Candida* spp. ao nível de espécie;
- Relacionar a especificidade e a adequação da proteómica por MALDI-TOF para identificação;
- Comparar as diferentes abordagens de identificação fenotípica, proteómica e molecular a partir de métodos baseados em cultura;
- Avaliar a prevalência e diversidade de *Candida* spp. na coleção de isolados clínicos provenientes de exsudados da zona axilar/inguinal de doentes admitidos em UCI;
- Obter uma coleção de isolados fúngicos de amostras cutâneas de doentes internados em UCI.

2.3 Material e Métodos

2.3.1 Desenho do estudo

Para conhecer a microbiota fúngica, foi elaborado um estudo prospetivo, multicêntrico e cuja sinopse está descrita na Fig. 2.1. O estudo foi realizado durante o período de janeiro de 2020 a dezembro de 2022 em hospitais terciários da periferia da cidade de Lisboa pertencentes ao Serviço Nacional de Saúde (SNS): Hospital Professor Doutor Fernando Fonseca (HFF), um hospital com duas UCI (geral e cirúrgica) e o Hospital Beatriz Ângelo (HBA), com uma UCI geral. O estudo decorreu em espaço temporais distintos: no HFF de janeiro a março de 2020 e no HBA de setembro de 2021 a dezembro de 2022.

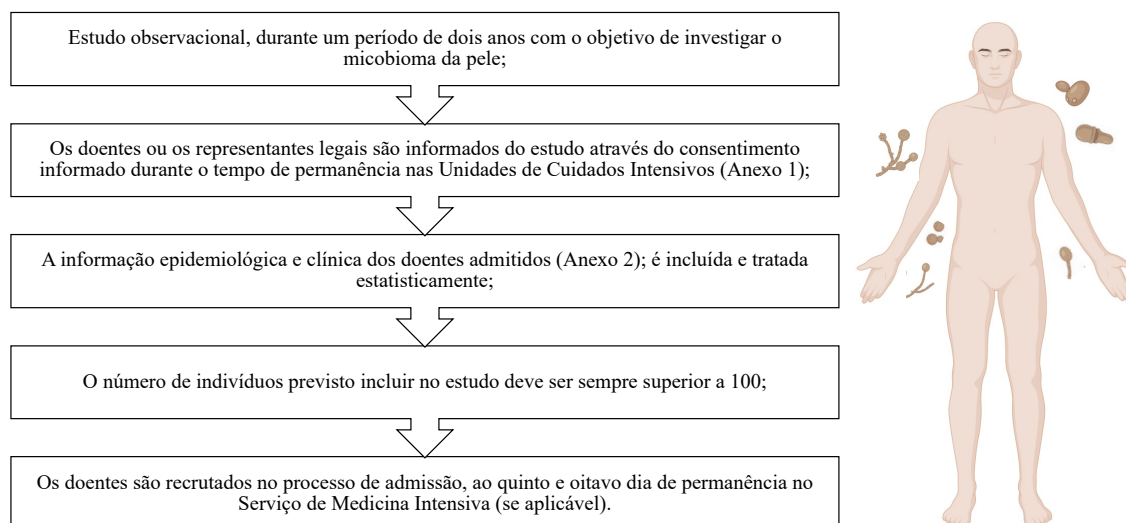


Figura 2.1. Sinopse do estudo observacional para a caracterização do microbioma em unidades de cuidados intensivos.

Caracterização das Unidades Hospitalares

O Hospital Professor Doutor Fernando Fonseca, inaugurado em 1995, é uma instituição terciária pertencente ao Serviço Nacional de Saúde (SNS), com 802 camas. Dispõe de uma unidade de cuidados intensivos para adultos (também denominada por Serviço de Medicina Intensiva) com 20 camas, que compreende: uma unidade cirúrgica (UCICRE) com 6 camas e uma unidade polivalente (UCIP) com 14 camas, e presta assistência médica a uma população mista, urbana e rural, de cerca de 700 000 habitantes, na área de Lisboa, Portugal. As UCI do HFF acolhem todo o tipo de doentes que necessitem de cuidados intensivos, com exceção dos doentes com transplante de células estaminais hematopoiéticas, órgãos sólidos e cuidados neuro críticos. Durante o período de estudo, a estimativa previa o número médio anual de admissões de 900, com uma média de 8,4 dias de hospitalização.

O Hospital Beatriz Ângelo foi inaugurado a 17 de janeiro de 2012. O projeto resultou de uma parceria público-privada entre o Estado, o grupo Luz Saúde e a Sociedade Gestora do Hospital de Loures. O hospital localiza-se em Loures e serve uma população de aproximadamente 300 000 habitantes residentes nos concelhos de Loures, Mafra, Odivelas e Sobral de Monte Agraço. O HBA tem uma capacidade de internamento de 424 camas. A média diária de admissões gerais é de aproximadamente 330 doentes. O HBA é

acreditado pela *Joint Commission International*. A UCI tem 22 camas, distribuídas por duas áreas. A área dedicada preferencialmente a doentes de nível III (Classificação APACHE) tem 10 camas em boxes individuais, todas equipadas com um ventilador. A segunda área é preferencialmente dedicada a doentes de nível II e tem 12 camas, também em unidades individuais. A equipa médica é constituída por 11 elementos, entre os quais 7 especialistas em Medicina Interna e Medicina Intensiva. A equipa de enfermagem é constituída por 47 enfermeiros, distribuídos por 4 equipas que asseguram turnos de 12h. No decorrer deste projeto de investigação ambas as unidades hospitalares transitaram da esfera público privada para o SNS de forma exclusiva.

Dimensão da amostra e critérios de seleção e recrutamento dos doentes

O esquema delineado de recolha das amostras previu três pontos de colheita temporais: aquando da admissão dos doentes na UCI e durante o período de internamento, ao quinto (D5) e oitavo dia (D8), se aplicável (Fig. 2.2). Com base em estudos prévios (Palabiyikoğlu, Oral e Tulunay, Ahmad e colaboradores, Charles e colaboradores, Eyre e colaboradores e Avkan-Oğuz e colaboradores) sobre a colonização fúngica em UCI, a estimativa da amostra populacional foi de 865 doentes, considerando um nível de confiança de 95% e um poder estatístico de 80% (65, 230, 346-348). A estimativa da população necessária para validação estatística foi efetuada com recurso ao programa Epitools®.

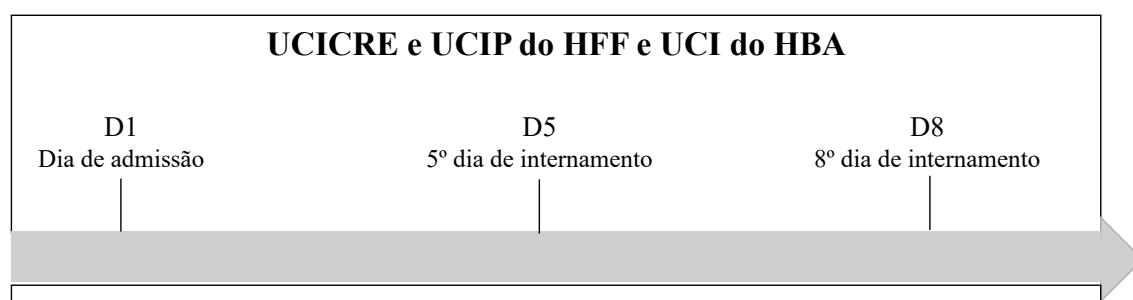


Figura 2.2. Sinopse do esquema de colheita de amostras biológicas nas diferentes UCI: UCIP e UCICRE do HFF e HBA.

CrITÉRIOS de inclusão

O grupo de estudo englobou os doentes recrutados que reuniram no mínimo um dos seguintes factores de inclusão: terapêutica prévia com antimicrobianos (últimas 48h), presença de cateter intravascular central (CVC), nutrição parentérica (NP), hemodiálise, ventilação assistida (VA), cateter vesical (CV), cirurgia (C), HIV/SIDA, outra imunodeficiência, neoplasia hematológica (leucemia, linfoma), outra neoplasia, neutropenia (inferior a 500/mm³), anemia com hemoglobina inferior a 10 mg/dl e diabetes.

CrITÉRIOS de exclusão

Não foram incluídos no estudo os doentes que não cumpriram os requisitos de inclusão supracitados, assim como, os grupos vulneráveis (idade inferior a 18 anos, grávidas e indivíduos mentalmente incapacitados na admissão à UCI). A triagem do doente foi realizada como parte do controlo de infeção de rotina no hospital.

Dados demográficos e epidemiológicos

A informação demográfica e clínica foi obtida por preenchimento de um formulário de acompanhamento de colonização/infeção fúngica da pele contendo informação sobre a (1) idade, (2) sexo, (3) profissão (4) histórico de viagens para o exterior, (5) dados clínicos, (6) terapêutica antifúngica, (7) terapêutica antibiótica, (8) factores de risco extrínsecos (cateter intravascular central, alimentação parentérica, hemodiálise, ventilação assistida invasiva, cateter vesical, cirurgia), (9) factores de risco intrínsecos (HIV/SIDA, linfoma, leucemia, outra neoplasia, outra imunodeficiência, neutropenia, níveis de hemoglobina, diabetes) e (10) COVID-19 (apenas para os doentes do HBA) (Anexo 2).

Os dados foram recolhidos pelo clínico (médico intensivista) durante o processo de admissão mediante o preenchimento do formulário em sistema de sinalização por cruzes. A informação epidemiológica e médica foi registada de forma anónima e codificada pelo investigador no hospital. A confidencialidade nos registos foi mantida da forma seguinte:

os dados recolhidos durante o processo foram analisados e processados a nível estatístico, não identificando individualmente os participantes.

Considerações éticas

A participação no estudo foi voluntária e autorizada mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1). O estudo foi aprovado pelo Conselho de Ética Institucional do Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca em 13/11/2019 (54/2019) e pelo Comité de Ética dos Hospital Beatriz Ângelo em 21/07/2021 (3655/2021) (Anexo 3).

Colheita de Amostras biológicas

A recolha de zaragatoa conjunta axilar/inguinal bilateral foi efetuada pelos profissionais de saúde de cada UCI de acordo com o protocolo desenvolvido e ilustrado na Fig. 2.3. Como medida da prática de controlo da infeção hospitalar, foram efetuados banhos de gluconato de clorhexidina (GCH), sendo que os protocolos diferiram entre unidades hospitalares. No HFF, cada doente recebeu um banho com toalhetes saturados numa solução de GCH a 2% (v/v) aquando da admissão, e durante os primeiros cinco dias de permanência na UCI. No HBA, o protocolo incluía a utilização de um sabão de clorhexidina líquida a 4% (v/v) durante os primeiros cinco dias de permanência na UCI. Antes da primeira colheita, todos os doentes já tinham recebido um banho de GCH.

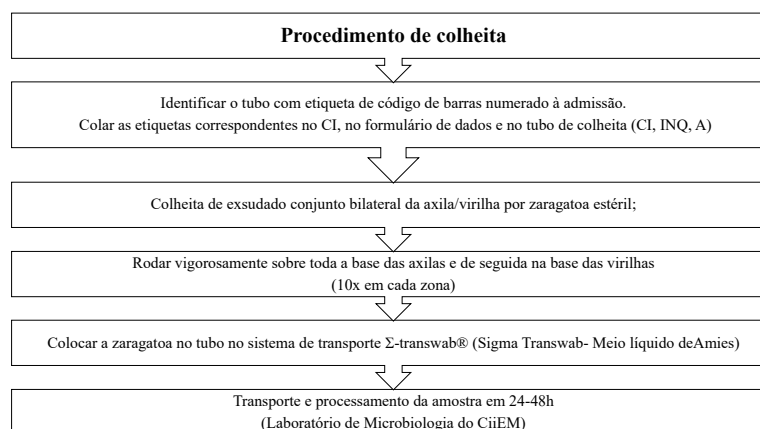


Figura 2.3. Descrição do protocolo de colheita realizado pelos profissionais de saúde nas unidades hospitalares.

2.3.2 Fluxograma

Do protocolo desenvolvido para a vigilância fúngica foram obtidas amostras de exsudados combinados de axila/virilha de doentes internados em UCI. As zaragatoas foram colhidas em meio de transporte Amies líquido (Σ -transwab®, Sigma Transwab-*Liquid Amies*), transportadas à temperatura ambiente (25°C) e processadas em 24-48h no laboratório de Microbiologia do Centro de investigação interdisciplinar Egas Moniz (CiiEM).

A investigação teve início com as culturas de vigilância fúngica. Cada zaragatoa contendo 1 mL de meio Amies líquido foi submetida a agitação mecânica forte por 30 segundos e alíquotas de 50 μ L foram inoculadas por espalhamento nos meios de cultura seguintes: Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (peptona 1%, dextrose 2%, agar 1,5%) adicionado de gentamicina e cloranfenicol (Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol® ou SGC2® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) e um meio cromogénico comercial para *Candida*, CHROMagar Candida® (CHROMagar, Paris, França) (Anexo 4, 9.2.1). As placas de SDA foram incubadas aerobicamente durante 24-48 horas, um conjunto de meios de cultura a 25°C e outro a 35°C. As placas de CHROMagar Candida® foram incubadas aerobicamente durante 48-72 horas, entre 35°C e 37°C. O CHROMagar Candida®, tem a particularidade de ter uma mistura de substratos cromogénicos, cada um deles específico para enzimas das espécies de *Candida* mais frequentes. Assim, a cor desenvolvida pelas leveduras do género *Candida* em meio CHROMagar Candida® é de cor verde para *C. albicans*; azul metálico para *C. tropicalis*; rosa-claro e aspeto seco para *C. krusei* e branco a violeta para as outras espécies de *Candida*. Segundo o fabricante, a especificidade e sensibilidade para *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. krusei* excedem os 99%. Este meio de cultura para além de uma identificação presuntiva direta, permitiu a identificação de culturas mistas. Para colocar em evidência todas as espécies do género *Malassezia* foi utilizado o meio de Dixon (Anexo 4, 9.2.1). As placas foram incubadas aerobicamente durante 3-5 dias a 25°C (Fig. 2.4).

2.3.3 Identificação dos isolados

2.3.3.1 Identificação fenotípica

As identificações dos isolados foram realizadas de forma prospetiva e os resultados comunicados de forma atempada às equipas clínicas das UCI. O processo de identificação foi inicialmente efetuado com base em critérios padrão de morfologia macroscópica das colónias (cor, aspecto, consistência) e microscópica (blastóporos, pseudohifas e artrósporos, gemulação polar ou multilateral) (Fig. 2.4). Embora as características morfológicas das leveduras tenham um valor muito relativo por serem pouco diferenciáveis na identificação das espécies, foi observada a morfologia macroscópica de todos os isolados em meio de Sabouraud ao fim de 48 horas de incubação a 25°C e 35°C, nomeadamente a cor, textura, superfície, relevo e margem das colónias.

As colónias de cor verde, isoladas no meio CHROMagar®, foram identificadas como pertencentes ao complexo *C. albicans*. A sua identificação foi confirmada pela produção de tubos germinativos (prova da blastese) (*C. albicans* e *C. dubliniensis*) (Fig. 2.4). As colónias que adquiriram cor rosa-clara e brilhantes foram presuntivamente identificadas como pertencentes ao complexo *C. glabrata*, as colónias de cor bege ou rosa, como fenótipos do complexo *C. parapsilosis*, as de cor azul como *C. tropicalis* e as de cor rosa e secas como *C. krusei*. Para controlo do desempenho do meio cromogénico foram utilizadas estirpes de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC), *C. albicans* (ATCC 90028), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. krusei* (ATCC 6258). Todas as colónias que apresentavam cores diferentes da verde foram reinoculadas em gelose de Sabouraud e identificadas de acordo com o seu perfil bioquímico (enzimático e assimilação de açúcares em aerobiose-auxonograma) através do sistema de identificação comercial API®, API Candida® e API 20CAUX® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) executados de acordo com as instruções do fabricante (Fig.2.4). Para a confirmação da identificação do género *Trichosporon* foi ainda utilizado o teste de ureia rápida em caldo (Anexo 5, 9.2.2).

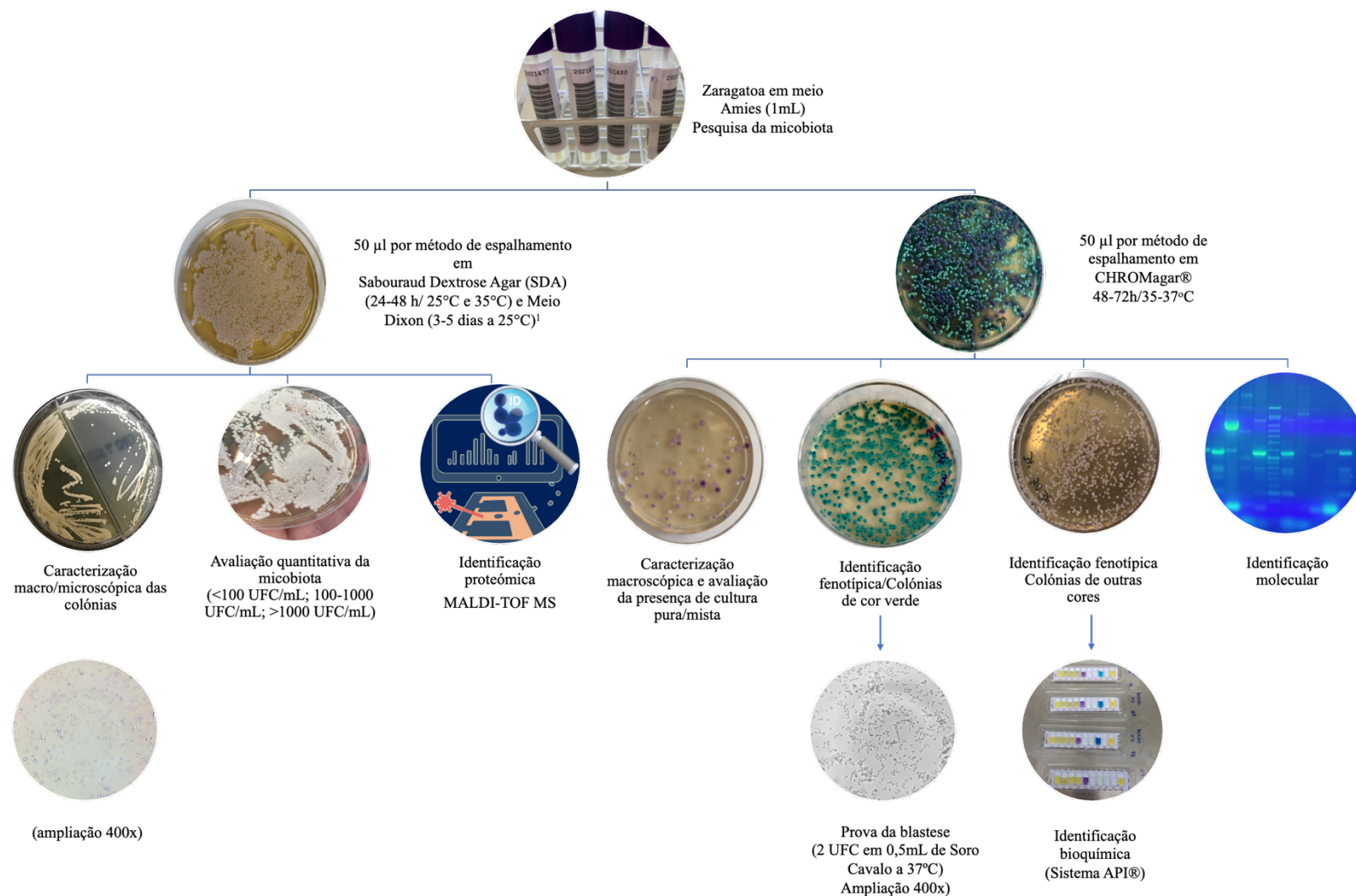


Figura 2.4. Protocolo para o rastreio micológico dos exsudados axilares e inguinais em unidades de cuidados intensivos.

¹ A inoculação em meio de Dixon foi efetuada apenas para as amostras provenientes das UCI do HFF.

De forma a assegurar a homogeneidade de um clone, as colónias com a mesma morfologia nos meios de cultura seletivos e diferenciais foram individualmente inoculadas em gelose de Sabouraud e armazenadas para subseqüentes análises, nomeadamente para a identificação proteómica e molecular.

2.3.3.2 Identificação proteómica

Para uma identificação exata, foi utilizada a abordagem proteómica através do sistema *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) VITEK MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) utilizando o software VITEK MS v3.2 (Fig. 2.4) (256).

Para a identificação por MALDI-TOF MS todos os isolados foram repicados para Gelose sangue (Columbia agar®, bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) (Fig.2.5). A partir de uma cultura pura em fase exponencial de crescimento, foi retirada uma colónia para extração usando o procedimento padrão de extração de etanol-ácido fórmico e matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França). De forma mais descritiva, primeiro uma única colónia foi aplicada com uma ansa calibrada de 1 µL sobre uma lâmina descartável (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França), composta por um suporte de polipropileno com uma camada de aço inoxidável. Em seguida, a colónia foi submetida a lise por adição de 0,5 µL de ácido fórmico (25% [v/v]). Após secagem ao ar para evaporação do ácido foi adicionado 1 µL de solução de matriz (3,1% [p/v]). Novamente, a preparação é deixada a secar à temperatura de 25°C até que a matriz cristalize sobre a amostra. A lâmina com as amostras preparadas é inserida no equipamento (Fig.2.5) (262).

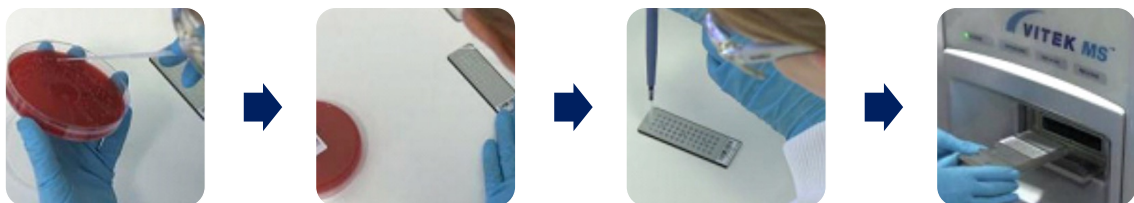


Figura 2.5. Fluxograma do procedimento experimental para a análise por MALDI-TOF Vitek MS® (adaptado das instruções do fabricante).

As amostras foram analisadas com o espectrómetro de massa Vitek MS v3.2®, em modo de ião positivo linear, em toda a gama da relação massa/carga de 2000-20.000 Da. Cada ponto foi irradiado com 500 disparos de laser a 50 Hz. *Escherichia coli* ATCC 8739 foi utilizado como controlo para calibrar as placas antes e depois da aquisição dos dados. Os espectros foram lidos e analisados de acordo com as instruções dadas pelo fabricante. O sistema de identificação Vitek MS v3.2® atribuí um peso a cada pico para cada espécie. O software compara o espectro obtido com os pesos dos picos atribuídos para cada espécie e o valor quantitativo, e de confiança, são calculados. A semelhança entre o organismo testado e cada organismo ou grupo de organismos na base de dados pode então ser expressa.

2.3.3.3 Identificação molecular

Os métodos moleculares foram utilizados nos três complexos de espécies leveduriformes do género *Candida* mais frequentemente associados a infeções humanas, para a eventualidade de se poder tratar de espécies crípticas do complexo *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* (80, 258, 349). Perante a variedade de ensaios moleculares com diferentes formatos e aplicações, já aqui descritos (introdução geral), a escolha do protocolo a ser utilizado nesta investigação teve em atenção os custos, tempo e facilidade de execução da técnica. Face ao exposto, neste trabalho, foi implementado um método rápido e simples de PCR multiplex que permite a deteção simultânea de múltiplos alvos numa única reação. O protocolo utilizado foi otimizado a partir do desenvolvido por Arastehfar e colaboradores e teve a finalidade de poder na mesma reação realizar a identificação das espécies crípticas dos complexos de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* (265).

2.3.3.3.1 Isolados e estirpes de referência

A caracterização molecular incluiu os isolados dos complexos *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Além destes isolados foram usadas as estirpes de referência seguintes: *C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 15126 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. Os isolados e as estirpes de referência foram mantidos criopreservados a -80°C em meio de

extrato de levedura-peptona-dextrose (YPD) líquido. O crescimento dos isolados e das estirpes de referência foi feito a uma temperatura de 35°C, em meio de Sabouraud Dextrose Agar.

2.3.3.3.2 Identificação por PCR multiplex

O fluxograma da identificação dos isolados dos complexos de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* está ilustrado na Figura 2.6.

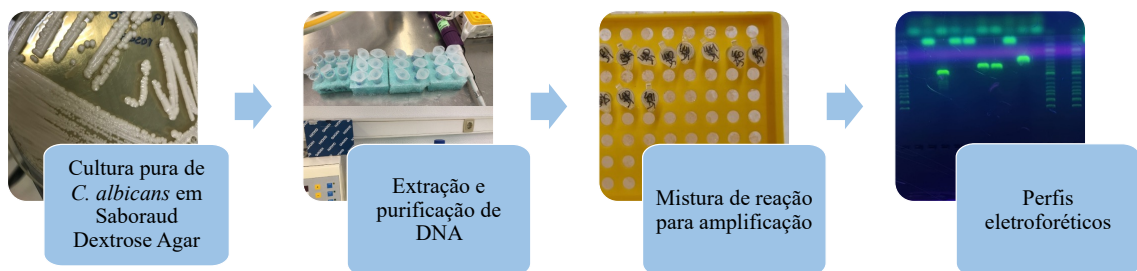


Figura 2.6. Etapas do protocolo de PCR multiplex utilizado para a identificação de espécies crípticas dos complexos *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*.

O DNA total foi extraído dos isolados utilizando NZYMicrobial gDNA Isolation Kit® (Nzytech, Lisboa, Portugal), de acordo com as instruções do fabricante (Anexo 6, 9.2.3). Os *primers* utilizados neste estudo foram previamente descritos por Arastehfar e colaboradores (265). Os *primers* foram sintetizados pela companhia Stab Vida, Portugal e incluem: *primers* universais *forward* (PACF) e *reverse*, 5'-3' (PACR) para *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. africana*. *Primers* universais *forward* (PCGF) e *reverse* (OMR) para *C. glabrata*, *C. nivariensis* e *C. bracarensis*. *Primer reverse* específico para *C. glabrata* (GR); *primer reverse* específico para *C. nivariensis* (NR); *primer reverse* específico para *C. bracarensis* (BR). *Primers forward* (PF) e *reverse* (PR) específicos para *C. parapsilosis*. *primers* universais, *forward* (OMF) e *reverse* (OMR) para *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (Anexo 7, 9.2.4.1. Tabela 9.1). A amplificação foi realizada num termociclador T100 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Califórnia, USA). Os produtos de PCR amplificados foram analisados num transiluminador UV. O protocolo experimental detalhado encontra-se descrito em anexo (Anexo 7, 9.2.4).

2.3.4 Quantificação do crescimento

Após incubação, o número total de colônias leveduriformes foi considerado como a intensidade relativa de colonização. As contagens do total de microrganismos viáveis foram efetuadas em gelose de Sabouraud e expressas em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

Os isolados recuperados das amostras foram submetidos a quantificação com base no volume inicial da amostra inoculada. As contagens foram delineadas para corresponder a limiares visuais, garantindo praticidade e precisão no processo de avaliação. A intensidade do crescimento foi distribuída em três grupos: inferior a 100 UFC/mL; 100-1000 UFC/mL; e superior a 1000 UFC/mL (350). De forma mais detalhada, as contagens inferiores a 100 UFC/mL correspondem a um máximo de 5 UFC/50 μ L, as contagens entre 100 e 1000 UFC/mL, a um máximo de 50 UFC/50 μ L e as contagens superiores a 1000 UFC/mL, a contagens superiores a 50 UFC/50 μ L. Um grau de multiplicação elevado foi definido pela detecção de mais de 1000 UFC/mL, conforme descrito anteriormente (351). As culturas foram examinadas visualmente às 24 h e às 48 h. A proporção das várias espécies de *Candida* na mesma amostra foi determinada com base nas cores distintas no meio de CHROMagar®.

2.3.5 Análise estatística

Para descrever as características demográficas, clínicas e micológicas da população estudada, foi criada uma base de dados que foi analisada com o programa IBM *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) for Windows 29.0 (IBM Corp., Armonk, NY). Neste estudo, foi efetuada uma análise exploratória e descritiva dos dados para identificar alguns padrões para cada variável da amostra. Todas as variáveis categóricas foram expressas em frequências e percentagens. O valor de p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo em qualquer uma das análises inferenciais.

2.4 Resultados

2.4.1 Caracterização da amostra

No total, foram colhidas 988 amostras, 675 na admissão, 203 em D5 e 110 em D8 cuja distribuição por UCI se encontra descrita na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Número de amostras colhidas na admissão e durante o tempo de permanência na UCI.

Dia de colheita	Unidades de Cuidados Intensivos			Total
	UCIP-HFF	UCICRE-HFF	HBA	
D1	71	64	540	675
D5	26	26	151	203
D8	13	17	80	110

2.4.2 Resultados das culturas de vigilância fúngica

Das 988 amostras, 33,3% (329/988) apresentaram-se positivas (Fig. 2.7a). Quando se detalha os resultados por unidade hospitalar, verificou-se que o número de amostras positivas no HFF era superior, 50,0% (55/110) na UCIP-HFF e 39,3% (42/107) na UCICRE-HFF, em comparação com a UCI do HBA, 30,1% (232/771) (Fig. 2.7b).

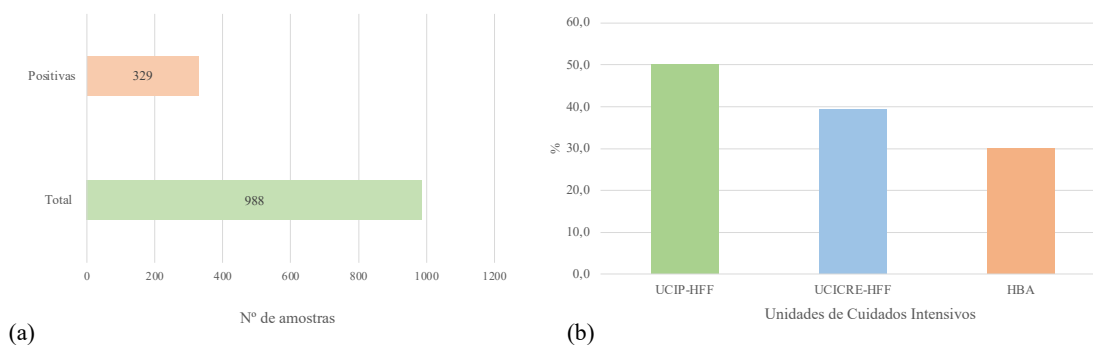


Figura 2.7. Distribuição global (a) e por unidade hospitalar (b) das amostras positivas para fungos.

2.4.3 Identificação dos isolados

2.4.3.1 Identificação por métodos fenotípicos bioquímicos e proteômica

Das 329 amostras positivas foram obtidos 371 isolados a partir dos meios Sabouraud Dextrose Agar e CHROMagar Candida®. A maioria das culturas apresentavam-se puras, 286/329 (86,9%), e apenas 43/329 (13,1%) amostras deram origem a culturas mistas com duas ou mais espécies fúngicas diferentes (Fig. 2.8).

As culturas mistas foram particularmente observadas em D1, com um decréscimo, ao longo dos pontos de recolha [D1 (25/43, 58,1%); D5 (12/43, 27,9%) e D8 (6/43, 14,0%)].

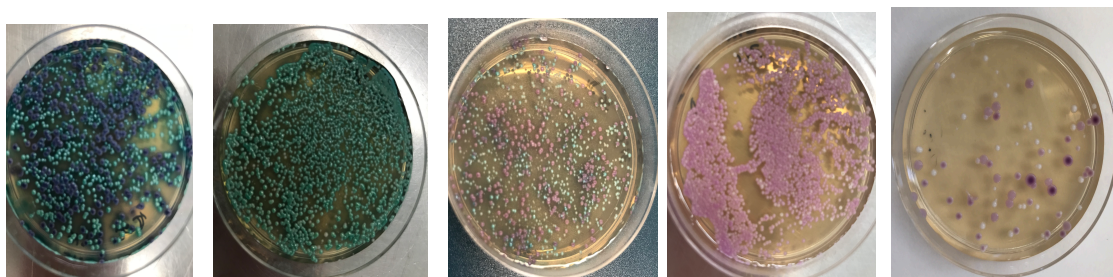


Figura 2.8. Identificação presuntiva de espécies de *Candida* em culturas mistas no meio CHROMagar Candida®.

As espécies de *Candida* identificadas presuntivamente pelos testes fenotípicos descritos incluem as seguintes: complexo *C. albicans* (n=183), complexo *C. parapsilosis* (n=115), complexo *C. glabrata* (n=39), *C. tropicalis* (n=15), *C. guilliermondii* (n=3), *C. famata* (n=2) e *C. kefyr* (n=1), *Saccharomyces cerevisiae* (n=1), *Rhodotorula* spp. (n=9) e *Trichosporon* spp. (n=3) (Tabela 2.2).

Após a identificação proteômica por MALDI-TOF MS, foram observadas discrepâncias com as espécies seguintes: *C. albicans*, complexo *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. famata*, *C. kefyr*, *T. inkin* e *T. asahii*.

Tabela 2.2. Perfis de espécies identificadas por métodos fenotípicos e proteómicos (MALDI-TOF MS).

Espécie	Métodos Fenotípicos (n)	MALDI-TOF MS (n)
<i>Candida albicans</i>	183	185
<i>Candida parapsilosis</i>	115	109
<i>Candida metapsilosis</i>	0	1
<i>Candida orthopsilosis</i>	0	2
<i>Candida glabrata</i>	39	36
<i>Candida tropicalis</i>	15	15
<i>Candida lusitaniae</i>	0	4
<i>Candida guilliermondii</i>	3	3
<i>Candida famata</i>	2	0
<i>Candida kefyr</i>	1	0
<i>Rhodotorula rubra</i>	9	9
<i>Trichosporon inkin</i>	3	5
<i>Trichosporon asahii</i>	0	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	1

A concordância direta entre o método de identificação convencional e o de MALDI-TOF MS foi de 92% (341/371) (Tabela 2.2) (Fig. 2.9).

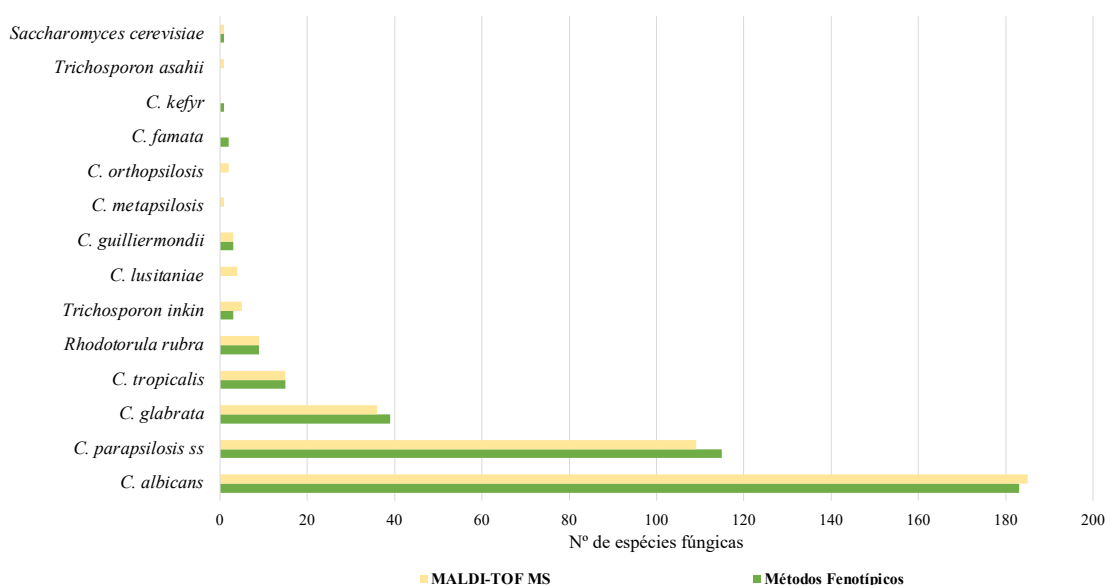


Figura 2.9. Comparação das metodologias microbiológicas fenotípicas bioquímicas e proteómicas (MALDI-TOF MS) na identificação dos isolados fúngicos.

A utilização da tecnologia MALDI-TOF MS demonstrou ser uma ferramenta superior na identificação de leveduras devido à sua capacidade de analisar o perfil proteico específico de cada organismo. Ao contrário dos métodos convencionais, que frequentemente se baseiam em características fenotípicas e bioquímicas menos precisas, o MALDI-TOF MS oferece uma identificação rápida e precisa até ao nível de espécie.

Neste caso, permitiu diferenciar corretamente espécies como *C. lusitaniae*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*, *T. inkin* e *T. asahii*, identificadas pelos métodos convencionais como *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. kefyr* (Tabela 2.2) (Fig. 2.9).

Os dois isolados de *C. orthopsilosis* foram obtidos em cultura pura e ambos produziram colónias pequenas, brancas, brilhantes e lisas no meio de Sabouraud. No meio cromogénico CHROMagar Candida® também formaram colónias brancas. Os isolados assimilaram glicose e trealose, mas não assimilaram maltose, sacarose e galactose. O isolado de *C. metapsilosis* foi obtido em cultura mista com *Saccharomyces cerevisiae* e adquirido já na UCI, sendo resultante de uma colheita efetuada ao quinto dia de internamento. O perfil fenotípico bioquímico obtido à semelhança dos isolados de *C. orthopsilosis* foi de *C. parapsilosis*.

Assim, neste estudo foram identificados quatro géneros de fungos leveduriformes por MALDI-TOF MS com um predomínio do género *Candida* 95,7% (355/371), seguido por espécies do género *Rhodotorula* 2,4% (9/371), *Trichosporon* 1,6% (6/371) e *Saccharomyces* 0,3% (1/371) (Fig. 2.10a). A identificação dos 371 isolados por MALDI-TOF MS incluiu 12 espécies de fungos leveduriformes: *C. albicans* (n=185), complexo *C. parapsilosis* (n=112) [*C. parapsilosis stricto sensu* (n=109), *C. orthopsilosis* (n=2), *C. metapsilosis* (n=1)], *C. glabrata* (n=36), *C. tropicalis* (n=15), *C. lusitaniae* (n=4), *C. guilliermondii* (n=3), *S. cerevisiae* (n=1), *R. rubra* (n=9), *T. inkin* (n=5) e *T. asahii* (n=1) (Fig. 2.10b).

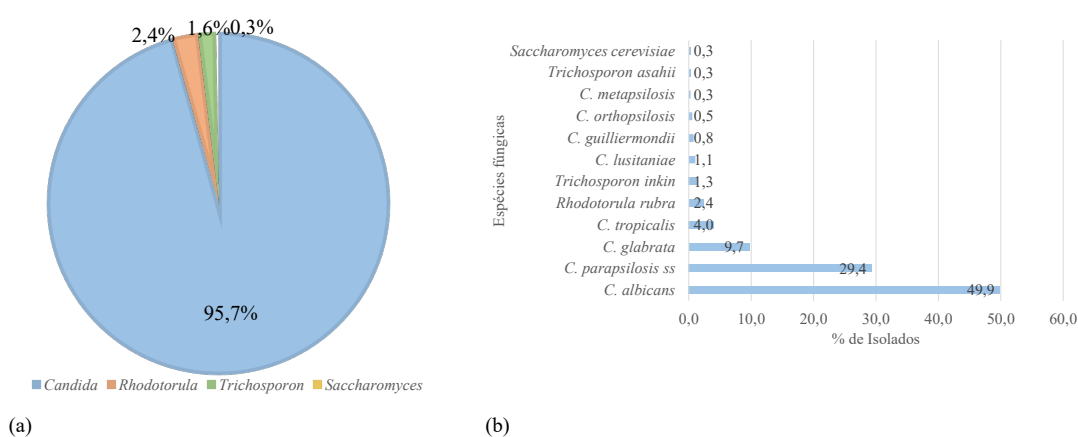


Figura 2.10. Diversidade dos isolados fúngicos (n=371) por género (a) e espécie (b).

2.4.3.2 Identificação molecular

A caracterização molecular incluiu 324 isolados de um total de 333. Aquando da repicagem do meio de conservação para SDA, não foi possível recuperar nove isolados dos complexos seguintes: *C. albicans* (n=1), *C. parapsilosis* (n=2) e *C. glabrata* (n=6). Por conseguinte, foram estudados 184 isolados do complexo *C. albicans*, 110 do complexo *C. parapsilosis* e 30 do complexo *C. glabrata*. Os isolados processados no ensaio de PCR multiplex foram identificados através dos tamanhos dos produtos de amplificação obtidos nos perfis eletroforéticos. A identificação das espécies foi atribuída com base em tamanhos distintos de produtos de PCR. Dos 184 isolados identificados como *C. albicans* todos eram *stricto sensu*. Não foram identificados isolados de *C. dubliniensis* nem de *C. africana*. Em relação aos 30 isolados identificados como *C. glabrata*, todos os isolados mostraram um padrão de bandas compatível com *C. glabrata stricto sensu*, não tendo sido identificadas *C. nivariensis* e *C. bracarensis* neste estudo (Fig.2.11).

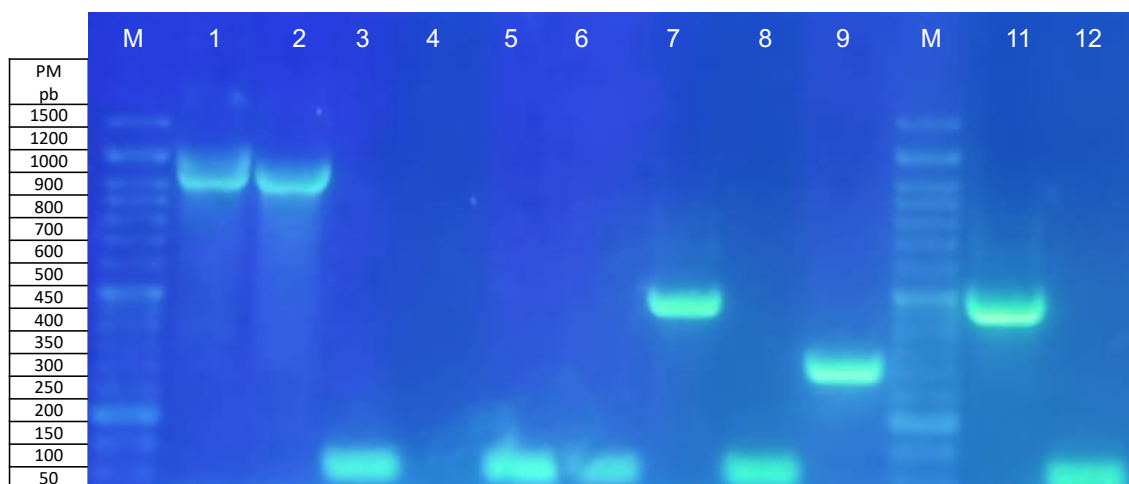


Figura 2.11. Perfis eletroforéticos dos padrões de bandas obtidos a partir dos produtos de PCR. Linha 1- *C. albicans* ATCC, linha 2- *C. albicans* ss 426D1, linha 3, 4, 6- *C. parapsilosis* ss 409D1, 403D1 e 491D1, linha 5- *C. parapsilosis* ATCC, linha 7 e 11- *C. orthopsilosis* 470D1, 2075D1, linha 9- *C. metapsilosis* 20144D5. Linha M- marcador de peso molecular de 50-1500 pb NZYDNA Ladder VI® (NZYTech, Lisboa, Portugal).

Em relação aos 110 isolados do complexo de *C. parapsilosis*, os resultados dos perfis genotípicos mostraram que 107 eram *C. parapsilosis stricto sensu*, dois eram *C. orthopsilosis* e um isolado foi identificado como *C. metapsilosis* (Fig.2.11). Os resultados obtidos mostraram concordância total entre os isolados identificados pelo ensaio de PCR

multiplex através dos tamanhos de produtos de amplificação e as identificações obtidas por MALDI-TOF MS.

Os resultados comparativos das metodologias utilizadas neste estudo para a identificação de espécie estão espelhados na Figura 2.12. Registou-se uma concordância de 100% entre os ensaios MALDI-TOF MS e PCR para a identificação das espécies dos complexos de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (Fig. 2.12).

As espécies fúngicas menos frequentes foram identificadas apenas por métodos proteómicos e não foi encontrado nenhum isolado de espécies raras e emergentes de *Candida* spp., como as espécies do complexo *C. haemulonii*, e filogeneticamente próximas.

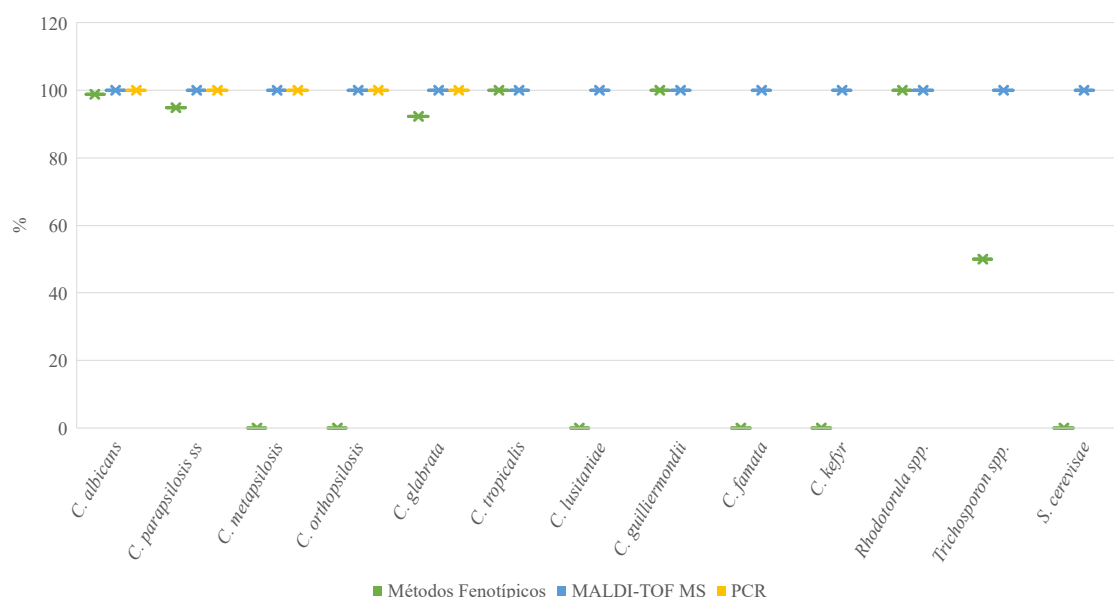


Figura 2.12. Resultados comparativos (%) entre as diferentes metodologias utilizadas na identificação das espécies fúngicas (testes fenotípicos, MALDI-TOF MS e PCR).

2.4.4. Origem dos isolados de *Candida* spp.

Um total de 355 isolados de *Candida* spp. foram obtidos durante o período a que reporta o estudo, nomeadamente 196, 96 e 63 isolados obtidos a partir dos exsudados colhidos na admissão (D1), dia 5 (D5) e dia 8 (D8), respetivamente. A sua distribuição por UCI foi a que se apresenta na Tabela 2.3.

Tabela 2.3. Origem e distribuição por UCI dos isolados de *Candida* spp.

	nº de isolados de <i>Candida</i> spp.		
	D1	D5	D8
UCIP-HFF	27	19	9
UCICRE-HFF	20	14	12
UCI- HBA	149	63	42
Total	196	96	63

2.4.4.1 Distribuição de isolados entre espécies de *Candida albicans* vs não-*albicans*

Os resultados gerais obtidos mostraram que *C. albicans* continua a ser a espécie mais isolada, com 185/355 (52,1%), o que traduz uma distribuição quase equitativa entre *C. albicans* e espécies de *Candida* não-*albicans* (CNA) (Fig.2.13a). Se particularizarmos por unidade hospitalar, nas UCI do HFF 61/101 (60,4%) dos isolados são de CNA por oposição a apenas 109/254 (42,9%) no HBA (Fig.2.13b). Se se considerar a distribuição dos isolados de *C. albicans* versus CNA ao longo da primeira semana de internamento, observou-se um aumento discreto no número de isolados de *C. albicans* em todas as UCI, nomeadamente, 48,5%, 55,2% e 58,7%, respetivamente em D1, D5 e D8 (Fig. 2.13c).

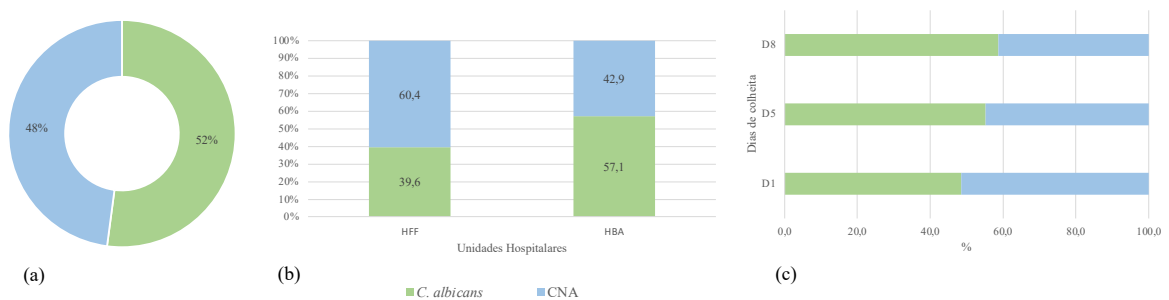


Figura 2.13. Distribuição dos isolados de *C. albicans* vs. não-*albicans*. (a) no geral, (b) por unidade hospitalar e (c) por dia de colheita: admissão (D1) e ao 5º (D5) e 8º (D8) dia de internamento.

Quando se considerou a distribuição dos isolados de *C. albicans* versus CNA por UCI nos diferentes dias de colheita, foi possível observar variações significativas. Na admissão ao serviço, na UCIP-HFF e UCICRE-HFF há um predomínio de CNA, 22/27 (81,5%) e 11/20 (55,0%), respetivamente, em relação à UCI do HBA 68/149 (45,6%) ($p=0,003$) (Fig.2.14). Porém ao longo do internamento os valores mostram uma tendência para um equilíbrio entre *C. albicans* e espécies de CNA para as três UCI, D5 ($p=0,343$) e D8 ($p=0,745$). Na UCIP-HFF e UCICRE-HFF, foram obtidos resultados positivos para CNA, em D5, de 57,9% e 50,0% e em D8, de 44,4% e 50,0%, respetivamente (Fig.2.14).

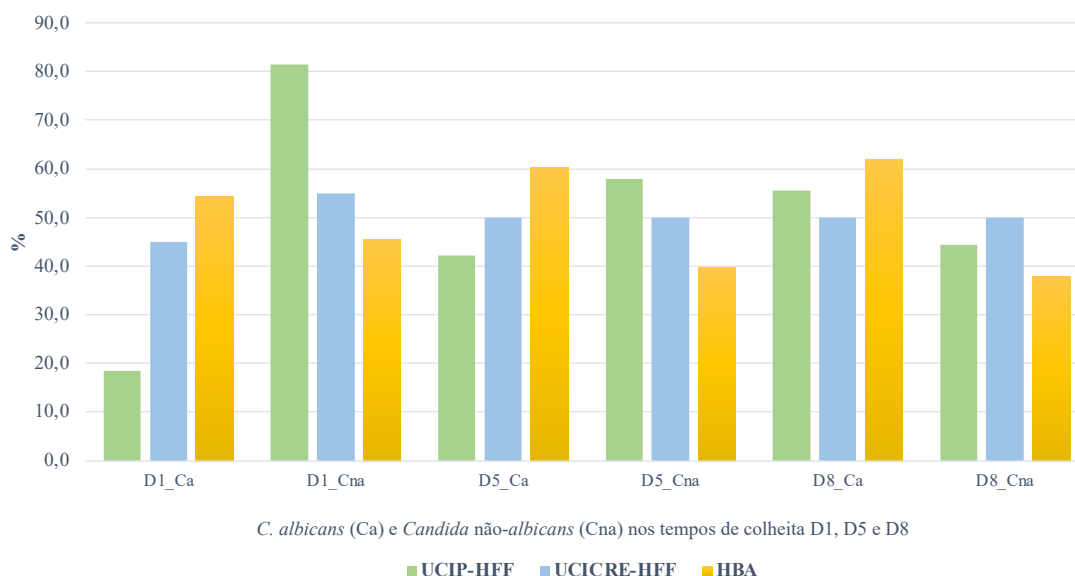


Figura 2.14. Distribuição dos isolados de *C. albicans* vs. não-*albicans* por UCI nos diferentes dias de coleta (D1, D5 e D8).

2.4.4.2 Diversidade de espécies de *Candida* spp.

A diversidade dos isolados revelou a presença de oito espécies diferentes do género *Candida*, sendo que se for considerada a diversidade de espécies de *Candida* por UCI e unidade hospitalar, é possível observar que esta é menor na UCICRE do HFF (Fig.2.15). A UCI do HBA e a UCIP do HFF evidenciaram a presença das oito espécies de *Candida* identificadas, mas com valores percentuais diferentes (Fig.2.15).

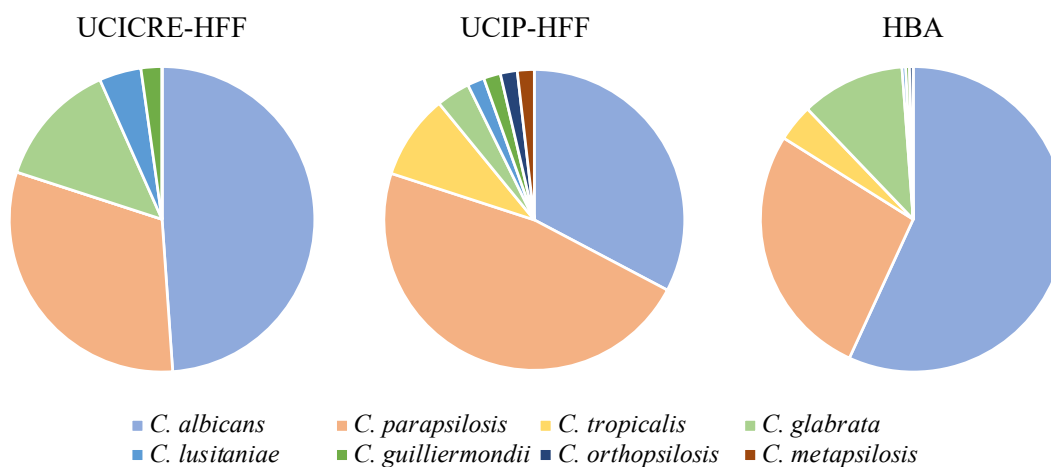


Figura 2.15. Distribuição dos isolados de *Candida* spp. por UCI entre os anos de 2020-2022.

Os resultados deste estudo mostram que a distribuição de espécies de *Candida* entre hospitais e tipo de UCI foi significativamente diferente, com uma maior percentagem de isolados de espécies CNA nas UCI do HFF em comparação com a UCI do HBA ($p=0,002$).

Na UCI do HBA e UCICRE-HFF, *C. albicans* foi a espécie mais isolada, com 145/254 (57,1%) e 22/46 (47,8%), respetivamente ($p=0,004$). Porém, para a UCIP-HFF, a espécie mais prevalente é *C. parapsilosis* 26/55 (47,3%) ($p=0,011$) (Tabela 2.4). No entanto, *C. glabrata* foi mais frequentemente isolada na UCI do HBA, em comparação com as outras duas unidades, embora sem significado estatístico (Tabela 2.4).

Considerando a prevalência dos isolados de CNA, *C. parapsilosis* ocupou o segundo lugar, exceto na UCI polivalente do HFF, onde se identificou como a espécie mais prevalente (26/55, 47,3%) ($p=0,011$) (Fig. 2.15). Os isolados crípticos do complexo *C. parapsilosis* foram obtidos apenas nas UCI gerais do HFF e HBA, embora sem relevância estatística (Tabela 2.4).

É de referir a ausência de isolados de *C. tropicalis* na UCICRE-HFF em todos os pontos de colheita, e embora o número de isolados de *C. tropicalis* não seja elevado, a sua distribuição por UCI é característica e estatisticamente significativa para a UCIP do HFF, na admissão (5/27, 18,5%) ($p=0,006$) (Tabela 2.4).

Relativamente à frequência de *C. lusitaniae*, esta espécie foi detetada de forma significativa na UCICRE do HFF em D8 ($p=0,012$). Para os demais isolados de espécies de *Candida*, não foram observadas variações significativas entre as diferentes UCI analisadas durante o período de internamento estudado (Tabela 2.4).

Tabela 2.4. Distribuição dos isolados de *Candida* spp. por UCI e dia de colheita¹.

<i>Candida</i> spp. n=355	Total	UCIP-HFF n=55	UCICRE-HFF n=46	HBA n=254	p
<i>C. albicans</i> ss	185/355 (52,1)	18/55 (32,7)	22/46 (47,8)	145/254 (57,1)	0,004
D1	95/196 (48,5)	5/27 (18,5)	9/20 (45,0)	81/149 (54,4)	0,003
D5	53/96 (55,2)	8/19 (42,1)	7/14 (50,0)	38/63 (60,3)	0,343
D8	37/63 (58,7)	5/9 (55,6)	6/12 (50,0)	26/42 (61,9)	0,745
<i>C. parapsilosis</i> ss	109/355 (30,7)	26/55 (47,3)	15/46 (32,6)	68/254 (26,8)	0,011
D1	71/196 (36,2)	14/27 (51,9)	9/20 (45,0)	48/149 (32,2)	0,102
D5	25/96 (26,0)	9/19 (47,4)	4/14 (28,6)	12/63 (19,0)	0,047
D8	13/63 (20,6)	3/9 (33,3)	2/12 (16,7)	8/42 (19,0)	0,587
<i>C. glabrata</i> ss	36/355 (10,1)	2 (3,6)	6 (13,0)	28 (11,0)	0,202
D1	13/196 (6,6)	1/27 (3,7)	1/20 (5,0)	11/149 (7,4)	0,743
D5	14/96 (14,6)	1/19 (5,3)	3/14 (21,4)	10/63 (15,9)	0,380
D8	9/63 (14,3)	0/9 (0,0)	2/12 (16,7)	7/42 (16,7)	0,417
<i>C. tropicalis</i>	15/355 (4,2)	5/55 (9,1)	0/46 (0,0)	10/254 (3,9)	0,071
D1	11/184 (6,0)	5/27 (18,5)	0/20 (0,0)	6/149 (4,0)	0,006
D5	3/96 (3,1)	0/19 (0,0)	0/14 (0,0)	3/63 (4,8)	0,444
D8	1/63 (1,6)	0/9 (0,0)	0/12 (0,0)	1/42 (2,4)	0,776
<i>C. lusitaniae</i>	4/355 (1,1)	1/55 (1,8)	2/46 (4,3)	1/355 (0,4)	0,057
D1	2/196 (1,0)	1/27 (3,7)	0/20 (0,0)	1/149 (0,7)	0,315
D5	0/96 (0,0)	0/19 (0,0)	0/14 (0,0)	0/63 (0,0)	NA ²
D8	2/63 (3,2)	0/9 (0,0)	2/12 (16,7)	0/42 (0,0)	0,012
<i>C. guilliermondii</i>	3/355 (0,8)	1/55 (1,8)	1/46 (2,2)	1/254 (0,4)	0,331
D1	2/196 (1,0)	0/27 (0,0)	1/20 (5,0)	1/149 (0,7)	0,166
D5	0/96 (0,0)	0/19 (0,0)	0/14 (0,0)	0/63 (0,0)	NA ²
D8	1/63 (1,6)	1/9 (11,1)	0/12 (0,0)	0/42 (0,0)	0,047
<i>C. orthopsilosis</i>	2/355 (0,6)	1/55 (1,8)	0/46 (0,0)	1/254 (0,4)	0,380
D1	2/196 (1,0)	1/27 (3,7)	0/20 (0,0)	1/149 (0,7)	0,315
D5	0/96 (0,0)	0/96 (0,0)	0/14 (0,0)	0/63 (0,0)	NA ²
D8	0/63 (0,0)	0/8 (0,0)	0/11 (0,0)	0/39 (0,0)	NA ²
<i>C. metapsilosis</i>	1/355 (0,3)	1/55 (1,8)	0/46 (0,0)	0/254 (0,0)	0,065
D1	0/196 (0,0)	0/27 (0,0)	0/20 (0,0)	0/149 (0,0)	NA ²
D5	1/96 (1,0)	1/19 (5,3)	0/14 (0,0)	0/63 (0,0)	0,129
D8	0/63 (0,0)	0/8 (0,0)	0/11 (0,0)	0/39 (0,0)	NA ²

¹ Os dados são apresentados em n.º (%), salvo indicação em contrário. ² Não aplicável.

Quando se avaliou a distribuição das espécies de *Candida* ao longo dos pontos de colheita, é interessante observar uma diminuição do número de isolados de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* ao longo dos diferentes pontos de colheita em todas as UCI em análise. Já para *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. lusitaniae* a tendência evidenciada é oposta, sugerindo a aquisição destas espécies na UCI (Fig. 2.16).

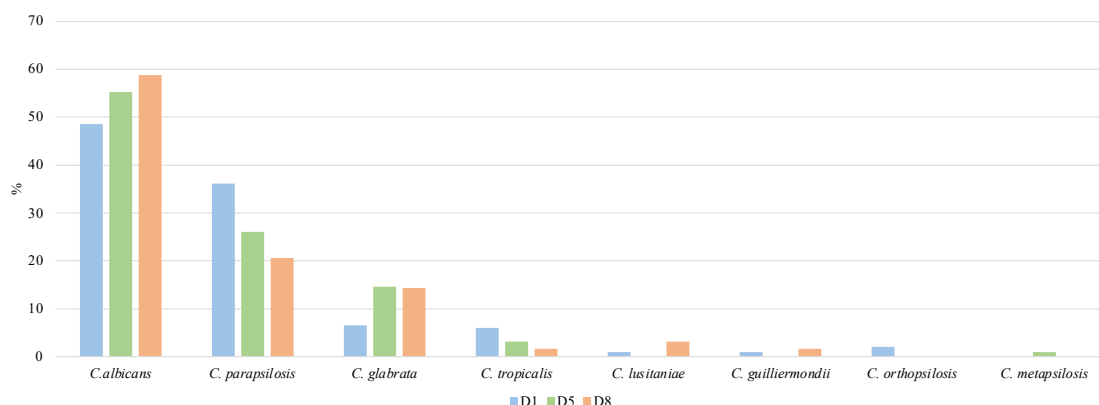


Figura 2.16. Distribuição das espécies de *Candida* na admissão à UCI e durante o internamento.

Das amostras que apresentaram culturas mistas, 43/329 (13,1%), são compostas maioritariamente por *C. albicans* e uma espécie de CNA (37/43, 86%).

A combinação de *C. albicans* e *C. parapsilosis*, *C. albicans* e *C. glabrata* e *C. albicans* e *C. tropicalis* foi encontrada em 19, seis e três amostras, respetivamente. As culturas combinadas de CNA eram compostas por: *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (seis), *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (uma), *C. glabrata* e *C. tropicalis* (duas). Em seis amostras foram obtidas culturas mistas entre *C. albicans* (quatro) e *C. parapsilosis* (dois) com outros fungos leveduriformes para além de *Candida* spp. (Fig. 2.17).

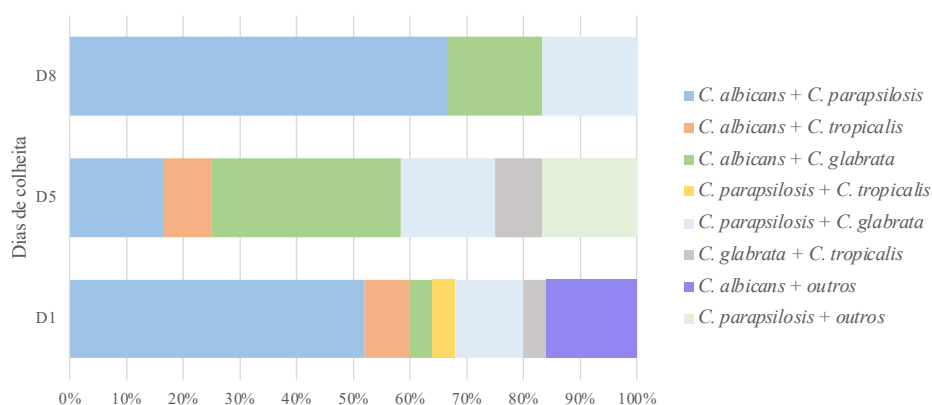


Figura 2.17. Distribuição das espécies fúngicas em culturas mistas durante o período de recolha na UCI (D1, D5 e D8). Outros inclui os isolados de fungos leveduriformes não *Candida*.

Quando se considera a amostragem em termos temporais, a dinâmica dos isolados de espécies de *Candida* de 2020 a 2022 está expressa na Tabela 2.5 e é possível observar uma duplicação da prevalência por espécie de *Candida* entre 2021 e 2022, resultados correspondentes apenas à unidade hospitalar HBA.

Tabela 2.5. Distribuição dos isolados de *Candida* spp. de doentes em UCI ao longo do tempo (2020-2022)¹.

Espécies	2020 (n= 101)	2021 (n= 100)	2022 (n= 154)	Total (n= 355)
<i>C. albicans</i>	40 (39,6)	57 (57,0)	88 (57,1)	185 (52,1)
Complexo <i>C. parapsilosis</i> *	43 (42,6)	25 (25,0)	44 (28,6)	112 (31,5)
<i>C. glabrata</i>	8 (7,9)	12 (12,0)	16 (10,4)	36 (10,1)
<i>C. tropicalis</i>	5 (5,0)	6 (6,0)	4 (4,6)	15 (4,5)
<i>C. lusitaniae</i>	3 (3,0)	0 (0,0)	1 (0,6)	4 (1,1)
<i>C. guilliermondii</i>	2 (2,0)	0 (0,0)	1 (0,6)	3 (0,8)

¹Os dados são apresentados como N (%), exceto quando especificado de outra forma. * Dois isolados foram identificados como *C. orthopsilosis* (1,8%); um isolado como *C. metapsilosis* (0,9%).

2.4.5 Quantificação do crescimento

Das amostras positivas, 167/329 (50,8%), 84/329 (25,4%) e 78/329 (22,8%) apresentaram uma densidade de crescimento fúngico elevado (superior a 1000 UFC/mL), densidade média de 100 a 1000 UFC/mL e abaixo de 100 UFC/mL, respetivamente (Fig. 2.18a).

Ao longo do internamento na UCI foi possível observar algumas variações no número de UFC/mL. Para as amostras com contagens inferiores a 100 UFC/mL, verificou-se uma ligeira diminuição após a admissão na UCI e um aumento após o D5 de internamento (D1: 30,4%; D5: 12,6% e D8: 19,0%). Para os valores intermédios de colonização entre 100 e 1000 UFC/mL, verificou-se um aumento linear ao longo dos pontos de prevalência (D1: 22,8%; D5: 25,3% e D8: 34,5%). As amostras densamente colonizadas (superior a 1000 UFC/mL) aumentaram gradualmente até ao D5 de internamento e no D8 apresentaram taxas de colonização semelhantes às do D1 (D1: 46,7%; D5: 62,1% e D8: 46,6%) (Fig. 2.18b). No entanto, não foram encontradas diferenças estatísticas na

intensidade de UFC/mL em cada um dos pontos de recolha (D1, $p= 0,223$; D5, $p= 0,939$ e D8, $p= 0,669$).

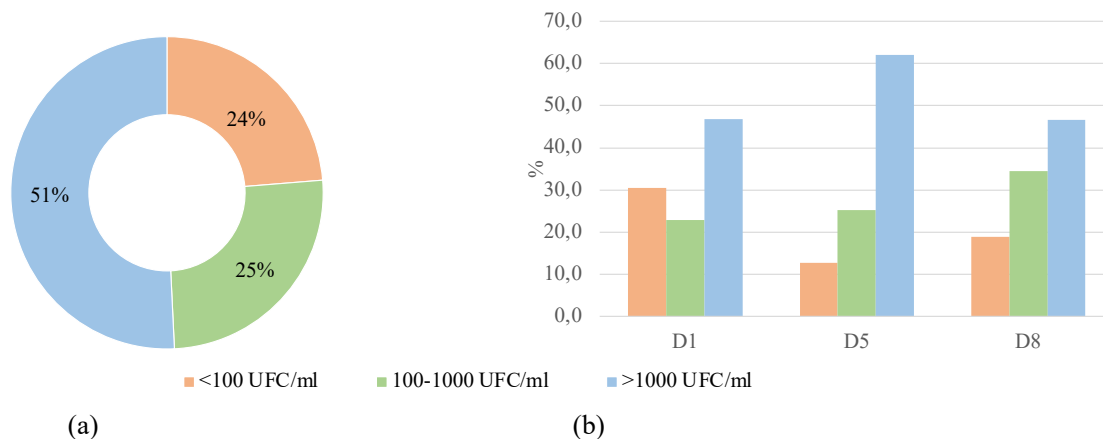


Figura 2.18. Distribuição da densidade do crescimento fúngico (UFC/mL) em UCI: (a) global e (b) na admissão (D1) e durante o internamento ao 5º e 8º dia (D5 e D8).

A densidade de colonização encontrada para *C. albicans* foi elevada (superior a 1000 UFC/mL). Porém, não foi encontrada associação estatística entre o grau de colonização e a espécie de *Candida*. Apenas, em D8 para *C. glabrata* foi possível observar culturas com menor densidade de colonização (inferior a 100 UFC/mL) de forma significativa ($p= 0,048$) (Tabela 2.6).

Tabela 2.6. Distribuição das UFC por espécie de *Candida* e dia de colheita (D1, D5 e D8)¹.

<i>Candida</i> spp. n=355	Total	< 100 UFC/mL n= 81	100-1000 UFC/mL n= 90	> 1000 UFC/mL n= 184	p
<i>C. albicans</i>	185/355 (52,1)	39/81 (48,1)	46/90 (51,1)	100/184 (54,3)	0,633
D1	95/196 (48,5)	27/56 (48,2)	19/45 (42,2)	49/95 (51,6)	0,585
D5	53/96 (55,2)	8/14 (57,1)	13/25 (52,0)	32/57 (56,1)	0,930
D8	37/63 (58,7)	4/11 (36,4)	14/20 (70,0)	19/32 (59,4)	0,190
<i>C. parapsilosis</i>	109/355 (30,7)	27/81 (33,3)	28/90 (31,1)	54/184 (29,3)	0,807
D1	71/196 (36,2)	22/56 (39,3)	20/45 (44,4)	29/95 (30,5)	0,237
D5	25/96 (26,0)	3/14 (21,4)	5/25 (20,0)	17/57 (29,8)	0,591
D8	13/63 (20,6)	2/11 (18,2)	3/20 (15,0)	8/32 (25,0)	0,670
<i>C. glabrata</i>	36/355 (10,1)	9/81 (11,1)	11/90 (12,2)	16/184 (8,7)	0,627
D1	13/196 (6,6)	3/56 (5,4)	2/45 (4,4)	8/95 (8,4)	0,611
D5	14/96 (14,6)	2/14 (14,3)	6/25 (24,0)	6/57 (10,5)	0,282
D8	9/63 (14,3)	4/11 (36,4)	3/20 (15,0)	2/32 (6,3)	0,048
<i>C. tropicalis</i>	15/355 (4,2)	3/81 (3,7)	4/90 (4,4)	8/184 (4,3)	0,965
D1	11/184 (6,0)	1/56 (1,8)	3/45 (6,7)	7/95 (7,4)	0,334
D5	3/96 (3,1)	1/14 (7,1)	1/25 (4,0)	1/57 (1,8)	0,559
D8	1/63 (1,6)	1/11 (9,1)	0/20 (0,0)	0/32 (0,0)	0,091
<i>C. lusitaniae</i>	4/355 (1,1)	2/81 (2,5)	0/90 (0,0)	2/184 (1,1)	0,311
D1	2/196 (1,0)	2/56 (3,6)	0/45 (0,0)	0/95 (0,0)	0,080
D5	0/96 (0,0)	0/14 (0,0)	0/25 (0,0)	0/57 (0,0)	NA ²
D8	2/63 (3,2)	0/11 (0,0)	0/20 (0,0)	2/32 (6,3)	0,368
<i>C. guilliermondii</i>	3/355 (0,8)	1/81 (1,2)	0/90 (0,0)	2/184 (1,1)	0,594
D1	2/196 (1,0)	1/56 (1,8)	0/42 (0,0)	1/86 (1,2)	0,674
D5	0/96 (0,0)	0/14 (0,0)	0/25 (0,0)	0/57 (0,0)	NA ²
D8	1/63 (1,6)	0/11 (0,0)	0/20 (0,0)	1/32 (3,1)	0,611
<i>C. orthopsilosis</i>	2/355 (0,6)	0/81 (0,0)	1/90 (1,1)	1/184 (0,5)	0,624
D1	2/196 (1,0)	0/56 (0,0)	1/45 (2,2)	1/95 (1,1)	0,543
D5	0/96 (0,0)	0/14 (0,0)	0/25 (0,0)	0/57 (0,0)	NA ²
D8	0/63 (0,0)	0/11 (0,0)	0/20 (0,0)	0/32 (0,0)	NA ²
<i>C. metapsilosis</i>	1/355 (0,3)	0/81 (0,0)	0/90 (0,0)	1/184 (0,5)	0,628
D1	0/196 (0,0)	0/56 (0,0)	0/20 (0,0)	0/54 (0,0)	NA ²
D5	1/96 (1,0)	0/14 (0,0)	0/25 (0,0)	1/57 (1,8)	0,708
D8	0/63 (0,0)	0/11 (0,0)	0/20 (0,0)	0/32 (0,0)	NA ²

¹ Os dados são apresentados em n.º (%), salvo indicação em contrário. ² Não aplicável.

2.5 Discussão

A identificação precisa das espécies fúngicas colonizadoras representa um acréscimo importante nos estudos epidemiológicos num determinado período e local. Neste estudo verificou-se que os métodos convencionais baseados em características fenotípicas ou bioquímicas foram insuficientes para fornecer uma identificação precisa de todos os isolados. Por conseguinte, foi necessário a utilização da tecnologia MALDI-TOF MS na identificação rápida e exata de espécies fúngicas até ao nível da espécie.

A confirmação da identificação das espécies de *Candida* dos complexos *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, foi efetuada por identificação molecular com base no protocolo desenvolvido por Arastehfar e colaboradores, que permitiu a deteção simultânea das espécies crípticas numa única reação (265). Esta metodologia teve a finalidade de identificar as espécies crípticas destes complexos e investigar a existência de novas espécies ainda não identificadas em Portugal, sendo *C. africana* um exemplo.

O procedimento experimental otimizado, revelou um ensaio de PCR multiplex de fácil execução, baixo custo, altamente específico e preciso. Os resultados de concordância entre as diferentes metodologias utilizadas neste estudo corroboram as conclusões já publicadas por outros autores, sendo uma limitação dos métodos convencionais a incapacidade de identificar espécies crípticas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* ou espécies não-*albicans* como *C. lusitaniae* (252, 352, 353).

A diversidade da microbiota fúngica foi baixa, constituída apenas por fungos leveduriformes e ausência de isolados do género fúngico potencialmente descrito como o principal colonizador da pele humana, o género *Malassezia* (354). Ao longo do período de colheitas (D1 a D8) também se observou uma diminuição da diversidade de espécies associada a uma diminuição do número de culturas mistas.

No que se refere à diversidade de isolados de *Candida* spp. neste estudo prospetivo, foram identificadas oito espécies de *Candida*. A distribuição geral dos isolados evidenciou percentagens quase iguais de *C. albicans* (52,1%) e espécies de CNA (47,9%) com um desvio para CNA no dia da admissão (54,9%), particularmente para as UCI do HFF (60,4%) ($p= 0,004$). Estes resultados realçam a variabilidade da frequência das espécies de *Candida*, dependendo da epidemiologia hospitalar local.

Os resultados obtidos estão de acordo com estudos globais anteriores, que evidenciaram uma mudança, na última década, a favor da prevalência de CNA em UCI (145, 355-357). Embora *C. albicans* tenha sido anteriormente o agente patogénico dominante, responsável por dois terços das infeções fúngicas nosocomiais, um número crescente de CNA tem vindo a ser identificado como responsável por quase 50% das infeções, ou mesmo superior em alguns casos (31, 357, 358).

Tal pode dever-se não só a alterações no espectro fúngico, mas também à utilização de técnicas moleculares, que permitem uma melhor identificação das espécies de CNA. No entanto, neste estudo, *C. albicans* ainda foi a principal espécie, mas com menor prevalência do que um estudo anterior realizado no norte de Portugal (130). Estes resultados são corroborados por outros autores que evidenciaram que na Europa, *C. albicans* ocupa o primeiro lugar em amostras provenientes de doentes colonizados em UCI (347, 355, 359, 360). O mesmo padrão é observado para isolados de candidemia (361-363). Nomeadamente, num estudo retrospectivo multicêntrico recente de seis hospitais terciários do sul da Europa, *C. albicans* foi a espécie dominante (42,0 %) em UCI (364).

A amostragem sequencial para avaliação da dinâmica das espécies de *Candida* ao longo do tempo encontrou resultados estáveis embora pareça favorecer a prevalência de *C. albicans* sobre as espécies não-*albicans*. Esta dinâmica da estabilidade das espécies colonizadoras está em linha com estudos anteriores longitudinais efetuados a partir de amostras recolhidas das vias respiratórias (365, 366). Porém, o estudo de Delhaes e colaboradores encontrou diferenças significativas na espécie e densidade de *Candida* no mesmo doente ao longo do tempo (367). No decorrer dos pontos de colheita pode observar-se que *C. albicans* foi a espécie que manteve a sua colonização e na grande maioria das vezes fortemente associada a uma densidade de colonização elevada. Estes resultados epidemiológicos reforçam os conhecimentos disponíveis sobre os factores de virulência desta espécie leveduriforme (91). De todas as espécies de *Candida*, *C. albicans* é de facto a espécie que dispõe de um número maior de factores de virulência permitindo-lhe desta forma manter-se viável durante mais tempo no hospedeiro. Por seu turno as espécies não-*albicans* mostraram-se mais relacionadas com uma colonização transitória, por vezes substituídas por espécies CNA diferentes entre a admissão à UCI e as colheitas realizadas após uma semana de internamento (D8).

As espécies do complexo *C. albicans* são as mais frequentemente isoladas de amostras clínicas (31). No entanto, as espécies crípticas deste complexo, como *C. dubliniensis* e *C. africana*, são frequentemente identificadas incorretamente ou não identificadas, podendo este viés sobrestimar o número de *C. albicans* (271, 272). Neste estudo, 184 isolados do complexo *albicans* foram analisados pela amplificação de sequências específicas da região do gene da proteína da parede da hifa (*HWPI*). Todos os isolados foram identificados como *C. albicans stricto sensu*, resultados concordantes com outros estudos epidemiológicos efetuados, inclusive em Portugal (130, 270).

Refere-se que a prevalência das espécies crípticas deste complexo está muito ligada às comorbilidades e aos factores predisponentes do hospedeiro, especialmente para *C. dubliniensis*. Esta espécie, é isolada preferencialmente de mucosas de indivíduos HIV/SIDA sob terapêutica profilática com fluconazol (98). Porém, estudos mais recentes após terapêutica antirretroviral (ART) evidenciaram a ausência desta espécie críptica (368). Vários estudos indicam uma prevalência de *C. dubliniensis* baixa em casos de candidemia (inferior a 1,5%) (83, 102, 128, 130, 369). Como exemplo refere-se o estudo retrospectivo efetuado por Khan e colaboradores durante um período de 12 anos, em que a partir de 2075 isolados sanguíneos, apenas 22 isolados (1,5%) foram identificados como *C. dubliniensis* (370).

Para *C. africana*, os resultados da epidemiologia têm mostrado valores percentuais inferiores a 1%, relacionados particularmente com a zona geográfica, o género feminino e infeções vulvovaginais (105, 274, 371). Fontecha e colaboradores, a partir de 66 isolados de leveduras de uma coleção de fungos previamente obtidos a partir de diferentes amostras clínicas identificaram 52 isolados (78,8%) como *C. albicans stricto sensu*, três (4,5%) isolados como *C. dubliniensis* e dois (3%) como *C. africana* (257). Estes resultados mostraram uma proporção maior do que a relatada em estudos semelhantes. Um estudo efetuado na Argentina com origem em isolados obtidos de doentes com candidose vulvovaginal mostrou que apenas dois casos de infeção (3,8%) foram causados por *C. dubliniensis*. *C. africana* não foi encontrada entre esses isolados (274). Uma avaliação retrospectiva em 376 isolados de *Candida* spp. obtidos de mulheres com infeções vaginais mostrou uma prevalência de 1,6% de *C. dubliniensis* e *C. africana* (271). Outro estudo realizado na China com mais de mil isolados mostrou 1,5% de prevalência de *C. africana*, mas não encontrou isolados de *C. dubliniensis* (106). Mais recentemente, no

Irão a partir de 133 isolados de doentes com candidose vulvovaginal, 119 foram identificados molecularmente como *C. albicans* (89,47%), 11 como *C. africana* (8,27%) e três como *C. dubliniensis* (2,26%) (107). Em outro estudo, também do Irão, a representatividade ainda foi maior: de 52 casos de candidose vulvovaginal, foram isoladas 21 estirpes de *C. albicans* (n = 21; 40.4%), três de *C. africana* (n = 3; 5.7%) e uma de *C. dubliniensis* (n = 1; 1.9%), mas sem alterações de susceptibilidades aos antifúngicos dignas de referência (105).

No entanto, também é relevante evidenciar que ambas as espécies crípticas deste complexo já foram responsabilizadas por infeções nosocomiais invasivas e daí ter feito todo o sentido efetuar a sua pesquisa em isolados provenientes de doentes em UCI, ainda que sejam isolados colonizadores (371). Outra diferença significativa que justifica a ausência destas espécies crípticas neste estudo, é o produto biológico de origem dos isolados. Neste estudo, apenas um tipo de produto biológico foi utilizado, exsudado combinado das regiões intertriginosas axilar e inguinal, sendo que as espécies crípticas de *C. albicans* têm vindo a ser isoladas particularmente a partir de amostras de exsudados orais e vulvovaginais.

Das amostras positivas, 13,1% (43/329) apresentaram mais de uma espécie de *Candida*, com uma diminuição ao longo do tempo de permanência na UCI. Estes resultados são sugestivos de uma eventual transição de colonização para infeção, uma vez que a presença de culturas mistas de uma amostra biológica sética, onde não há um isolado predominante, é indicador de colonização (8). Porém, não foi possível determinar com este estudo se estes isolados foram responsáveis por infeção subsequente.

Os resultados obtidos sugerem heterogeneidade regional com uma interação complexa de factores ao nível do centro hospitalar e do doente, relevantes na determinação da prevalência local e das tendências temporais para as espécies de CNA. Porém mais estudos de amostras mucocutâneas são necessários para reforçar os resultados obtidos neste estudo.

Relativamente à distribuição das espécies de CNA na Europa, esta é dependente da região; nos países do centro e do norte da Europa, a segunda espécie mais comum é geralmente *C. glabrata* e representa de 15 a 25% dos isolados de *Candida* (358). Nos hospitais do sul da Europa (Portugal, Espanha, Itália e Grécia), *C. parapsilosis* é a segunda espécie mais comum depois de *C. albicans* (128, 364, 372, 373). Foi igualmente

mencionada uma variação na prevalência de acordo com o país, observando-se diferenças significativas na América do Norte. No Canadá, *C. parapsilosis* ocupa o segundo lugar, enquanto nos EUA assume o terceiro, refletindo diferenças epidemiológicas regionais (71, 112, 374). De acordo com os estudos efetuados sobre infeções fúngicas da corrente sanguínea na Ásia (China e Japão), *C. parapsilosis* é frequentemente isolada depois de *C. albicans* (358, 375). Por outro lado, noutros países asiáticos, especialmente na Índia e no Paquistão, *C. tropicalis* tornou-se a espécie predominante (61, 88). Na América Latina, as três espécies mais frequentes são *C. albicans* (cerca de 40-45%), *C. parapsilosis* (cerca de 25-30%) e *C. tropicalis* (cerca de 15%), com uma distribuição estável em estudos sucessivos (60, 112, 145). Em consonância com os estudos prévios, esta investigação revelou que *C. parapsilosis* e *C. glabrata* foram as duas principais espécies colonizadoras de espécies de CNA nas UCI em estudo, com prevalência do complexo *C. parapsilosis* (31,5%) (145, 355, 356, 358, 364, 376, 377). Vale a pena realçar que foi encontrada uma associação positiva entre as UCI locais e *C. parapsilosis* ($p=0,011$), particularmente para D5 na UCI geral do HFF ($p=0,047$). Este facto pode dever-se à capacidade inata de *C. parapsilosis* aderir a superfícies protésicas e a dispositivos médicos implantados, uma vez que esta levedura coloniza com sucesso a pele e membranas mucosas humanas. Por isso, não foi surpreendente a prevalência alcançada neste estudo, uma vez que foram utilizadas amostras da zona axilar e inguinal.

Estes resultados poderão contribuir para o reforço das medidas de controlo de infeção, uma vez que as mãos dos profissionais de saúde são reconhecidas como um dos principais vetores de aquisição nosocomial de *C. parapsilosis*. Comparando a distribuição global das espécies de *Candida* com estudos portugueses anteriores, encontrou-se um padrão constante de distribuição da prevalência das espécies de *Candida* em doentes em UCI (130). Porém, os resultados de um estudo retrospectivo anterior de um único centro no Norte de Portugal, mostraram que *C. glabrata* (22,2%) ficou em segundo lugar, seguida por *C. parapsilosis* (15,4%), *C. tropicalis* (4,3%) e *C. lusitaniae* (2,6%) (353).

Em relação aos 110 isolados do complexo *C. parapsilosis*, a PCR multiplex mostrou que a maioria dos isolados eram *C. parapsilosis* ss, sendo que dois foram identificados como *C. orthopsilosis* (1,8%) e um como *C. metapsilosis* (0,9%). Os resultados obtidos por amplificação de sequências específicas para estas espécies foram concordantes com os obtidos através da tecnologia MALDI-TOF. Estes resultados estão alinhados com os

obtidos num estudo prospetivo anterior realizado em Portugal (130). A distribuição destas espécies crípticas é também consistente com o que foi reportado anteriormente em outros países, mesmo com localizações geográficas distintas (135, 139, 378, 379). As espécies crípticas do complexo *C. parapsilosis* são, de facto, dentro das espécies raras, as que têm mais descrições na literatura e juntas representam uma prevalência inferior a 10%, dentro do complexo (134). Acresce referir que num estudo sobre candidemia realizado no Brasil, *C. orthopsilosis* representou 18,9% dos isolados e foi considerada relevante em termos epidemiológicos (378, 380). Por outro lado, as espécies crípticas de *C. parapsilosis* possuem menor virulência *in vitro*, particularmente, *C. metapsilosis* que é descrita como a espécie menos virulenta dentro do complexo (134, 379).

Dos 36 isolados identificados como *C. glabrata* por MALDI-TOF MS, apenas 30 foram analisados por PCR-multiplex e todas as estirpes foram identificadas como *C. glabrata stricto sensu*. Estes resultados estão em concordância com outros estudos que investigaram a presença de espécies crípticas do complexo *glabrata* e não foram capazes de provar a sua presença (381, 382). No entanto, outros autores descreveram a presença de *C. nivariensis* e/ou *C. bracarensis*, em coleções de isolados provenientes de várias amostras biológicas, incluindo casos de candidemia, mas com prevalências muito baixas (120, 131, 383, 384). *C. nivariensis* é descrito como um patógeno oportunista emergente que pode causar infeções invasivas e cuja verdadeira prevalência ainda não é clara, mas parece estar subestimada (104). Estes dados sugerem que embora estas espécies sejam raras, poderão ser clinicamente relevantes, sendo sugerida a sua correta identificação.

C. tropicalis tem origem no trato gastrointestinal o que poderá explicar apenas 4,2% dos isolados de *Candida*. *C. lusitaniae* foi recuperada na coorte (1,1%), associada significativamente à UCI cirúrgica do HFF ($p=0,012$), espelhando o padrão já descrito em Portugal (2,6%) (353).

Neste estudo apenas foram identificadas espécies crípticas do complexo de *C. parapsilosis*, resultados em linha com um estudo prospetivo anterior realizado em Portugal em que também não foram identificados isolados do complexo *albicans* ou *glabrata* (130). É de notar que os resultados dos estudos de comparação para as diferentes espécies não-*albicans* são provavelmente prejudicados pela precisão variável dos diferentes métodos laboratoriais utilizados para a identificação ao nível da espécie.

No entanto, na rotina clínico laboratorial é discutível a identificação das espécies crípticas ou apenas o complexo (259). Este estudo demonstrou que as espécies crípticas ainda são uma minoria em relação ao número total de isolados e a discriminação destas deve ter em conta a virulência, epidemiologia e sensibilidade antifúngica dos complexos. Com estes resultados perspectiva-se que o diagnóstico como “complexo X” junto a um teste de sensibilidade antifúngica possa ser suficiente para orientar a terapêutica antifúngica. Evidentemente que estas decisões devem ser tomadas de acordo com a realidade de cada região, acesso a ferramentas moleculares e sustentadas por estudos que descrevam a distribuição das espécies.

Sendo que a higiene e os cuidados com a pele dos doentes internados em UCI fazem parte dos cuidados básicos, torna-se relevante referir que o aumento das infeções nosocomiais devidas a microrganismos multirresistentes levou à avaliação do papel da utilização de antissépticos, principalmente a solução de GCH, como estratégia para reduzir o número dessas infeções (385). Uma vez que uma colonização cutânea elevada representa um risco significativo para a transmissão hospitalar e para o desenvolvimento de infeções invasivas, tem havido um grande interesse em explorar métodos de descolonização. O banho dos doentes com uma solução de GCH a 2% e a 4% (v/v) é uma forma comum para a limpeza da pele dos doentes em muitos contextos clínicos, incluindo as unidades de cuidados intensivos. Estudos *in vitro* mostram que os isolados fúngicos leveduriformes são inibidos pela GCH com concentrações inferiores a 0,02% (v/v), incluindo *C. auris* (385, 386). No entanto, os protocolos de controlo de infeção seguidos pelas diferentes UCI em avaliação não alteraram de forma estatisticamente significativa a intensidade de colonização ao longo do tempo de internamento na UCI. As razões para este facto parecem ser multifactoriais, nomeadamente o facto de os banhos de rotina não distribuírem adequadamente a GCH por todos os locais colonizados, sugerindo uma eficácia reduzida na pele em comparação com as condições *in vitro*. Por conseguinte é possível prever que os antissépticos utilizados não influenciam o grau de colonização fúngica, contrariamente ao que está referido na literatura sobre a sua influência na colonização da pele por bactérias patogénicas Gram negativo e Gram positivo multirresistentes.

3. Pesquisa de *Candida auris* no micobioma da pele de doentes em Unidades de Cuidados Intensivos

3.1 Introdução

C. auris, é uma levedura emergente e ao contrário de outras espécies de *Candida*, tem sido responsável por vários surtos epidémicos de distribuição global, com índices de letalidade elevados (180, 387). Num período de apenas sete anos, esta levedura emergiu de forma alarmante em vários países, causando um largo espectro de infeções invasivas associadas aos cuidados de saúde (155, 290). Contudo, a prevalência real de *C. auris* a nível global ainda não é completamente conhecida, devido às dificuldades na identificação da espécie, com os métodos laboratoriais usuais (388).

Por diversos motivos, esta espécie emergente alterou as perceções básicas em torno da candidose. Contrariamente à maioria das espécies de *Candida*, que colonizam o trato gastrointestinal, *C. auris* coloniza a pele (389). A transmissão de *C. auris* entre indivíduos é largamente facilitada pela sua capacidade de persistir em formas viáveis no ambiente durante longos períodos de tempo (199). *C. auris* é uma levedura funcionalmente bem adaptada ao ambiente nosocomial, resiste aos desinfetantes comuns, persiste nos equipamentos médicos e nas superfícies secas em ambiente hospitalar por até quatro semanas (219). Por conseguinte, a promoção da transmissão ocorre em ambientes de cuidados médicos, como por exemplo nos que prestam cuidados a longo prazo a doentes graves, principalmente se as medidas de prevenção e controlo de infeção forem inadequadas (226, 386). Por sua vez, a resistência antifúngica é a norma para *C. auris* e não a exceção (390). Uma percentagem esmagadora dos isolados, até 99%, é frequentemente resistente a múltiplos fármacos (resistência antifúngica intrínseca ou rapidamente induzível) e foram identificados isolados resistentes a azóis, equinocandinas e anfotericina B, limitando bastante as opções de tratamento (391).

Face ao exposto, torna-se evidente que *C. auris* combina todos os elementos essenciais característicos de um microrganismo patogénico para representar uma ameaça em saúde pública, nomeadamente: o potencial de propagação por transmissão horizontal e de desencadear surtos; a capacidade de causar infeções graves e o perfil de multirresistência e consequentes limitações para um tratamento adequado (392).

Por estas razões, a Organização Mundial de Saúde (OMS) em novembro de 2022 no seu relatório sobre os agentes fúngicos considerados como ameaça à saúde pública, considerou que *C. auris* requer uma ação urgente e agressiva (160). Na presença de um

doente colonizado e/ou infetado por *C. auris*, devem ser preconizadas várias medidas preventivas. Entre estas, incluem-se os estudos de prevalência para identificar doentes colonizados em unidades hospitalares onde o doente índice esteve presente (199) e a revisão dos registos dos doentes para identificar exposições anteriores nos serviços de saúde (182). Além disso, é importante implementar programas de otimização do uso de antibióticos e antifúngicos em todas as unidades de saúde com casos de *C. auris* (199). Outra medida essencial é a triagem de doentes provenientes de áreas com incidência elevada de infeção/colonização por *C. auris* no momento da admissão hospitalar. Adicionalmente, ao transferir doentes para outras unidades de saúde, deve ser notificado o estado de colonização/infeção por *C. auris* (341, 393).

Por conseguinte, a deteção de colonização e a sua diferenciação de infeção invasiva são vitais para o controlo efetivo da infeção (184). É fundamental aprofundar a compreensão sobre o impacto de diversos tratamentos e métodos de descolonização nos portadores, além de verificar se a colonização por *C. auris* persiste ao longo do tempo. Igualmente, a amostragem regular do ambiente de cuidados de saúde para detetar uma fonte de contaminação pode completar a investigação. O reforço das medidas de higiene padrão continua a ser também uma característica fundamental para limitar a expansão dos surtos, sendo que o impacto dos antissépticos na viabilidade de *C. auris* continua a requerer avaliação (180).

Assim, a triagem de doentes na admissão às UCI, a vigilância ativa para identificar os portadores e a notificação imediata da equipa de controlo de infeção são consideradas pelo *European Center of Diseases Control* (ECDC) medidas importantes a instituir nas unidades hospitalares. Contudo as evidências e experiência no rastreio de *C. auris* são limitadas e referem-se quase exclusivamente a estudos paralelos aos surtos nosocomiais (230). Face a esta lacuna, é necessário estabelecer protocolos de vigilância ativa, com a identificação precoce de portadores, para controlar este fungo antes que ele se adapte às unidades de saúde, como já se verifica com outros microrganismos patogénicos.

Assim, neste capítulo serão abordadas diferentes metodologias por forma a responder à seguinte questão de investigação: há isolados (colonização/infeção) de *C. auris* na amostra populacional em estudo?

3.2 Objetivos

Objetivo geral

Desenvolver um protocolo clínico laboratorial em unidades de cuidados intensivos de hospitais terciários da área metropolitana de Lisboa, Portugal para o despiste e vigilância de *C. auris*.

Objetivos específicos

- Criar um algoritmo de diagnóstico microbiológico para rastreio de *C. auris* através de metodologias microbiológicas baseadas em cultura e metodologias moleculares;
- Desenvolver um meio de cultura seletivo para *C. auris*;
- Determinar a presença/prevalência de *C. auris* numa coorte de doentes em UCI.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Amostra

O rastreio de *C. auris* constituiu parte integrante do estudo prospetivo, previamente descrito no Capítulo 2. A amostra biológica utilizada consistiu numa zaragatoa bilateral combinada das regiões intertriginosas axilar e inguinal colhida na admissão (D1), 5º (D5) e 8º dias (D8) de internamento na UCI. Na eventualidade de uma zaragatoa positiva, o doente seria classificado como um caso confirmado de colonização/rastreio. A equipa médica era notificada imediatamente dos resultados laboratoriais positivos por telefone, para facilitar a rápida implementação de medidas de controlo.

3.3.2 Processamento da amostra

Para detetar *C. auris* a partir dos exsudados das regiões intertriginosas axilar e inguinal, as amostras foram transportadas à temperatura ambiente e submetidas a agitação mecânica forte. O meio líquido onde estava inserida a zaragatoa correspondeu à amostra utilizada em paralelo nas diferentes metodologias microbiológicas de rastreio (Fig.3.1).

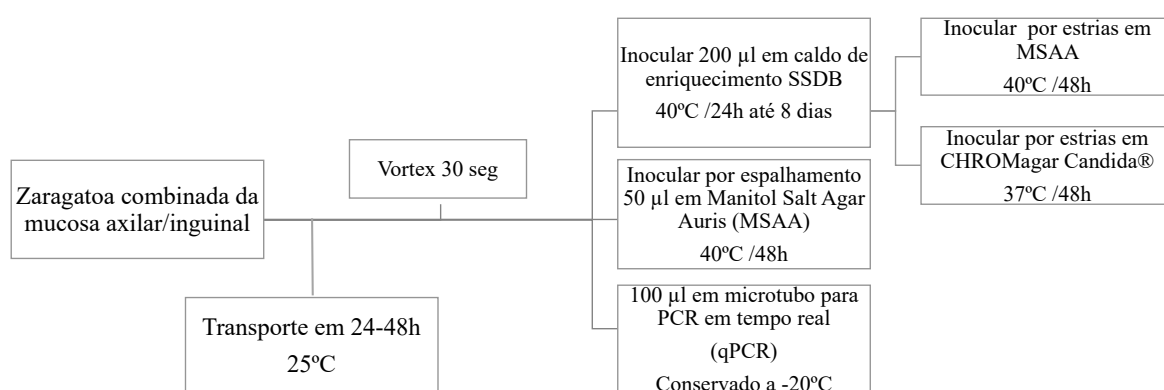


Figura 3.1. Fluxograma utilizado no rastreio de *Candida auris*.

3.3.3 Rastreio de *C. auris* baseado em métodos culturais com identificação fenotípica e molecular

A análise microbiológica foi efetuada por inoculação de alíquotas de 200 µL no Caldo de Sabouraud Dulcitol Salgado (*Salt Sabouraud Dulcitol Broth-SSDB*) contendo dulcitol, antibacterianos e 10% (p/v) de cloreto de sódio (NaCl), e incubadas por 24h-8 dias a 40°C com agitação a 250 rpm e observadas diariamente para deteção de turvação. Neste estudo, o caldo de enriquecimento foi preparado com base na descrição publicada no CDC e cuja fórmula se encontra em anexo (Anexo 4, 9.2.1). Todos os tubos de SSDB após o período de incubação, mesmo os caldos para os quais não foi observada turvação, foram inoculados por estrias em meio MSAA e em meio CHROMagar Candida®, para a eventualidade de crescimento após passagem por caldo de enriquecimento (Fig. 3.1).

Em paralelo, uma alíquota da amostra em meio de Amies (50 µL) foi inoculada por espalhamento diretamente num meio seletivo para *C. auris* - Manitol Salt Agar Auris (MSAA) desenvolvido neste estudo (Fig. 3.2). O meio MSAA é composto por Sabouraud Dextrose Agar (SDA) suplementado com gentamicina e cloranfenicol a uma concentração final de 50 mg/L, NaCl 10% (p/v), manitol 2% (p/v) e solução indicadora de vermelho de fenol, ajustada para pH 5,9 (Anexo 4, 9.2.1).

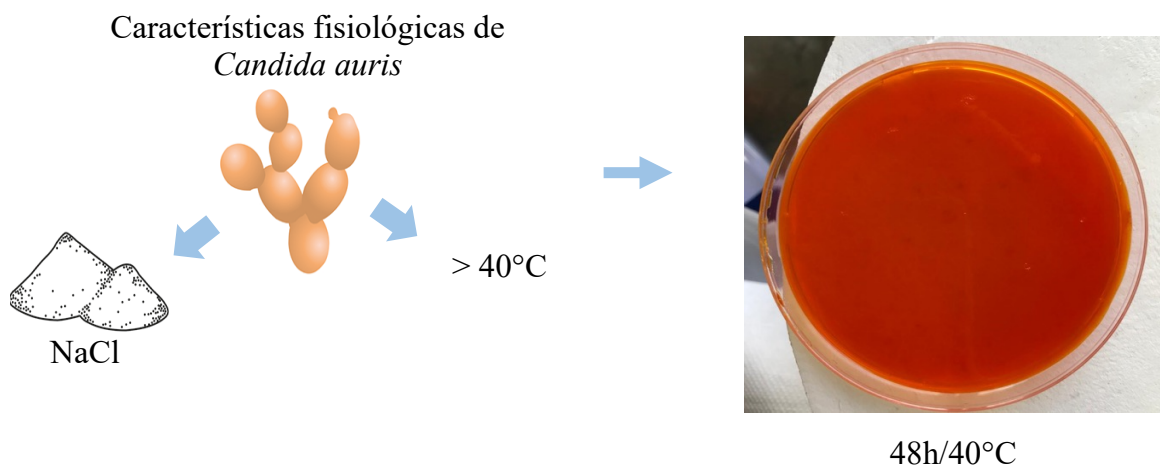


Figura 3.2. Conceção do meio de cultura seletivo, *Manitol Salt Agar Auris* (MSAA) com base nas características fisiológicas de *C. auris*: elevada tolerância ao NaCl e à temperatura.

As placas inoculadas foram incubadas a 40°C num intervalo de tempo mínimo de 48h e máximo de 72h. As culturas foram examinadas visualmente para a deteção de crescimento em intervalos de 24h. Um resultado positivo foi definido como a presença de crescimento visível após 24-72h de incubação. Este meio para além de seletivo é diferencial uma vez que permite distinguir os isolados de *C. auris* que utilizam manitol (colónias amarelas), daquelas que não assimilam este composto em 72h (colónias vermelhas). Pequenas colónias amarelas lisas indicam a presença de *C. auris* do *clade* I, III e IV e colónias vermelhas sugerem a presença de *C. auris clade* II.

3.3.3.1 Estirpes e isolados utilizados como controlo microbiológico

Um painel de estirpes representativas de *C. auris* dos quatro principais *clades* foi obtido da coleção Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ; Braunschweig, Alemanha): as estirpes DSMZ 105987 – ramo da Ásia Sul (I); DSMZ 105986 - ramo da Ásia Oriental (II); DSMZ 105988 – ramo da África do Sul (III); e DSMZ 105990 - ramo da América do Sul (IV) foram utilizadas como controlo positivo. Estirpes de referência de outras espécies de leveduras foram igualmente utilizadas neste trabalho: *Candida albicans* ATCC 60193; *Candida tropicalis* ATCC 1369; *Candida glabrata* ATCC 15126; *Candida parapsilosis* ATCC 22019; *Candida krusei* ATCC 6258; *Candida haemulonii* DSMZ 70624; *Candida duobushaemulonii* CBS 7798; *Trichosporon mucoides* ATCC 204094 e isolados clínicos de *Saccharomyces cerevisiae* e *C. lusitaniae*.

3.3.3.2 Validação do meio MSAA

Para testar a sensibilidade e especificidade do meio de cultura desenvolvido, o procedimento experimental efetuado com as amostras de vigilância foi replicado com os isolados de referência. A sensibilidade do meio para detetar *C. auris* em baixa concentração foi avaliada utilizando diluições em série de suspensões de levedura. Para o efeito, foram preparadas suspensões de levedura com uma turvação correspondente a $1-5 \times 10^6$ células por mL (padrão 0,5 McFarland) para todas as estirpes de referência, e séries de diluições quádruplas (10^{-1} a 10^{-5}) das suspensões de 0,5 McFarland (DO530nm: 0.020; 0,1 McFarland) foram inoculadas em grelha no meio MSAA, em triplicado. As

placas foram incubadas durante 48h a 40°C, e o aparecimento de colónias foi registado após 24h e 48h. Como controlo positivo da viabilidade do organismo, as suspensões foram também colocadas em paralelo em placas SDA, que foram incubadas durante 48h a 30°C (uma vez que algumas das espécies de leveduras incluídas no ensaio crescem mal acima de 35°C).

A sensibilidade $[\text{verdadeiros positivos} \times 100 / (\text{verdadeiros positivos} + \text{falsos negativos})]$ e a especificidade $[\text{verdadeiros negativos} \times 100 / (\text{verdadeiros negativos} + \text{falsos positivos})]$ do meio MSAA para identificar *C. auris* foram determinadas com base nos resultados obtidos para todos os isolados clínicos e de referência.

3.3.3.3 Identificação molecular dos isolados

Quaisquer isolados recuperados das zaragatoas na sequência do algoritmo micológico utilizado nesta investigação foram submetidos ao ensaio de PCR específico para *C. auris*. Os isolados foram igualmente processados por espectrometria de massa de dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF) usando o procedimento padrão de extração de etanol-ácido fórmico, conforme referido previamente no Capítulo 2 (Fig. 3.3).

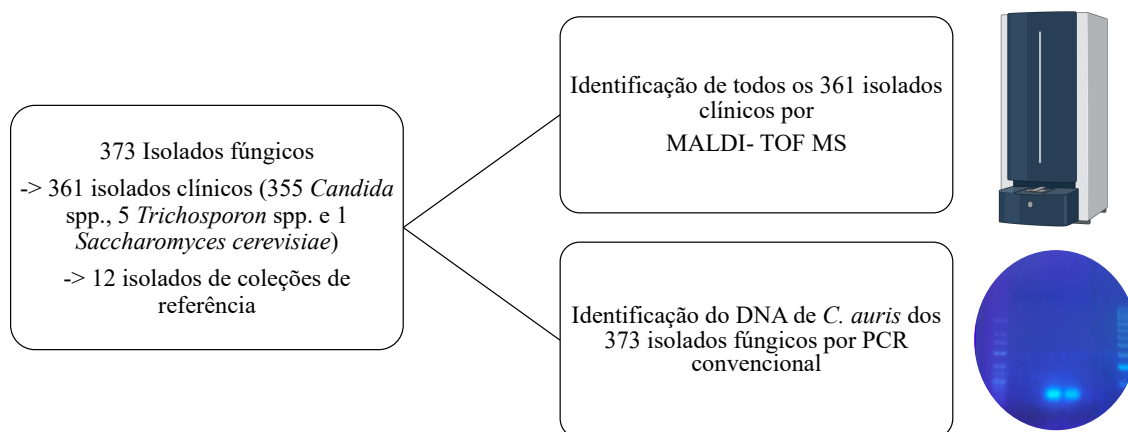


Figura 3.3. Algoritmo de identificação molecular de *C. auris* a partir de isolados fúngicos.

Neste estudo, foram utilizados um total de 373 isolados fúngicos (*C. albicans* (n=186), complexo *C. parapsilosis* (n=113) [*C. parapsilosis stricto sensu* (n=110), *C. orthopsilosis* (n=2), *C. metapsilosis* (n=1)], *C. glabrata* (n=37), *C. tropicalis* (n=16), *Trichosporon* spp. (n=6), *C. auris* (n=4), *C. lusitaniae* (n=4), *C. guilliermondii* (n=3), *C. haemulonii* (n=1),

C. duobushaemulonii (n=1), *C. krusei* (n=1) e *Saccharomyces cerevisiae* (n=2). Destes, 12 isolados correspondem a estirpes de coleções de referência. Os restantes 361 isolados foram obtidos dos exsudados combinados das regiões intertriginosas axilar e inguinal e conservados na coleção do laboratório de microbiologia da Egas Moniz School of Health & Science. Note-se que um dos seis isolados clínicos de *Trichosporon* spp. não foi incluído no ensaio de PCR específico para *C. auris* (Fig. 2.12). Os isolados foram inoculados em placas de agar de extrato de levedura-peptona-dextrose (YPD) (a 25°C para os isolados de *C. haemulonii* e *C. duobushaemulonii* e a 37°C para todos os outros isolados) antes de serem testados.

Para os isolados obtidos das amostras colhidas no HFF (2020), a extração do DNA fúngico, previamente descrita por Kordalewska e colaboradores, foi efetuada através da ação enzimática e da temperatura (Anexo 6, 9.2.3.1). Numa segunda fase do estudo, com os isolados obtidos das amostras colhidas no HBA, o DNA total foi extraído dos isolados utilizando o NZYMicrobial gDNA Isolation Kit® (Nzytech, Lisboa, Portugal), de acordo com as instruções do fabricante (Anexo 6, 9.2.3.2). Em paralelo, foi igualmente utilizado um tampão de extração, Auctus Z- Buffer® (*Research Use Only*-RUO) gentilmente fornecido pela empresa Infusion Tech com um protocolo de extração simplificado à temperatura de 25°C (Anexo 6, 9.2.3.3). Os *primers* utilizados para a amplificação do DNA de *C. auris* têm como alvo as sequências específicas nas zonas de espaço de transcrição interna, ITS-1 e ITS-2 do DNA ribossómico e foram desenvolvidos por Kordalewska e colaboradores (292). O protocolo experimental de PCR convencional específico para a deteção de *C. auris* adaptado e otimizado está descrito no anexo dos protocolos experimentais (Anexo 8, 9.2.5.1). Um resultado positivo traduz-se na deteção de um produto de PCR com 163pb (292).

3.3.4 Pesquisa de *C. auris* por PCR em tempo real

Para a identificação de *C. auris*, as amostras foram também processadas por PCR em tempo real (qPCR), otimizado a partir do protocolo desenvolvido por Leach e colaboradores (293) (Fig. 3.4). Note-se que as amostras provenientes das UCI do HFF foram primeiro conservadas a -20°C.

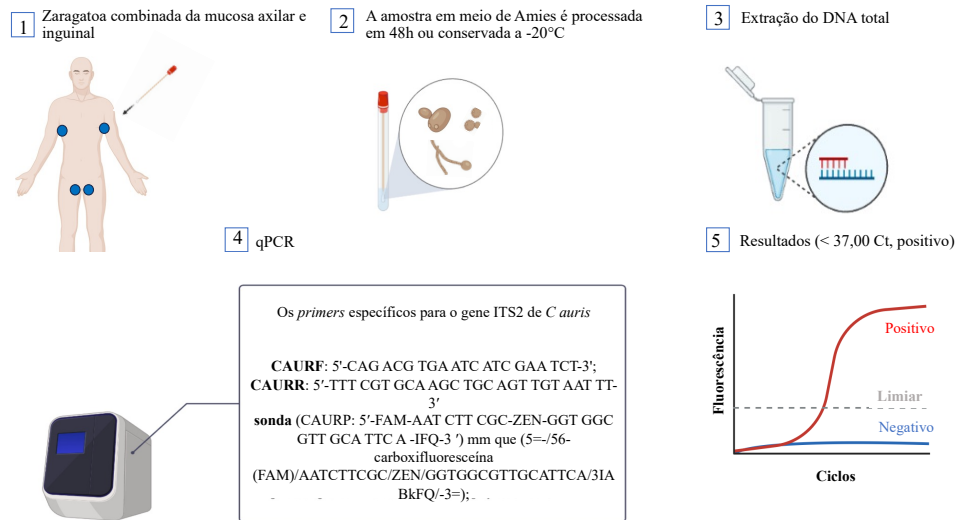


Figura 3.4. Ensaio de PCR em tempo real para identificação de *C. auris*.

No ensaio de qPCR foram preparados controlos positivos com as estirpes de referência de *C. auris*: DSM105986, DSM105987, DSM105988 e DSM105990 conforme o protocolo descrito por Leach e colaboradores (293). As células de *C. auris*, inoculadas em SDA durante 48h a 72h, foram suspensas numa solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 0,01% (p/v) de albumina sérica bovina (BSA). As células foram lavadas duas vezes com PBS-BSA e ressuspensas no mesmo tampão, tendo sido determinada a densidade ótica a 530 nm (DO530 de 0,1). Esta medição corresponde a 10^6 UFC/mL (0,5 McFarland) de *C. auris* na placa SDA. Diluições seriadas de 10 vezes da suspensão de células de *C. auris* preparadas em PBS-BSA foram efetuadas com obtenção de concentrações entre 10^5 e 10 UFC/mL em SDA (Anexo 8, 9.2.5 Fig. 9.4).

3.3.4.1 Extração do DNA genómico

Para maximizar a sensibilidade de deteção da técnica foi efetuada uma lavagem com uma solução tampão de inibição do meio Amies, meio de transporte onde foram colhidas as amostras (294). Por conseguinte, 100 µL da amostra foram centrifugados a 15 000 rpm durante 10 min. O sedimento obtido foi lavado duas vezes com solução de albumina sérica bovina (PBS-BSA) e ressuspendido em 100 µL de PBS-BSA a 2% (v/v). Em seguida, as amostras neutralizadas foram processadas para extração de DNA. Foram utilizados três

protocolos de extração do DNA fúngico no decorrer do estudo até se chegar à otimização para prosseguir para a etapa de amplificação (Anexo 6, 9.2.3).

O primeiro protocolo de extração foi adaptado da técnica descrita por Sexton e colaboradores e foi utilizado nas amostras colhidas entre janeiro e março de 2020 (394). O procedimento começou com a incubação de 100 µL de extrato com 100 µL de tampão de extração (bicarbonato de sódio 60 mM [NaHCO₃], cloreto de potássio 250 mM [KCl] e Tris 50 mM, pH 9,5) a 95°C. Seguiu-se o tratamento com proteinase K (50 mg/mL), em que a 100 µL de lisado foi adicionado 25 µL de proteinase K e misturado suavemente com um agitador vortex (1.000 rpm/min) durante 10 seg. A mistura foi incubada a 56°C durante 1 a 3 horas no banho-maria com homogeneização intermitente a cada 15 minutos. Após a incubação, o isolamento e purificação do DNA foi efetuado com recurso ao kit NZY Tissue gDNA Isolation® (Nzytech, Portugal) de acordo com as instruções do fabricante (Anexo 6, 9.2.3.2).

Face ao protocolo experimental descrito ser extramente moroso, com as amostras provenientes da UCI do HBA utilizou-se um tampão de lise comercializado- Fungal Lysis Solution® (MOL9090, DiaSorin Molecular, Europa). Em resumo, os parâmetros de extração das amostras: o tempo de aquecimento da lise, a temperatura, e o volume foram definidos de acordo com as predefinições do fabricante (Anexo 6, 9.2.3.5 Fig. 9.2). Este reagente foi utilizado em 120 amostras.

A quantidade de DNA obtida com este método revelou ser baixa após avaliação espectrofotométrica através do equipamento Nano Drop ND-1000® (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA), o que associado a um custo extremamente elevado, nas restantes amostras foi escolhido um novo protocolo de extração com recurso a lise mecânica. Assim, a extração de DNA genómico (gDNA) foi efetuada utilizando o kit NZY Soil gDNA Isolation® (Nzytech, Lisboa, Portugal) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram mecanicamente quebradas com esferas de cerâmica. As proteínas e outros inibidores de PCR em solução são precipitados, seguido de centrifugação com as esferas de cerâmica. Quaisquer inibidores de PCR são eficientemente removidos nos passos de lavagem (Anexo 6, 9.2.3.4). Como controlo de extração positivo foi utilizada uma suspensão de 10³ UFC de *C. auris* (Anexo 8, 9.2.5). O controlo de extração negativo correspondeu ao meio de transporte Amies.

3.3.4.2 Amplificação

Este ensaio de PCR em tempo real tem como alvo a zona ITS2 do DNA ribossómico e utiliza sondas TaqMan (Anexo 8, 9.2.4 Tabela 9.4).

Para as condições ótimas de qPCR, um volume de reação de 20 µL contém 5 vezes PerfeCTa® Multiplex qPCR ToughMix® (Quanta Biosciences), uma concentração de 10 µM de cada *primer* de *C. auris* (V2424 e V2426), uma concentração de 2,5 µM da sonda de *C. auris* (V2425P) e 2 µL de DNA extraído de *C. auris* ou das amostras de vigilância (Anexo 8, 9.2.5 Tabela 9.5). Cada reação de PCR incluiu também 2 µL de controlos de extração positiva (*C. auris* DSM105986; 10³ UFC/mL) e de amplificação positiva (*C. auris* DSM105990; 10³ UFC/mL), bem como 2 µL de controlos de extração negativa (apenas reagentes) e de amplificação negativa (água autoclavada sem nuclease).

Os parâmetros de PCR foram definidos de acordo com as recomendações do fabricante, com o canal de deteção 585/630 definido para *C. auris*. O protocolo de amplificação no Qiagen Rotor-Gene Q® está descrito na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Condições utilizadas no protocolo de PCR em tempo real com os *primers* para o gene alvo ITS2. Adaptado de (293).

Número de ciclos	Etapas de amplificação	Temperatura (°C)	Tempo
1	Desnaturação inicial	95	5 min.
45	Desnaturação	95	10 seg.
	Ligação/Elongação	60	15 seg.

Com base na análise da curva ROC, um valor de limiar de ciclo (*Cycles Threshold-CT*) menor ou igual a 37 foi considerado positivo e um CT superior a 37 foi considerado negativo. Para evitar qualquer contaminação cruzada, foi seguido um fluxo de trabalho unidirecional, mantendo separadas as áreas de preparação de reagentes, de preparação de amostras e de amplificação/deteção. No processamento das amostras provenientes das UCI do HFF este fluxo foi desfasado temporalmente.

Na eventualidade de ser obtido um resultado positivo de qPCR, a amostra voltaria a ser processada pelos métodos fenotípicos e moleculares (Fig. 3.1 e 3.3) e a sua identificação confirmada por sequenciação da zona ITS2 do DNA ribossómico.

3.4 Resultados

De janeiro de 2020 a dezembro de 2022, houve um total de 988 amostras colhidas em D1, D5 e D8 nas três UCI envolvidas. Em todas as amostras foi aplicado o protocolo proposto para o rastreio de *C. auris*, não tendo sido obtido nenhum resultado positivo.

3.4.1 Detecção de isolados presuntivos de *C. auris*

O caldo de enriquecimento (caldo de dulcitol) e o meio seletivo (MSAA) para o isolamento de *C. auris*, apresentaram um crescimento em 51 e 21 amostras do total de 988, respetivamente, durante um período de incubação de 48 horas a 8 dias (Tabela 3.2). Do mesmo modo foi observado turvação visível para as zaragoas de controlo positivo (*C. auris*).

Tabela 3.2. Resultados obtidos no rastreio de *C. auris* com os diferentes meios de cultura.

Identificação Definitiva ¹	Nº de isolados	Isolados de referência	Isolados clínicos	Resultados positivos	
				SSDB	MSAA
<i>Candida albicans</i>	186	1	185	5	0
<i>Candida parapsilosis</i>	110	1	109	32	15
<i>Candida glabrata</i> ss	37	1	36	8	1
<i>Candida tropicalis</i>	16	1	15	2	2
<i>Candida lusitaniae</i>	4	0	4	2	2
<i>Candida guilliermondii</i>	3	0	3	1	0
<i>Candida krusei</i>	1	1	0	0	0
<i>Candida orthopsilosis</i>	2	0	2	1	1
<i>Candida metapsilosis</i>	1	0	1	0	0
<i>Candida haemulonii</i>	1	1	0	0	0
<i>Candida duobushaemulonii</i>	1	1	0	0	0
<i>Candida auris</i> (Clade I)	1	1	0	1	1
<i>Candida auris</i> (Clade II)	1	1	0	1	1
<i>Candida auris</i> (Clade III)	1	1	0	1	1
<i>Candida auris</i> (Clade IV)	1	1	0	1	1
<i>Trichosporon</i> spp.	6	1	5	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	0	1	0	0
Total	373	12	361	55 ²	25 ²

¹Identificação definitiva por MALDI-TOF e métodos baseados no DNA. ²O total inclui os quatro isolados de referência.

3.4.1.1 Avaliação do meio MSAA

Relativamente à avaliação do meio MSAA como meio de isolamento primário, a observação das placas MSAA após 48 horas de incubação mostrou que 21 das 988 amostras apresentaram culturas positivas. Das 21 culturas positivas, 19 replicaram o crescimento observado no caldo dulcitol. Para duas amostras, o caldo dulcitol revelou-se negativo e apenas se observou crescimento no meio MSAA. Os isolados foram posteriormente identificados como *C. parapsilosis* (Tabela 3.2).

É de referir que o crescimento observado para as 21 amostras em MSAA foi reduzido, mesmo após repicagem, não ocupando um quadrante da placa (Fig. 3.5b). Estas observações contrastaram com a observação de culturas confluentes de cor amarela para as amostras controlo de *C. auris* (Fig. 3.5a e 3.5c).

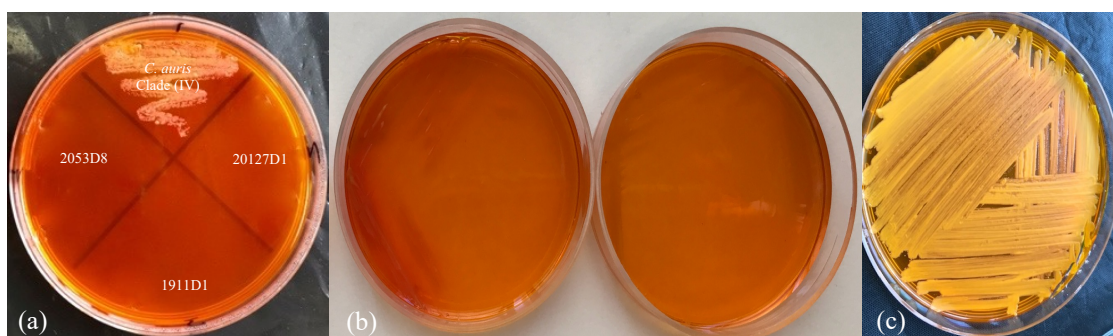


Figura 3.5. Observação do crescimento de amostras e controlos em meio MSAA. (a) Placa de MSAA inoculada com o controlo positivo de zaragatoa de *C. auris* (Clade IV) e três amostras de zaragatoas combinadas das regiões intertriginosas axilar e inguinal. Verificou-se ausência de crescimento nas amostras clínicas; (b) Crescimento observado em duas amostras em MSAA (32D5 e 470D1 provenientes do HBA) e (c) Zaragatoa de controlo de *C. auris* (Clade III). Todas as placas de MSAA foram incubadas durante 48 horas a 40°C.

As colónias obtidas a partir destes meios foram identificadas por MALDI-TOF como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*. A identificação definitiva dos isolados de *C. glabrata* e do complexo *C. parapsilosis* obtida por PCR multiplex confirmou a identificação prévia por MALDI-TOF.

A identificação dos 51 e 21 isolados obtidos respetivamente a partir do caldo de dulcitol e MSAA, foi idêntica à obtida a partir dos meios de isolamento primário utilizados no protocolo de rastreio de colonização fúngica. Porém, 16 amostras foram

consideradas positivas só após passagem pelo caldo de enriquecimento. Nos isolados obtidos destas amostras que apenas positivaram após passagem no caldo de enriquecimento, salienta-se a obtenção de dois isolados de *C. lusitaniae*, cinco isolados de *C. glabrata* e nove isolados de *C. parapsilosis*. Destas 16 amostras, após passagem do caldo de dulcitol para CHROMagar Candida e MSAA, apenas se observou crescimento no MSAA para duas amostras, cujos isolados foram identificados como *C. lusitaniae*.

Os resultados do exame cultural e molecular das zaragatoas combinadas das regiões intertriginosas axilar e inguinal estão resumidos na Tabela 3.2. Nenhuma amostra com crescimento em MSAA e/ou caldo de dulcitol foi confirmada como positiva para *C. auris*. A partir destes resultados, a especificidade do caldo de enriquecimento e do MSAA para identificar presuntivamente *C. auris* foi de 88,5% e 94,8%, respetivamente.

Em relação à avaliação do meio MSAA para o isolamento seletivo e diferencial com estirpes controlo de *C. auris*, após 48h de incubação a 40°C observou-se o aparecimento de colónias pequenas e amarelas, com exceção do isolado representativo do *clade* II, *C. auris* DSM 105986. O isolado de *C. auris* do *clade* II apresentou um crescimento mais restrito e somente após 72h de incubação as colónias mudaram o indicador de pH para amarelo.

As espécies filogeneticamente relacionadas com *C. auris*: *C. haemulonii* e *C. duobushaemulonii* não cresceram (Fig. 3.6 a, b). Do mesmo modo, para os restantes 10 isolados de estirpes de referência das outras espécies leveduriformes não se registou qualquer crescimento neste meio seletivo a 40°C durante o mesmo período de incubação.

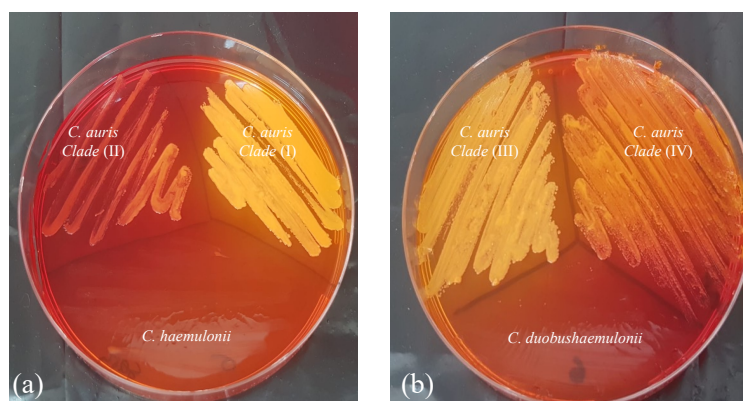


Figura 3.6. Meio MSAA inoculado com estirpes de referência. (a) Placa MSAA inoculada com *C. auris* DSMZ 105986 (*Clade* II) e DSMZ 105987 (*Clade* I), e *C. haemulonii* DSMZ 70624 (3); (b) Placa MSAA inoculada com *C. auris* DSMZ 105988 (*Clade* III) e DSMZ 105990 (*Clade* IV), e *C. duobushaemulonii* CBS 7798 (3). As placas de MSAA foram incubadas durante 48 horas a 40°C.

Relativamente à sensibilidade, a leitura das placas de MSAA inoculadas com diluições em série a partir de suspensões 10^6 UFC/mL (0,5 McFarland) até 10^5 UFC/mL (0,1 McFarland) das várias espécies de *Candida*, *S. cerevisiae* e *T. mucoides* revelou ausência de crescimento para todos os isolados após 24 horas de incubação, incluindo para *C. auris*. No entanto, após 48 a 72 horas de incubação, as estirpes representativas dos *clades* de *C. auris* mostraram evidência de crescimento de colónias amarelas (Fig. 3.7 e 3.8).

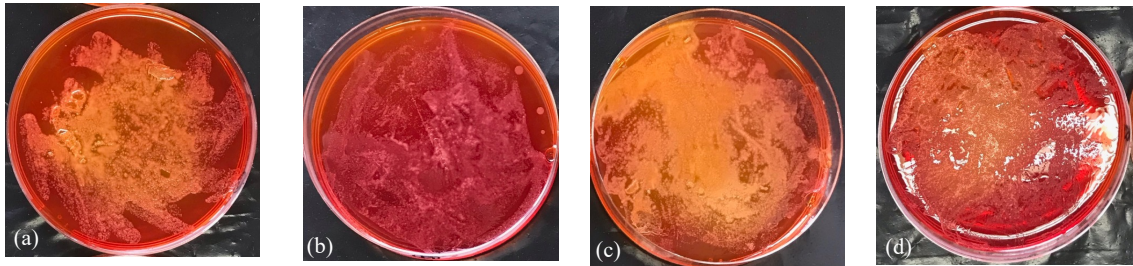


Figura 3.7. Placas de MSAA inoculadas por espalhamento a partir de suspensões com 10^6 UFC/mL das estirpes controlo: (a) *C. auris* DSMZ 105987 (*Clade* I), (b) *C. auris* DSMZ 105986 (*Clade* II) (c) *C. auris* DSMZ 105988 (*Clade* III) e (d) *C. auris* DSMZ 105990 (*Clade* IV).

As observações das placas com a inoculação em grelha mostraram os mesmos resultados mesmo para baixas diluições (suspensão padrão de 0,1 McFarland) (Fig. 3.8, [comparar pontos de inoculação 1-13]).

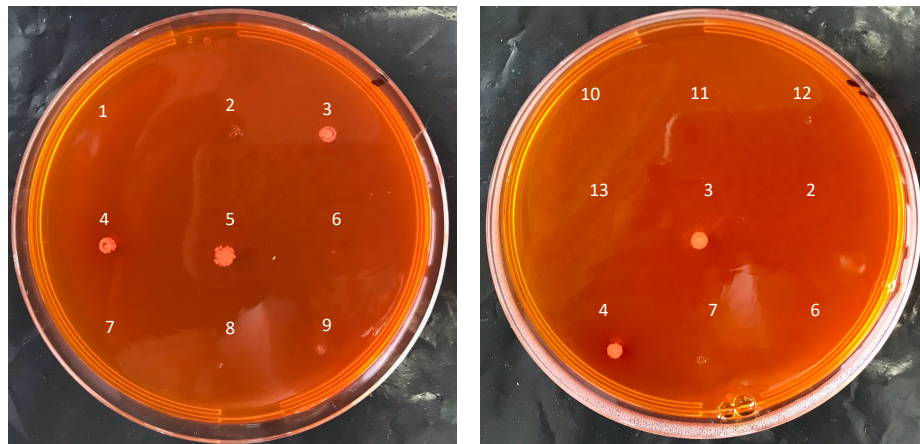


Figura 3.8. Observação do crescimento em meio MSAA (0,1 McFarland) 40°C/48h. As espécies de *Candida* spp. testadas foram: 1 = *C. albicans*; 2 = *C. duobushaemulonii*; 3 = *C. auris* DSMZ 105990 (*Clade* IV); 4 = *C. auris* DSMZ 105987 (*Clade* I); 5 = *C. auris* DSMZ 105988 (*Clade* III); 6 = *C. haemulonii* DSMZ 70624; 7 = *C. glabrata*; 8 = *C. parapsilosis*; 9 = *C. auris* DSMZ 105986 (*Clade* II); 10 = *C. krusei*; 11 = *C. tropicalis*; 12 = *Trichosporon mucoides*; 13 = *Saccharomyces cerevisiae*.

As placas de SDA utilizadas como controlo de viabilidade dos isolados evidenciaram colónias brancas a creme de todas as estirpes de referência, validando os resultados do meio MSAA (Fig. 3.9). A partir destes resultados, a sensibilidade do meio MSAA para detetar presuntivamente *C. auris* foi calculada com um tempo de incubação de 48 horas, com um resultado de 100%.

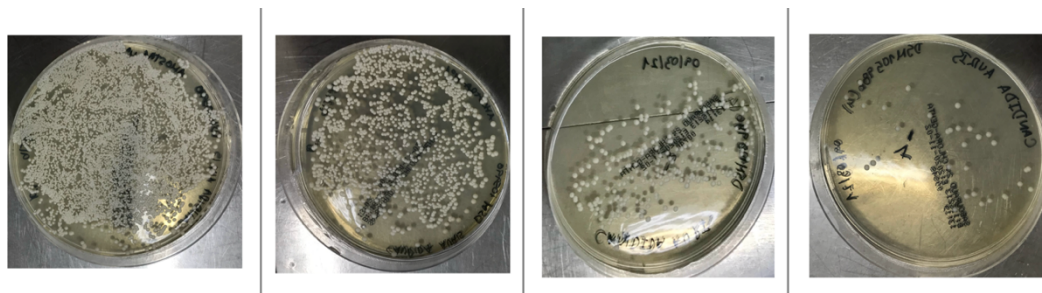


Figura 3.9. Cultura de *C. auris* DSMZ 105988 (*Clade* III) em meio de Sabouraud dextrose agar após diluições seriadas. Observação das UFC por inoculação por espalhamento de 100 μ L de suspensão 10^6 UFC/mL (0,5 McFarland) até 10^3 UFC/mL (sentido da esquerda para a direita).

3.4.2 Identificação de *C. auris* por PCR convencional

A amplificação por PCR do rDNA de *C. auris* resultou na amplificação de um único fragmento de DNA de 163 pb apenas para as quatro amostras de DNA de referência de *C. auris*. Para os restantes isolados (referência e clínicos) não foi detetada qualquer amplificação (Tabela 3.2). O tampão (RUO) utilizado neste ensaio permitiu uma lise eficiente e o isolamento dos ácidos nucleicos num protocolo que poupou tempo, permitindo a observação de amplicões reprodutíveis (Fig. 3.10).

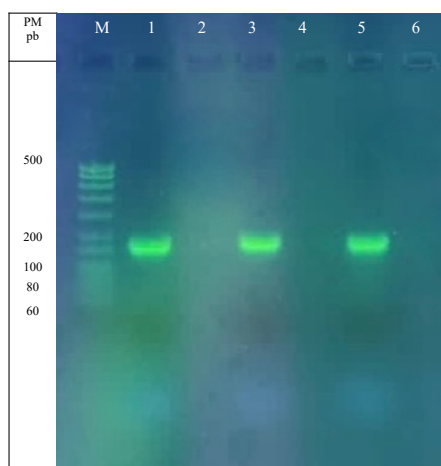


Figura 3.10. Gel de agarose dos produtos de PCR amplificados, para identificação de *C. auris*. Na linha 1 *C. auris* DSMZ 105986 (*Clade* II). Linha 3 *C. auris* DSMZ 105988 (*Clade* III). Linha 5 *C. auris* DSMZ 105990 (*Clade* IV). Linha 2 e 4, isolados de amostras e linha 6, ABDE como controlo negativo. M, marcador de peso molecular, NZYDNA Ladder IV®.

O ensaio de PCR convencional, específico para *C. auris* confirmou a ausência de *C. auris* em 361 isolados clínicos. Estas observações foram consistentes com a identificação obtida por MALDI-TOF-MS. Igualmente dos 12 isolados de coleções de referência, apenas foram detetados amplicões para as estirpes de referência de *C. auris* dos quatro *clades*. Para os isolados das espécies do complexo de *C. haemulonii* que foram testados (*C. haemulonii* ss e *C. duobushaemulonii*), não foi detetado nenhum produto de amplificação.

3.4.3 Pesquisa de *C. auris* de amostras de vigilância por qPCR

Das 988 amostras biológicas testadas por qPCR, nenhuma apresentou um resultado positivo, exceto os controlos positivos. Estes controlos positivos mostraram um valor de Ct médio de 20,8 (Fig.3.11). Além disso, as culturas das amostras negativas para PCR confirmaram a ausência de *C. auris*. Com base nos métodos baseados em cultura como referência, a PCR em tempo real demonstrou 100% de exatidão, sensibilidade e especificidade na deteção de *C. auris*. Estes resultados sublinham a eficácia da metodologia empregada, destacando a sua precisão e confiabilidade no diagnóstico.

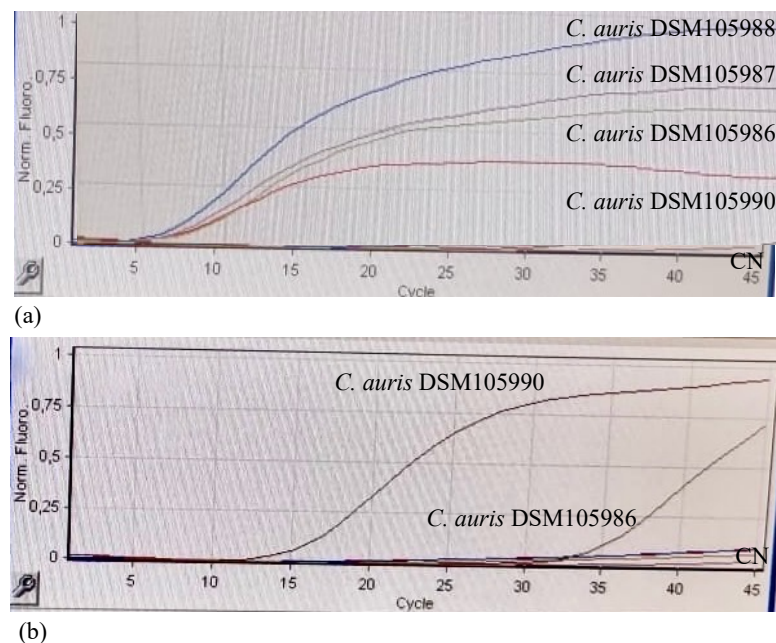


Figura 3.11. Curvas de amplificação dos ensaios de qPCR de *C. auris*. (a) Curvas de amplificação de amostras controle de *C. auris* com concentração de 10^3 UFC/mL e controle de amplificação negativo (CN) (b) Curvas de amplificação de amostras de doentes e controlos positivos e negativos (CN).

3.5 Discussão

Na última década, *C. auris* tornou-se um agente patogénico fúngico de grande preocupação em ambiente nosocomial com perfis de multirresistência, sendo responsável por surtos em UCI associados a uma mortalidade superior a 20% (159, 177, 185, 242, 360). Por conseguinte, torna-se pertinente desenvolver estudos epidemiológicos com métodos laboratoriais adequados para entender melhor o âmbito da colonização/infeção por *C. auris* particularmente em Portugal, onde à data da implementação deste estudo não tinha sido identificado nenhum isolado de *C. auris*.

Os estudos epidemiológicos que visam *C. auris*, têm vindo a ser desenvolvidos com recurso a várias estratégias de triagem, incluindo a colheita de amostras biológicas de vários locais anatómicos, como o exsudado conjunto das regiões intertriginosas axilar e inguinal com ou sem zaragatoa nasal, urina assética ou exsudado de ferida cutânea (155, 185, 220, 374).

Os locais escolhidos nesta investigação foram determinados como locais de eleição para a deteção de colonização por *C. auris* (230). Tanto a mucosa inguinal quanto a axilar constituem os locais mais prováveis de colonização com uma taxa de positividade de 37% e 35%, respetivamente (230). Porém, o estudo de Briano e colaboradores mostrou que a colonização multifocal por *C. auris* é um factor de risco independente para o desenvolvimento de candidemia (37). Atualmente, o Centro de Controlo e Prevenção das Doenças (CDC) dos EUA continua a classificar a colheita bilateral conjunta das duas zonas anatómicas: axila e virilha, como os locais mais comuns e consistentes de colonização. Porém, o Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças (ECDC) afirma que devem ser considerados outros locais para a colheita de amostras, como a mucosa nasofaríngea, retal, os locais de inserção de cateteres venosos, a urina, as fezes, o líquido de drenagem de feridas e o material respiratório.

No que se refere à sensibilidade de testar o doente só uma vez para o rastreio de *C. auris*, os resultados obtidos no estudo de Eyre e colaboradores concluíram que uma única amostra não era representativa o suficiente para detetar a colonização por *C. auris* (230). Por conseguinte no desenho do estudo foram incluídas até três amostras de rastreio efetuadas na admissão, quinto e oitavo dia de internamento na UCI. Igualmente é de referir que da população estudada, apenas foram obtidas 110 amostras ao 8º dia de

permanência na UCI, uma vez que a média de estadia em UCI nestas unidades hospitalares é na sua grande maioria inferior. Comparando com estudos efetuados no meio hospitalar para despiste desta espécie é possível observar que os isolados colonizadores de *C. auris* são obtidos de zaragatoas combinadas das regiões intertriginosas axilar e inguinal de doentes com permanência hospitalar sistematicamente superior a uma semana (37, 395). Tal como Heindel e colaboradores concluíram, são necessários mais estudos para avaliar o número ideal e os locais de amostragem para detetar *C. auris* de forma fiável (396).

A capacidade de identificar com precisão *C. auris* é fundamental para o controlo e prevenção de surtos de *C. auris*. Os métodos baseados no fenótipo para identificar *C. auris* estão frequentemente associados a problemas de identificação incorreta (397). *C. auris* mostra uma forte homologia com outras espécies de *Candida* como *C. lusitaniae*, *C. haemulonii*, *C. pseudohaemulonii*, entre outras, o que leva a taxas de erros elevadas na identificação (296).

Porém, Welsh e colaboradores mostraram que, a uma temperatura de 40°C, as estirpes de *C. auris* são capazes de se multiplicar em caldo de Sabouraud e base de azoto contendo cloreto de sódio a 10% (p/v) suplementado com dextrose, dulcitol ou manitol, enquanto *C. haemulonii*, *C. duobushaemulonii*, *C. albicans* e *C. parapsilosis* não conseguem crescer nestas condições e os isolados de *C. glabrata* crescem apenas em caldo Sabouraud contendo dextrose (205). Estes caldos de enriquecimento mostraram ser um procedimento simples, de baixo custo e eficaz para isolar *C. auris* de comunidades microbianas complexas, como a pele. A abordagem no algoritmo laboratorial com a utilização do meio de cultura MSAA foi otimizada a partir desses caldos, mas supera o tempo de resposta lento das culturas de enriquecimento, o que pode ser um factor limitante significativo.

Neste estudo, os isolados recuperados após incubação no caldo com dulcitol foram posteriormente identificados como *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. lusitaniae*, mas não como *C. auris*. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores que testaram o caldo de dulcitol (287). Ainda assim, é relevante referir que 16 isolados de *Candida* spp. foram obtidos após passagem no caldo e não diretamente da inoculação da zaragatoa da mucosa, aumentando assim a recuperação de isolados de *Candida*.

Em conformidade com descrições anteriores, os nossos resultados evidenciaram colónias cor-de-rosa de *C. auris* no meio CHROMagar. No entanto, *C. auris* não tem uma

única cor distinta em CHROMagar; *C. auris* forma colónias cor-de-rosa, vermelhas, creme e até púrpura em meio cromogénico de *Candida*, bem como uma combinação destas cores na mesma placa, pelo que também é difícil distinguir de várias outras espécies de *Candida* e leveduras, como os membros do complexo *C. haemulonii*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. famata*, *Candida conglobata* e *Candida utilis*, que também formam colónias de cor rosa (290). Comparando os resultados obtidos com o meio MSSA e os meios previamente descritos, verifica-se que existem sempre alguns problemas associados. Por exemplo, a inoculação em CHROMagar *Candida* suplementada com agar de Pal pode ser utilizada para uma melhor diferenciação no complexo *C. haemulonii*. As estirpes de *C. auris* apresentam um crescimento confluyente de colónias lisas de cor branca a creme a 37°C e o complexo *C. haemulonii* apresenta-se com colónias rosa claro às 24 horas (398). No entanto, foram observadas variações entre os diferentes *clades* de *C. auris* com este meio, o que limita a sua aplicabilidade (286). Este meio também tem a limitação de que a identificação preliminar precisa de ser feita por um sistema de identificação automatizado como o VITEK2 para excluir outras espécies de *Candida* não-*albicans* (398).

O meio cromogénico CHROMagar *Candida* Plus® (CHROMagar TM, Paris, França) é também considerado como uma opção valiosa para a deteção e identificação de *C. auris* no contexto de um surto hospitalar, para estudos de colonização, bem como para a identificação de outras leveduras (281, 282). *C. auris* forma colónias distintas de cor creme com um halo azul, obtendo assim uma sensibilidade e especificidade de 100% após 48h de incubação a 37°C. No entanto, espécies filogeneticamente próximas como *C. pseudohaemulonii* desenvolveram uma aparência semelhante à de *C. auris* neste meio e podem ocorrer falsos positivos, uma vez que a identificação é dependente do leitor (283).

Além destes meios, foram descritos outros meios seletivos para o isolamento de *C. auris* (286, 287). Tal como no MSAA, estes meios de cultura dependem das condições de crescimento da levedura: termo resistência e halo-tolerância. Das e colaboradores utilizaram condições limite para conseguir o crescimento seletivo de *C. auris* com base na tolerância ao sal, metal e temperatura (286). Comparativamente, na preparação do meio MSAA foi utilizada a temperatura de incubação de 40°C em vez de 42°C, cloreto de sódio a 10% (p/v) em vez de 12,5% (p/v) e uma conservação estável (4°C) após a preparação do meio, em vez de requerer a preparação recente do meio de cultura devido

à oxidação gradual e precipitação de ferro utilizado no meio desenvolvido por Das e colaboradores (286).

Relativamente ao crescimento dos diferentes *clades* de *C. auris*, os nossos resultados são consistentes com os obtidos por Das e colaboradores. Todas os isolados de *C. auris* que representam os principais *clades* foram capazes de crescer em placas de MSAA, mas o isolado do *clade* II de *C. auris* apresentou um crescimento limitado mesmo após 48 horas de incubação. A causa foi apontada por Das e colaboradores que mostraram padrões de crescimento diferentes para os quartos *clades*. O tempo de duplicação do isolado do *clade* II a 42°C foi significativamente mais elevado do que para os outros três *clades* (286).

O meio de cultura específico de *C. auris* (SCA) descrito por Ibrahim e colaboradores também utilizou manitol como fonte de carbono e cristal violeta como inibidor de *C. tropicalis* (287). Foi demonstrado no seu trabalho que uma limitação do caldo de enriquecimento desenvolvido por Welsh e colaboradores para o isolamento de *C. auris* é o facto de também permitir o crescimento de isolados de *C. tropicalis* (287). Neste estudo, também pode ser observado o crescimento em MSAA de um isolado (1/21) posteriormente identificado como *C. tropicalis*. No entanto, para o SCA não foram mencionados diferentes padrões de crescimento dos diferentes *clades* de *C. auris*. O meio SCA foi validado após 3 dias de incubação, mas com o MSAA o crescimento foi obtido após 48 horas de incubação. É de salientar que o amarelo das colónias de *C. auris* torna a leitura das placas muito simples.

No decorrer do estudo foi observado crescimento em MSAA em 21 das 988 amostras processadas. Os isolados foram igualmente processados para a identificação por MALDI-TOF MS e a identificação fenotípica dos 21 isolados obtidos com o meio MSAA não foi confirmada. Os resultados de identificação obtidos com a tecnologia MALDI-TOF MS reforçaram outros estudos prévios que evidenciam que esta metodologia ao longo da última década, suplantou a maioria dos métodos bioquímicos utilizados nos laboratórios de diagnóstico clínico para a identificação de leveduras e fungos filamentosos de importância clínica (252, 253, 264). Porém, em alguns estudos, muitas vezes devido a bancos de dados incompleto, a identificação correta de *C. auris* não foi alcançada (296). Por conseguinte, a identificação foi confirmada com a técnica de referência aqui utilizada, a PCR específica para *C. auris* que também não confirmou a identificação fenotípica.

Ainda assim, a especificidade (94,8%) e sensibilidade (100%) obtidas com o meio MSAA são sugestivas que este possa ser utilizado para o rastreio de *C. auris*, diretamente de amostras biológicas. O meio MSAA pode ser facilmente preparado, é simples de utilizar, não requer conhecimentos micológicos ou moleculares específicos e constitui uma ferramenta simples e económica para a deteção e identificação presuntiva de *C. auris* no laboratório de microbiologia clínica.

Face ao exposto, refere-se que o algoritmo micológico utilizado baseado na tecnologia MALDI-TOF ou na de PCR específica para triagem de *C. auris* revelou-se sensível e específico, mas requer a obtenção do organismo em cultura, o que pode levar à deteção tardia, de 72h a 14 dias, destacando a necessidade de uma alternativa mais rápida.

Para a deteção rápida de *C. auris* a partir de amostras de vigilância com a obtenção de resultados rápidos (4 horas) após o processamento da amostra, foi selecionado um protocolo de PCR em tempo real (293). Este ensaio mostrou-se sensível, o que se deve sobretudo ao alvo genético da zona ITS2. Mais importante ainda, o ensaio é altamente específico, uma vez que não se observou qualquer reatividade cruzada com as espécies leveduriformes identificadas nas amostras testadas.

A deteção rápida de microrganismos por qPCR depende de métodos eficazes de extração de DNA (399). Como as leveduras têm paredes celulares compostas por quitina, mananos e glicanos, são necessários pré-tratamentos enzimáticos ou mecânicos para a extração ou isolamento dos ácidos nucleicos. Numa primeira fase utilizou-se a proteinase K para romper as células de levedura, seguido de um procedimento de extração do DNA genómico com base em sílica. Apesar dos resultados do qPCR terem sido positivos para amostras controlo, o tempo de incubação com a enzima foi muito longo e, por conseguinte, ao longo do estudo tentou utilizar-se protocolos de extração fiáveis, mas mais rápidos.

Os resultados de Leach e colaboradores apontaram que para a rutura enzimática das células, pode ser necessária a utilização de duas enzimas para obter um resultado ótimo, mais concretamente, o estudo mostrou que a digestão dupla com duas enzimas, liticase e proteinase K, melhorou o rendimento de isolamento do DNA e encurtou o tempo de incubação (293). No entanto, nesta investigação optou-se por utilizar os métodos físicos de lise celular como a rutura mecânica com esferas de vidro que foram igualmente

utilizados com êxito por outros autores na preparação de amostras para a deteção de *Candida* spp. baseada no qPCR (294).

À semelhança do algoritmo de diagnóstico de vigilância de *C. auris* proposto nesta investigação, outros autores têm desenvolvido protocolos com resultados bastante promissores em plataformas semiautomáticas. As amostras utilizadas foram igualmente zaragatoas bilaterais combinadas das regiões intertriginosas axilar e inguinal onde aplicaram um protocolo de qPCR utilizando *primers* visando a região ITS1/ITS2 do gene do DNA ribossómico de *C. auris* (171, 297, 298, 400, 401).

C. auris tem vindo a ser referida nas medidas de saúde pública publicadas pelo ECDC, porém a nível clínico laboratorial ainda não há um alerta relevante. Exemplo deste facto foi um estudo efetuado na Bélgica onde foram incluídos isolados de *C. auris* e *C. haemulonii* num programa de avaliação externa da qualidade. Para além da identificação dos isolados, todos os participantes foram solicitados a indicar se deveriam encaminhar o isolado para um laboratório de referência no contexto clínico apresentado (isto é, isolado obtido a partir de uma hemocultura) (85). Os possíveis motivos que podiam ser assinalados foram motivos epidemiológicos, confirmação da identificação e/ou confirmação dos resultados dos testes de susceptibilidade a antifúngicos. Mais de um terço dos participantes, independentemente da identificação obtida, respondeu que não enviaria o isolado para um centro de referência (54/142, 38,0%) (85). Por conseguinte, os dados internacionais sobre a conscientização do perfil de risco de *C. auris* entre os profissionais de laboratório são escassos. Refere-se que em Portugal, o Laboratório de Referência em Micologia no Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge desenvolveu a partir de 2019 um programa de avaliação externa da qualidade para pesquisa de *C. auris* por forma a garantir que os laboratórios participantes estavam capacitados tecnicamente para identificarem esta espécie de *Candida*.

Os resultados dos inquéritos do ECDC descreveram mais de 1800 casos de *C. auris* notificados por 15 países da UE/EEE de 2013 a 2021 (dados que não incluem os casos do Reino Unido) e o relatório de 2022 evidenciou um caso em Portugal (181-183). No período de 2019 a 2021, cinco países (Dinamarca, França, Alemanha, Grécia e Itália) comunicaram 14 surtos de *C. auris*, mas foram comunicados casos isolados em quase toda a Europa (183, 402).

O presente estudo prospetivo foi o primeiro a investigar a presença de *C. auris* em Portugal. Durante quase dois anos, os resultados mostraram que *C. auris* não é prevalente nos hospitais portugueses. Estes resultados estão em consonância com outros estudos prospetivos, nomeadamente no Reino Unido (403), Egipto (404) e Alemanha (396), que apresentaram resultados negativos em todos os rastreios de colonização por *C. auris* nas UCI.

Os resultados obtidos estão igualmente em linha com os resultados da Europa e da América do Norte que mostram a presença esporádica ou durante surtos nosocomiais da colonização/infeção por *C. auris* nas UCI (173, 405-407). Um estudo retrospectivo multicêntrico recente que incluiu todos os casos de candidemia isolados de seis hospitais terciários do sul da Europa observou que *C. auris* não estava incluída nas espécies de *Candida* responsáveis pelos episódios de candidemia (364). Porém, um cenário completamente diferente é observado na Índia, onde *C. auris* ocupa o primeiro lugar nas espécies de *Candida* isoladas do sangue de doentes em estado crítico e cujo aumento se verificou durante a pandemia de COVID-19 (88, 408).

Embora um estudo recente tenha contestado a utilidade do rastreio de *C. auris* aquando da admissão em UCI (396), é relevante considerar que o mesmo estudo apenas utilizou métodos baseados em cultura, com uma sensibilidade já demonstrada como inferior e que não permite, em tempo útil, tomar as medidas preventivas necessárias caso seja encontrado uma amostra positiva. Num contexto global, as diferentes declarações referem a importância de rastrear os doentes de risco elevado na admissão à UCI, em especial os que receberam cuidados de saúde em hospitais estrangeiros (37, 360, 406). Uma identificação precoce de possíveis casos adquiridos na comunidade é crucial para evitar a colonização por *C. auris* e, indiretamente, o desenvolvimento subsequente de infeções (37, 360, 406).

No rastreio prospetivo de Contreras e colaboradores, os isolados de *C. auris* foram recuperados de doentes em estado grave com condições clínicas complicadas que tinham um historial de cuidados médicos não só em unidades de cuidados intensivos, mas também de unidades de serviços continuados (400). Igualmente o estudo piloto do CDC de rastreio de *C. auris* em várias tipologias de unidades de cuidados de saúde da cidade de Nova Iorque, entre 2017 e 2019, mostrou que os isolados colonizadores foram particularmente obtidos de doentes em unidades de cuidados continuados e residências

seniores, tendo sido dado particular destaque às zaragatoas nasais para além da amostra bilateral das regiões intertriginosas axilar e inguinal (227). Nesta investigação apenas foram rastreados dois locais de amostragem para detetar a presença de *C. auris* e em ambiente de UCI, o que pode ter sido uma limitação.

Como os doentes dos dois hospitais não permaneceram na UCI por períodos prolongados (média de 5 dias), podem não ter sido expostos aos riscos cumulativos que normalmente levam à colonização por *C. auris*. Um tempo de internamento mais curto reduz a probabilidade de encontrar ambientes contaminados, diminui o tempo de exposição a outros indivíduos colonizados e limita o uso de dispositivos invasivos que poderiam servir como pontos de entrada para *C. auris*. A ausência de colonização por *C. auris* nos dois hospitais pode, de facto, dever-se à duração relativamente curta dos internamentos hospitalares dos participantes. A literatura existente indica um risco maior de colonização por *C. auris* após estadias prolongadas em UCI, normalmente em torno ou após 20 dias. Das e colaboradores fizeram uma observação crítica ao destacar que os doentes em ambientes de UCI geralmente adquirem infeções por *C. auris* após um período de 15 a 20 dias de internamento (409).

Face ao exposto, os resultados deste trabalho assim como os dos vários estudos citados no decorrer da discussão, são sugestivos de que devem ser implementados rastreios que contemplem a pesquisa de *C. auris* para além dos microrganismos nosocomiais como *Staphylococcus aureus* metilicina resistente, *Enterococcus* vancomicina resistente ou bactérias Gram negativo produtoras de carbapenemases. Como amostras sugere-se a utilização de zaragatoas nasais/retais para além das axilares/inguinais, assim como para além da UCI, as unidades de cuidados paliativos devem ser consideradas passíveis de serem rastreados para *C. auris* de uma forma mais sistematizada.

4. Colonização fúngica em doentes admitidos em unidades de cuidados intensivos na região metropolitana de Lisboa

4.1 Introdução

A pele, embora atue como uma barreira física contra o ambiente externo, também pode ser uma fonte significativa de infeções endógenas. Qualquer alteração neste órgão, seja natural ou decorrente de procedimentos médicos, pode aumentar substancialmente o risco de infeções (354).

No entanto, a relevância da microbiota fúngica da pele em doentes internados em Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) ainda não foi adequadamente investigada. Estudos prévios têm verificado um aumento significativo da incidência de infeções fúngicas invasivas (IFI), especialmente em doentes internados em UCI (61). Os resultados destes trabalhos sugerem que a prevalência e o impacto das infeções associadas à micobiota nas UCI podem variar de acordo com as práticas específicas de cada unidade, e as características das populações de doentes (11, 27, 344). Estes factores intrínsecos ao ambiente nosocomial desempenham um papel determinante na dinâmica das IFI, tornando necessária uma abordagem personalizada para o controlo e prevenção, adaptada às particularidades de cada UCI. Neste contexto, o ambiente das UCI, marcado por interações complexas entre factores demográficos, epidemiológicos e clínicos, favorece a transmissão e colonização por fungos patogénicos oportunistas, nomeadamente do género *Candida* (7). A colonização por espécies de *Candida* é um passo inicial determinante na patogénese da infeção sistémica. Por conseguinte, compreender a micobiota e os factores de risco associados à colonização fúngica em doentes em UCI é essencial para melhorar os cuidados e resultados clínicos.

Atualmente, nas UCI em Portugal, não existe informação sobre a dinâmica da colonização fúngica, particularmente por *Candida* spp., dos factores de risco modificáveis e do seu impacto no risco de sobrevivência. Por conseguinte, pretendeu-se com este estudo efetuar vigilância epidemiológica com o objetivo de desenvolver práticas adequadas de controlo de infeção e redução do risco de infeções fúngicas em doentes críticos.

Assim, neste capítulo pretende-se explorar a diversidade da micobiota nas diferentes UCI em estudo, com ênfase no papel do hospedeiro por forma a responder às questões de investigação seguintes:

- Existem factores de risco do hospedeiro associados à colonização fúngica em UCI?
- O tipo de UCI influencia a diversidade da micobiota?
- Há uma associação entre a colonização fúngica e o índice de mortalidade?

4.2 Objetivos

Objetivo geral

- Compreender a dinâmica da colonização da micobiota da pele dos doentes em UCI e avaliar a associação entre a colonização por *Candida* e o índice de sobrevivência do doente.

Objetivos específicos

- Caracterizar demográfica e clinicamente uma coorte de doentes em UCI da área metropolitana de Lisboa, Portugal;
- Avaliar a micobiota relativamente às características epidemiológicas e clínicas dos doentes em UCI;
- Determinar os factores de risco do hospedeiro para colonização fúngica em UCI;
- Determinar a influência das UCI na diversidade e intensidade de colonização fúngica.

4.3 Material e Métodos

4.3.1 Características da coorte

A amostra populacional utilizada para determinar a influência das UCI na diversidade e intensidade de colonização fúngica, teve por base o estudo prospetivo, multicêntrico, previamente descrito no Capítulo 2.

O estudo envolveu 682 doentes. O consentimento informado foi recusado por três doentes e quatro não cumpriam os critérios de inclusão (idade inferior a 18 anos). Um total de 675 doentes foram incluídos no estudo no período em que este decorreu, 2020-22, nomeadamente 64, 71 e 540 doentes, respetivamente, da UCICRE-HFF, UCIP-HFF e UCI do HBA (Fig. 4.1).

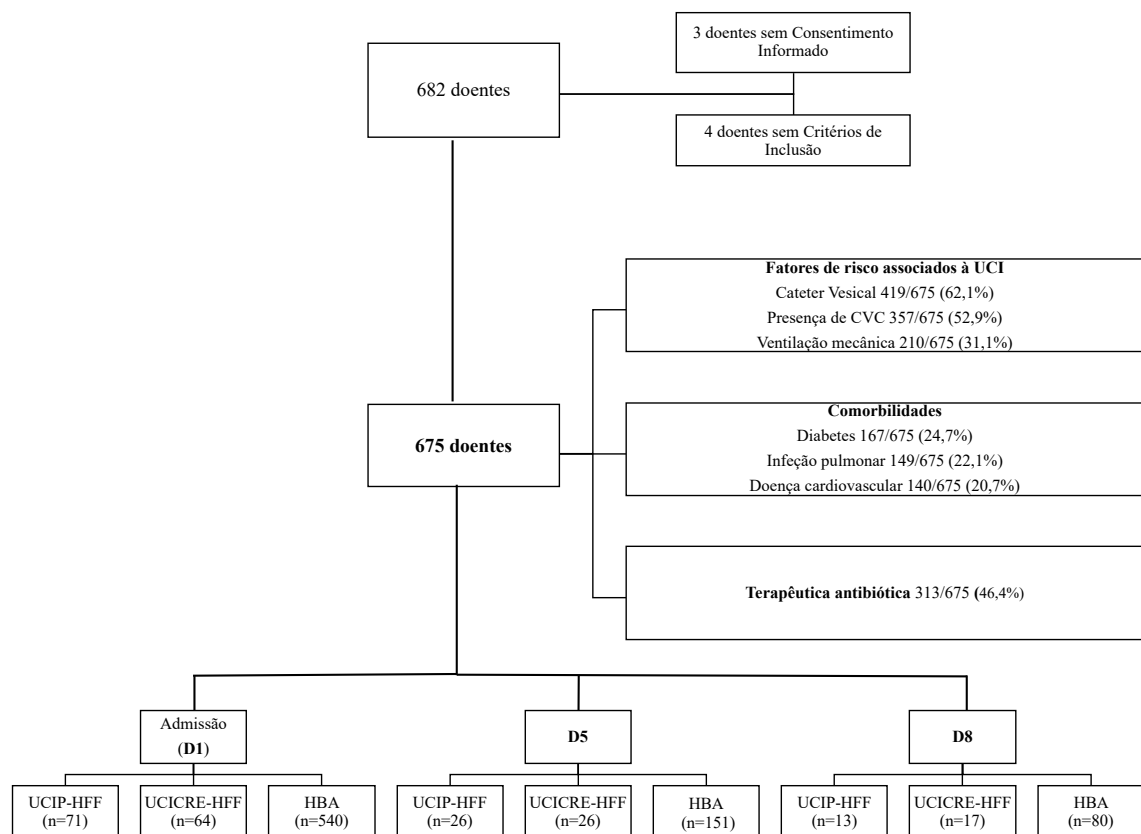


Figura 4.1. Fluxograma detalhado da amostra populacional no estudo prospetivo (n= número de doentes).

A partir desta coorte, todos os doentes que respeitaram os critérios de inclusão na admissão e permaneceram hospitalizados durante todo o período do estudo foram acompanhados. O momento sequencial de recolha de amostras (D1, D5 e D8) do internamento na UCI foi realizado com o objetivo de observar a influência do ambiente da UCI, fornecendo informações sobre a progressão da colonização e a eficácia das estratégias de intervenção. Assim, desta coorte 203 doentes foram acompanhados com uma segunda colheita no dia 5 (D5) e, destes, 89 doentes igualmente monitorizados no dia 8 (D8). Vinte e um doentes foram acompanhados no D1 e no D8, mas não no D5.

4.3.2 Definições

A interpretação dos resultados obtidos foi efetuada tendo por base as considerações seguintes: definiu-se como colonização por fungos leveduriformes, os doentes para os quais se obteve crescimento em uma ou mais amostras, sem clínica associada. Para os fungos filamentosos foi considerado indicativo de colonização, o crescimento nas amostras biológicas recolhidas, na ausência de informação radiológica e clínica.

Para o estudo da associação dos resultados microbiológicos com os parâmetros clínicos, primeiro, procuraram-se factores associados à colonização fúngica na UCI. Os doentes que apresentaram culturas positivas foram comparados com aqueles cujas culturas estavam negativas. Foi adotada uma abordagem dinâmica para tentar identificar factores que possam influenciar as variações no índice de colonização ao longo do tempo. Em segundo lugar, a taxa de sobrevivência do doente foi avaliada a três meses na UCI do HBA. Dado o desenho do estudo o valor preditivo do índice de colonização não foi avaliado.

4.3.3 Análise estatística

Para a análise dos dados, foi criada uma base de dados no programa SPSS (versão 29.0) (operacionalização das variáveis). Os resultados foram tratados e analisados através de diversas abordagens estatísticas atendendo à natureza das variáveis em estudo.

Neste trabalho, foi efetuada uma análise exploratória e descritiva dos dados, de forma a identificar alguns padrões para cada variável da amostra. Assim, para as variáveis

qualitativas foram utilizadas as frequências absolutas e relativas, e para as variáveis quantitativas, os valores mínimo e máximo, média e desvio padrão.

As comparações das variáveis categóricas foram efetuadas através do teste do Qui-quadrado (χ^2). A regressão logística foi utilizada para examinar a contribuição independente dos factores que foram preditivos de aquisição de colonização fúngica na análise univariada na admissão e durante todo o período de permanência na UCI. O valor de p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo em qualquer uma das análises inferenciais acima mencionadas. Uma abordagem gradual foi utilizada para determinar quais dos factores ou variáveis estudadas estavam mais fortemente associadas às variações do índice de colonização.

4.4 Resultados

4.4.1 Características demográficas e clínicas dos doentes

Na amostra em estudo, 401 doentes (59,4%) eram do sexo masculino e 566 (83,8%) eram leucodérmicos, com uma idade média de 67 anos. A maioria dos doentes tinha um cateter venoso central (CVC) (357/675, 52,9%), quase metade dos doentes recebeu terapêutica antibiótica prévia (313/675, 46,4%) e 210/675 (31,1%) estava sob ventilação mecânica (Tabela 4.1). Uma percentagem significativa dos doentes apresentava comorbilidades subjacentes relevantes à admissão em cada UCI, nomeadamente infeção pulmonar para a UCIP do HFF; tumores de órgãos sólidos e neoplasias hematológicas para a UCICRE do HFF e patologia cardiovascular, anemia, imunodeficiência e COVID-19 para a UCI do HBA. Os factores de risco associados ao ambiente da UCI são estatisticamente relevantes na UCICRE do HFF e incluem a presença de um cateter venoso central, ventilação mecânica e cirurgia abdominal. O uso de antimicrobianos também pode ser visto como significativo para as UCI do HFF nesta coorte. As características demográficas e clínicas completas da população em estudo são apresentadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Características demográficas e clínicas dos doentes¹.

Características dos doentes	Total (n=675)	UCIP-HFF (n=71)	UCICRE-HFF (n=64)	HBA (n=540)	p
Idade (anos)					0,210
18-40	73 (10,8)	13 (18,3)	5 (7,8)	55 (10,2)	
41-60	168 (24,9)	20 (28,2)	15 (23,4)	133 (24,6)	
61-80	361 (53,5)	29 (40,8)	39 (60,9)	293 (54,3)	
81+	73 (10,8)	9 (12,7)	5 (7,8)	59 (10,9)	
Género					0,002
Masculino	401 (59,4)	30 (42,3)	34 (53,1)	337 (63,2)	
Feminino	267 (39,6)	41 (57,7)	30 (46,9)	196 (36,8)	
Raça					0,047
Leucodérmico	566 (83,8)	55 (77,5)	49 (76,6)	463 (85,7)	
Melanodérmico	109 (16,2)	16 (22,5)	15 (23,4)	77 (14,3)	
Viagem ao estrangeiro ²	13 (1,9)	2 (2,8)	3 (4,7)	8 (1,5)	0,178
Comorbilidades					
Infeção pulmonar	149 (22,1)	39 (54,9)	22 (34,4)	88 (16,3)	< 0,001
Doença cardiovascular	140 (20,7)	3 (4,2)	2 (3,1)	136 (25,2)	< 0,001
Patologia gastrointestinal	107 (15,9)	2 (2,8)	2 (3,1)	38 (7,0)	0,471
Infeção do Trato Urinário	44 (6,5)	4 (5,6)	3 (4,7)	37 (6,9)	0,763
Tumor sólido	132 (19,6)	5 (7,0)	18 (28,1)	109 (20,2)	0,006
Neoplasia hematológica	11 (1,6)	0 (0,0)	5 (7,8)	6 (1,1)	< 0,001
Diabetes <i>mellitus</i>	167 (24,7)	16 (22,5)	13 (20,3)	138 (25,6)	0,591
HIV/SIDA	13 (1,9)	0 (0,0)	2 (3,1)	11 (2,0)	0,384
Anemia (Hb < 10 mg/dl)	68 (10,1)	3 (4,2)	1 (1,6)	64 (11,9)	0,008
Imunodeficiência severa	11 (1,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	11 (2,0)	< 0,001
COVID-19	35 (5,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	35 (6,5)	0,010
Factores de risco					
Presença de CVC ³	357 (52,9)	39 (54,9)	43 (67,2)	275 (50,9)	0,045
Ventilação mecânica	210 (31,1)	27 (38,0)	29 (45,3)	154 (28,5)	0,010
NP ⁴	9 (1,3)	1 (1,4)	0 (0,0)	8 (1,5)	0,619
Cirurgia abdominal	194 (28,7)	9 (12,7)	23 (35,9)	162 (30,0)	0,004
Neutropenia	6 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (1,1)	0,469
Cateter Vesical	419 (62,1)	47 (66,2)	47 (73,4)	325 (60,2)	0,089
Díalise	45 (6,7)	5 (7,0)	6 (9,4)	34 (6,3)	0,641
Terapêutica antibiótica ⁵	313 (46,4)	56 (78,9)	45 (70,3)	212 (39,3)	< 0,001
Terapêutica antifúngica ⁶	16 (2,4)	2 (2,8)	5 (7,8)	9 (1,7)	0,009

¹ Os dados são apresentados como N (%), exceto quando especificado em contrário. ² Nos três meses precedentes ao internamento, incluindo deslocações realizadas por emigrantes e imigrantes em trânsito ou retorno ao país de origem.

³ Cateter venoso central (CVC). ⁴ Nutrição Parentérica (NP). ⁵ Terapêutica antibiótica nas 48 horas precedentes ao internamento. ⁶ Características clínicas dos doentes sob terapêutica antifúngica (Tabela 4.2).

O uso de antifúngicos foi para fins profiláticos (fluconazol ou equinocandinas) e considerado apenas em grupos-alvo de doentes, ou seja, doentes com cirurgia abdominal recente e perfurações gastrointestinais recorrentes ou diabéticos (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Características clínicas dos doentes submetidos a terapêutica antifúngica profilática por UCI hospitalar¹.

Características dos doentes	Total (n=16)	UCIP-HFF (n=2)	UCICRE-HFF (n=5)	HBA (n=9)	<i>p</i>
Comorbilidades					
Infeção pulmonar	7 (43,8)	2 (100)	3 (60,0)	2 (22,2)	0,091
Patologia gastrointestinal	2 (12,5)	0 (0,0)	1 (20,0)	1 (11,1)	0,756
Tumor sólido	6 (37,5)	1 (50,0)	3 (60,0)	2 (22,2)	0,348
Neoplasia hematológica	1 (6,3)	0 (0,0)	1 (20,0)	0 (0,0)	0,309
Diabetes <i>mellitus</i>	7 (43,8)	1 (50,0)	2 (40,0)	4 (44,4)	0,969
Anemia (Hb <10mg/dl)	2 (12,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (22,2)	0,411
Imunodeficiência severa	1 (6,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (11,1)	0,660
COVID-19	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	-
Factores de risco					
Presença de CVC ²	12 (75,0)	1 (50,0)	5 (100,0)	6 (66,7)	0,264
Ventilação mecânica	6 (37,5)	0 (0,0)	2 (40,0)	4 (44,4)	0,497
NP ³	1 (6,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (11,1)	0,660
Cirurgia abdominal	4 (25,0)	0 (0,0)	1 (20,0)	3 (33,3)	0,587
Cateter Vesical	13 (81,3)	1 (50,0)	5 (100)	7 (77,8)	0,285
Díalise	2 (12,5)	0 (0,0)	1 (20,0)	1 (11,1)	0,756
Terapêutica antibiótica ⁴	14 (87,5)	2 (100,0)	5 (100,0)	7 (77,8)	0,411
Terapêutica antifúngica					0,279
Fluconazol	11 (68,8)	1 (50,0)	2 (40,0)	8 (88,9)	
Caspofungina	4 (25,0)	1 (50,0)	2 (40,0)	1 (11,1)	
Fluconazol + Caspofungina	1 (6,3)	0 (0,0)	1 (20,0)	0 (0,0)	

¹ Os dados são apresentados como N.º (%), exceto quando especificado em contrário. ² Cateter venoso central (CVC).

³ Nutrição parentérica (NP). ⁴ Nas últimas 48 horas.

4.4.2 Taxas de colonização

Neste estudo, 184/675 (27,3%); 87/203 (42,9%) e 58/110 (52,7%) doentes apresentaram-se colonizados por espécies fúngicas, respetivamente, na admissão (D1), D5 e D8. A dinâmica da colonização expressa em termos de variações com o tempo de permanência na UCI evidenciou que dos 203 doentes com colheita em D5, 74 (36,5%) estavam previamente colonizados em D1. Para os 110 doentes com colheita em D8, 48/110 (43,6%) e 42/110 (38,2%) já eram positivos em D1 e D5, respetivamente (Tabela 4.3). A colonização global mostrou 232/675 (34,4%) doentes colonizados, sendo que 48/313 (15,3%) foram colonizados na UCI e 26/89 (29,2%) permaneceram colonizados durante todo o período de permanência na UCI (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Dinâmica da permanência do doente na UCI vs. taxa de colonização, de D1 a D8¹.

Coorte de doentes	D1 (n=675)	D5 (n=203)	D8 (n=110)
Colonizados (total)	184 (27,3)	87 (42,9)	58 (52,7)
Colonizados previamente (em D1)	-	74 (36,5)	48 (43,6)
Colonizados previamente (em D5)	-	-	42 (38,2)
Colonizados previamente (em D1 e D5)	-	-	26 (29,6) ²
Colonizados na UCI		36 (17,7)	12 (10,9)

¹ Os dados são apresentados como N (%), exceto quando especificado em contrário. ² 29,2% dos 89 doentes que permaneceram durante todo o tempo de internamento na UCI foram colonizados permanentemente.

É possível observar uma tendência para o aumento da colonização nos doentes monitorizados durante todo o período de internamento (n=89). Para estes doentes, a colonização distribuída por UCI está evidenciada na Figura 4.2.

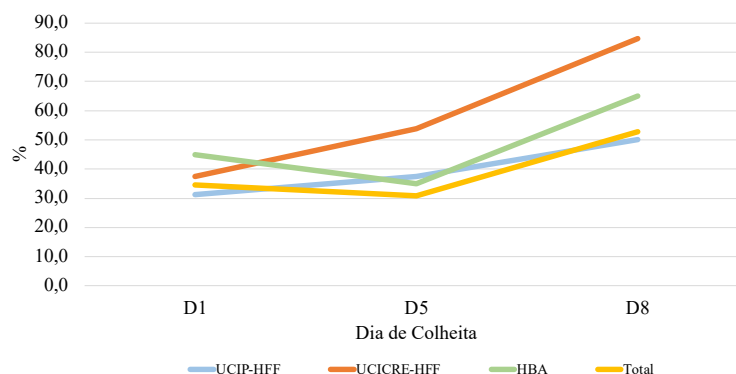


Figura 4.2. Perfil da colonização fúngica ao longo do período de internamento na UCICRE-HFF, UCIP-HFF e UCI do HBA (n=89).

Apesar de uma ligeira inflexão ao 5º dia de internamento, é relevante a observação de uma tendência para um aumento da colonização nos doentes monitorizados durante os 8 dias de internamento.

No período de estudo, 2020-22, foram envolvidos no estudo, 135 doentes em 2020 (71 e 64 doentes da UCI médica e cirúrgica do HFF, respetivamente), 170 doentes em 2021 e 370 em 2022 (540 doentes da UCI do HBA). Foi observada uma diminuição na colonização fúngica desde o início do estudo, com 47,4% (64 de 135) dos doentes colonizados em 2020, 38,8% (66 de 170) em 2021 e 27,6% (102 de 370) em 2022.

4.4.3 Factores demográficos e clínicos predisponentes de colonização fúngica

Neste estudo, observou-se que, tal como o sexo e a raça, a idade do doente não teve um impacto positivo nas taxas de densidade de colonização fúngica. Conforme resumido

na Tabela 4.4, na admissão à UCI, os doentes mais suscetíveis de serem colonizados foram admitidos na UCIP do HFF, correspondendo a 29/71 (40,8%) ($p = 0,007$).

Tabela 4.4. Avaliação univariada do risco de colonização doente na admissão na UCI*.

Variável	Categoria	Colonizados n (%)	Odds Ratio (95% IC)	p
Unidade de Cuidados Intensivos	HBA	137/540 (25,4)	1	-
	UCICRE-HFF	18/64 (28,1)	1,15 (0,65-2,05)	0,634
	UCIP-HFF	29/71 (40,8)	2,03 (1,22-3,39)	0,007
Faixa etária (anos)	18-40	23/73 (31,5)	1	-
	41-60	43/168 (25,6)	0,75 (0,41-1,37)	0,345
	61-80	94/361 (26,0)	0,76 (0,44-1,32)	0,338
	81+	24/73 (32,9)	1,06 (0,53-2,13)	0,859
Género	Feminino	78/267 (29,2)	1	-
	Masculino	105/401 (26,2)	0,86 (0,61-1,21)	0,390
Raça	Melanodérmico	26/107 (24,3)	1	1
	Leucodérmico	158/566 (27,9)	1,21 (0,75-1,95)	0,442
Diabetes <i>mellitus</i>	Não	130/508 (25,6)	1	-
	Sim	54/167 (32,3)	1,34 (0,95-2,03)	0,090
Infecção pulmonar	Não	131/526 (24,9)	1	-
	Sim	53/149 (35,6)	1,67 (1,13-2,46)	0,010
Doença cardiovascular	Não	151/536 (28,2)	1	-
	Sim	33/139 (23,7)	0,79 (0,51-1,22)	0,296
Tumor sólido	Não	147/543 (27,1)	1	-
	Sim	37/132 (28,0)	1,05 (0,69-1,60)	0,824
Patologia gastrointestinal	Não	157/570 (27,5)	1	-
	Sim	27/105 (25,7)	0,91 (0,57-1,46)	0,699
Anemia (Hb < 10 mg/dl)	Não	161/607 (26,5)	1	-
	Sim	23/68 (33,8)	1,42 (0,83-2,41)	0,200
Infecção do trato urinário	Não	170/631 (26,9)	1	-
	Sim	14/44 (31,8)	1,23 (0,66-2,44)	0,482
COVID-19	Não	179/640 (28,0)	1	-
	Sim	5/35 (14,3)	0,43 (0,16-1,12)	0,085
HIV/SIDA	Não	183/662 (27,6)	1	-
	Sim	1/13 (7,7)	0,22 (0,03-1,69)	0,145
Neoplasia hematológica	Não	180/664 (27,1)	1	-
	Sim	4/11 (36,4)	1,54 (0,44-5,31)	0,497
Imunodeficiência severa	Não	182/664 (27,4)	1	-
	Sim	2/11 (18,2)	0,59 (0,13-2,75)	0,500
Cateter vesical	Não	64/256 (25,0)	1	-
	Sim	120/419 (28,6)	1,20 (0,85-1,71)	0,303
Presença de CVC	Não	74/318 (23,3)	1	-
	Sim	110/357 (30,8)	1,47 (1,04-2,07)	0,028
Ventilação mecânica	Não	114/465 (24,5)	1	-
	Sim	70/210 (33,3)	1,54 (1,08-2,20)	0,018
Cirurgia abdominal	Não	139/481 (28,9)	1	-
	Sim	45/194 (23,2)	0,74 (0,50-1,10)	0,132
Diálise	Não	165/630 (26,2)	1	-
	Sim	19/45 (42,2)	2,06 (1,11-3,82)	0,020

Tabela 4.4. Avaliação univariada do risco de colonização doente na admissão na UCI* (continuação).

Variável	Categoria	Colonizados n (%)	Odds Ratio (95% IC)	p
Nutrição parentérica	Não	181/666 (27,2)	1	-
	Sim	3/9 (33,3)	1.34 (0,33-5,41)	0,681
Neutropenia	Não	182/669 (27,2)	1	-
	Sim	2/6 (33,3)	1.34 (0,24-7,37)	0,738
Terapêutica antibiótica	Não	88/362 (24,3)	1	-
	Sim	96/313 (30,7)	1.38 (0,98-1,93)	0,065
Terapêutica antifúngica	Não	179/659 (27,2)	1	-
	Sim	5/16 (31,3)	1.22 (0,42-3,56)	0,717

* 184 doentes colonizados em D1: 27,3% do total (n=675).

É importante salientar que, entre os vários factores de risco relevantes que influenciam significativamente a incidência de colonização, verificou-se que a infeção pulmonar, a presença de CVC, a ventilação mecânica e a diálise foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$) (Tabela 4.4). Os restantes factores de risco não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$), incluindo a cateterização urinária, cirurgia abdominal, nutrição parentérica total, neutropenia, cancro (leucemia e tumor sólido), anemia, diabetes *mellitus* e tratamento com antibióticos e antifúngicos (Tabela 4.4).

A análise multivariada foi realizada para detetar possíveis factores de risco associados à colonização fúngica entre os participantes do estudo. A presença de uma infeção pulmonar subjacente e estar sob diálise tiveram significância estatística para prever a colonização fúngica (OR = 1,74, IC 95% 1,17-2,58, $p = 0,006$ e OR= 2,19, IC 95% 1,17-4,10, $p = 0,014$, respetivamente). Em contrapartida, a presença concomitante de COVID-19 (OD= 0,37 IC 95% 0,14-0,99, $p = 0,048$), apresentou igualmente significado estatístico, mas neste caso como factor associado a uma diminuição do risco de colonização (Tabela 4.5).

Tabela 4.5. Análise multivariada do risco de colonização do doente na admissão na UCI*.

Indicador		Odds Ratio (95% IC)	p
Infeção pulmonar	Sim	1,74 (1,17-2,58)	0,006
Diálise	Sim	2,19 (1,17-4,10)	0,014
COVID-19	Sim	0,37 (0,14-0,99)	0,048

* Modelo reduzido final obtido por um procedimento *forward stepwise* (Wald). O modelo foi estatisticamente significativo, $\chi^2 (3) = 16,405$, $p < 0,001$, com Nagelkerke $R^2 = 0,035$ e classificou corretamente 73,0% dos casos.

Considerando a avaliação univariada de risco para colonização permanente durante todo o tempo de permanência na UCI (D1-D8), não foi observada associação significativa de colonização em ambos os hospitais terciários (Tabela 4.6). Uma vez que o grau de colonização fúngica pode contribuir para o risco de infeção subsequente do doente ou atuar como fonte de transmissão, foi quantificada a densidade de colonização. A taxa de colonização ao longo do internamento na UCI refletiu algumas variações embora sem significado estatístico e referidas no Capítulo 2.

Tabela 4.6. Análise de risco univariada para colonização permanente durante todo o tempo de permanência na UCI (D1-D8) *.

Variável	Categoria	Colonização n (%)	Odds Ratio (95% IC)	p
Unidade de Cuidados Intensivos	HBA	17/60 (28,3)	1	-
	UCICRE-HFF	5/16 (31,3)	1,15 (0,35-3,81)	0,819
	UCIP-HFF	4/13 (30,8)	1,12 (0,30-4,14)	0,860
Faixa etária (anos)	18-40	2/7 (28,6)	1	-
	41-60	7/21 (33,3)	1,25 (0,19-8,14)	0,815
	61-80	15/54 (27,8)	1,11 (0,18-6,99)	0,911
	81+	2/7 (28,6)	1,00 (0,10-10,17)	1,000
Género	Feminino	9/34 (26,5)	1	0,655
	Masculino	17/55 (30,9)	1,24 (0,48-3,22)	-
Raça	Melanodérmico	6/14 (42,9)	1	-
	Leucodérmico	20/75 (26,7)	0,48 (0,15-1,57)	0,228
Diabetes mellitus	Não	14/56 (25,0)	1	-
	Sim	12/33 (36,4)	1,71 (0,67-4,35)	0,255
Infeção pulmonar	Não	16/54 (29,6)	1	-
	Sim	10/35 (28,6)	0,95 (0,37-2,43)	0,915
Doença cardiovascular	Não	26/80 (32,5)	1	-
	Sim	0/9 (0,0)	-	NA ¹
Tumor sólido	Não	18/69 (26,1)	1	-
	Sim	8/20 (40,0)	1,89 (0,66-5,36)	0,228
Patologia gastrointestinal	Não	19/68 (27,9)	1	-
	Sim	7/21 (33,3)	1,29 (0,45-3,69)	0,635
Anemia (Hb < 10 mg/dl)	Não	22/81 (27,2)	1	-
	Sim	4/8 (50,0)	2,68 (0,62-11,66)	0,188
Infeção do trato urinário	Não	22/83 (26,5)	1	-
	Sim	4/6 (66,7)	5,54 (0,95-32,43)	0,057
COVID-19	Não	24/85 (28,2)	1	-
	Sim	2/4 (50,0)	2,54 (0,34-19,08)	0,364
HIV/SIDA	Não	25/87 (28,7)	1	-
	Sim	1/2 (50,0)	2,48 (0,15-41,21)	0,526
Neoplasia hematológica	Não	24/86 (27,9)	1	-
	Sim	2/3 (66,7)	5,17 (0,45-59,65)	0,188
Imunodeficiência severa	Não	25/87 (28,7)	1	-
	Sim	1/2 (50,0)	2,48 (0,15-41,21)	0,526

Tabela 4.6. Análise de risco univariada para colonização permanente durante todo o tempo de permanência na UCI (D1-D8) * (continuação).

Variável	Categoria	Colonização n (%)	Odds Ratio (95% IC)	p
Cateter vesical	Não	8/27 (29,6)	1	-
	Sim	18/62 (29,0)	0,97 (0,36-2,62)	0,955
Presença de CVC	Não	8/29 (27,6)	1	-
	Sim	18/60 (30,0)	1,12 (0,42-3,01)	0,814
Ventilação mecânica	Não	12/48 (25,0)	1	-
	Sim	14/41 (34,1)	1,56 (0,62-3,90)	0,344
Cirurgia abdominal	Não	23/74 (31,1)	1	-
	Sim	3/15 (20,0)	0,55 (0,14-2,15)	0,394
Diálise	Não	23/82 (28,0)	1	-
	Sim	3/7 (42,9)	1,92 (0,40-9,27)	0,415
Nutrição parentérica	Não	26/89 (29,2)	1	-
	Sim	0/0 (0,0)	-	NA ¹
Neutropenia	Não	26/88 (29,5)	1	-
	Sim	0/1 (0,0)	-	NA ¹
Terapêutica antibiótica	Não	6/28 (21,4)	1	-
	Sim	20/61 (32,8)	1,79 (0,63-5,11)	0,274
Terapêutica antifúngica	Não	24/83 (28,9)	1	-
	Sim	2/6 (33,3)	1,23 (0,21-7,16)	0,819

* 26 (29,2%) dos 89 doentes que permaneceram durante todo o tempo de internamento na UCI foram colonizados de forma permanente. ¹ Não se aplica (NA).

4.4.4 Dados demográficos e características clínicas dos doentes colonizados

Os doentes colonizados eram maioritariamente do sexo masculino, mas a diferença não foi significativa ($p=0,106$). A idade média foi de 63 anos, variando entre 18 e 93 anos. As comorbilidades subjacentes, como a infeção pulmonar ($p < 0,001$), as neoplasias hematológicas ($p=0,002$) e a anemia ($p=0,014$), foram significativamente associadas aos doentes, respetivamente, à UCIP do HFF, UCICRE do HFF e HBA. Além disso, foi encontrada uma associação significativa entre a terapêutica antibiótica ($p < 0,001$) com a UCIP-HFF. As características demográficas e clínicas completas dos doentes colonizados são apresentadas na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Características demográficas e clínicas dos doentes colonizados na admissão à UCI¹.

Características dos doentes	Total (n=232)	UCIP (HFF) (n=38)	UCICRE (HFF) (n=26)	UCI do HBA (n=168)	p
Idade (anos)					0,215
18-40	25 (10,8)	6 (15,8)	2 (7,7)	17 (10,1)	
41-60	56 (24,1)	13 (34,2)	4 (15,4)	39 (23,2)	
61-80	120 (51,7)	15 (39,5)	19 (73,1)	86 (51,2)	
81+	31 (13,4)	4 (10,5)	1 (3,8)	26 (15,5)	
Género					0,106
Masculino	132 (56,9)	16 (42,1)	14 (53,8)	102 (60,7)	
Feminino	100 (43,1)	22 (57,9)	12 (46,2)	66 (39,3)	
Comorbilidades					
Infeção pulmonar	70 (30,2)	24 (63,2)	7 (26,9)	39 (23,2)	< 0,001
Doença cardiovascular	38 (16,4)	2 (5,3)	1 (3,8)	35 (20,8)	0,012
Patologia gastrintestinal	36 (15,5)	3 (7,9)	7 (26,9)	26 (15,5)	0,119
Infeção do Trato Urinário	20 (8,6)	1 (2,6)	0 (0,0)	19 (11,3)	0,057
Tumor sólido	43 (18,5)	4 (10,5)	6 (23,1)	33 (19,6)	0,349
Neoplasia hematológica	5 (2,2)	0 (0,0)	3 (11,5)	2 (1,2)	0,002
Diabetes <i>mellitus</i>	64 (27,6)	10 (26,3)	7 (26,9)	47 (28,0)	0,976
HIV/SIDA	1 (0,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,6)	0,826
Anemia (Hb <10mg/dl)	26 (11,2)	0 (0,0)	1 (3,8)	25 (14,9)	0,014
Imunodeficiência severa	4 (1,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (2,4)	0,461
COVID-19	7 (3,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	7 (4,2)	0,253
Factores de risco					
Presença de CVC ²	138 (59,5)	23 (60,5)	21 (80,8)	94 (56,0)	0,365
Ventilação mecânica	84 (36,2)	13 (34,2)	13 (50,0)	58 (34,5)	0,299
NP ³	3 (1,3)	1 (2,6)	0 (0,0)	2 (1,2)	0,642
Cirurgia abdominal	59 (25,4)	6 (15,8)	10 (38,5)	43 (25,6)	0,123
Neutropenia	2 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,2)	0,681
Cateter Vesical	154 (66,4)	28 (73,7)	20 (78,9)	106 (63,1)	0,221
Diálise	23 (9,9)	3 (7,9)	4 (15,4)	16 (9,5)	0,585
Terapêutica antibiótica ⁴	133 (57,3)	31 (81,6)	20 (76,9)	82 (48,8)	<0,001
Terapêutica antifúngica					
Azóis	6 (2,6)	1 (2,6)	0 (0,0)	5 (3,0)	0,673
Equinocandinas	2 (0,9)	1 (2,6)	1 (3,8)	0 (0,0)	0,062

¹ Os dados são apresentados como N (%), exceto quando especificado em contrário. ² Cateter Venoso Central (CVC).

³ Nutrição Parentérica (NP). ⁴ 48 horas anteriores.

4.4.5 Caracterização epidemiológica e clínica dos isolados de *Candida* spp.

Após a análise da estatística descritiva para os isolados de *Candida* spp. e os diferentes factores epidemiológicos e clínicos dos doentes, não foi encontrada associação entre as espécies de *Candida* e factores demográficos como a idade, sexo, raça e histórico de viagens ao estrangeiro nos últimos três meses (Tabela 4.8).

Relativamente às comorbilidades em estudo nesta coorte, apenas foi encontrada associação entre os doentes colonizados por *C. albicans* portadores de neoplasia hematológica ($p=0,037$). Dos factores de risco associados ao ambiente da UCI, apenas os doentes sob hemodiálise apresentaram uma colonização por *C. albicans* significativa

($p=0,033$). Da mesma forma, não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre o uso prévio de antibióticos e antifúngicos e as espécies de *Candida* spp. (Tabela 4.8).

No que se refere a possíveis associações entre as características clínicas dos doentes colonizados por espécies crípticas, refere-se apenas que um isolado de *C. orthopsilosis* foi obtido de um doente do sexo masculino, com 85 anos de idade, internado na UCIP do HFF por várias comorbilidades e sob terapêutica antibiótica. O segundo isolado de *C. orthopsilosis* foi obtido de um doente do sexo masculino com 66 anos de idade internado na UCI do HBA por causas não descritas no inquérito epidemiológico. Ambos os isolados foram obtidos na admissão ao serviço. O isolado de *C. metapsilosis* foi obtido de um homem internado na UCIP do HFF com 43 anos de idade, melanodérmico, na sequência de infecção intra-abdominal seguida de cirurgia, com cateter vesical e venoso central colocados e sob terapêutica antibiótica. Acrescente-se de que não estava colonizado na admissão ao serviço.

Tabela 4.8. Características demográficas e clínicas dos doentes em função dos isolados de *Candida* spp.¹.

Características dos doentes	Total n= 355	<i>C. albicans</i> n= 185 (52,1)	<i>C. parapsilosis</i> n= 109 (30,7)	<i>C. glabrata</i> n= 36 (10,1)	<i>C. tropicalis</i> n= 15 (4,2)	<i>C. lusitanae</i> n= 4 (1,1)	<i>C. guilliermondii</i> n= 3 (0,8)	<i>C. orthopsilosis</i> n= 2 (0,6)	<i>C. metapsilosis</i> n= 1 (0,3)	<i>p</i>
Idade (anos)										0,693
18-40	35/355 (9,9)	21/185 (11,4)	9/109 (8,3)	2/36 (5,6)	3/15 (20,0)	0/4 (0,0)	0/3 (0,0)	0/2 (0,0)	0/1 (0,0)	
41-60	87/355 (24,5)	51/185 (27,6)	22/109 (20,2)	10/36 (27,8)	3/15 (20,0)	0/4 (0,0)	0/3 (0,0)	1/2 (50,0)	0/1 (0,0)	
61-80	191/355 (53,8)	95/185 (51,4)	64/109 (58,7)	17/36 (47,2)	7/15 (46,7)	3/4 (75,0)	3/3 (100,0)	1/2 (50,0)	1/1 (100,0)	
81+	42/355 (11,8)	18/185 (9,7)	14/109 (12,8)	7/36 (19,4)	2/15 (13,3)	1/4 (25,0)	0/3 (0,0)	0/2 (0,0)	0/1 (0,0)	
Género										0,759
Masculino	208/355 (58,6)	115/185 (62,2)	59/109 (54,1)	20/36 (55,6)	8/15 (53,3)	3/4 (75,0)	2/3 (66,7)	1/2 (50,0)	0/1 (0,0)	
Feminino	147/355 (41,4)	70/185 (37,8)	50/109 (45,9)	16/36 (44,4)	7/15 (46,7)	1/4 (46,7)	1/3 (33,3)	1/2 (50,0)	1/1 (100,0)	
Raça										0,799
Leucodérmico	301/355 (84,8)	156/185 (84,3)	90/109 (82,6)	33/36 (91,7)	12/15 (80,0)	4/4 (100,0)	3/3 (100,0)	2/2 (100,0)	0/1 (0,0)	
Melanodérmico	54/355 (15,2)	29/185 (15,7)	19/109 (17,4)	3/36 (8,3)	3/15 (20,0)	0/4 (0,0)	0/3 (0,0)	0/2 (0,0)	1/1 (100,0)	
Viagens										0,998
Europa	1/355 (0,3)	1/185 (0,5)	0/109 (0,0)	0/36 (0,0)	0/15 (0,0)	0/4 (0,0)	0/3 (0,0)	0/2 (0,0)	0/1 (0,0)	
África	7/355 (2,0)	5/185 (2,7)	1/109 (0,9)	0/36 (0,0)	1/15 (6,7)	0/4 (0,0)	0/3 (0,0)	0/2 (0,0)	0/1 (0,0)	
América do Sul	1/355 (0,3)	0/185 (0,0)	1/109 (0,9)	0/36 (0,0)	0/15 (0,0)	0/4 (0,0)	0/3 (0,0)	0/2 (0,0)	0/1 (0,0)	
Comorbilidades										
Infeção pulmonar	114/355 (32,1)	57/185 (30,8)	37/109 (33,9)	11/36 (30,6)	6/15 (40,0)	1/4 (25,0)	1/3 (33,3)	1/2 (50,0)	0/1 (0,0)	0,977
Doença cardiovascular	54/355 (15,2)	28/185 (15,1)	19/109 (17,4)	5/36 (13,9)	2/15 (13,3)	0/4 (0,0)	0/3 (0,0)	0/2 (0,0)	0/1 (0,0)	0,941
Doença gastrointestinal	18/355 (5,1)	8/185 (4,3)	7/109 (6,4)	2/36 (5,6)	0/15 (0,0)	0/4 (0,0)	0/3 (0,0)	1/2 (50,0)	0/1 (0,0)	0,174
Tumor sólido	72/355 (20,3)	37/185 (20,0)	22/109 (20,2)	10/36 (27,8)	1/15 (6,7)	1/4 (25,0)	1/3 (33,3)	0/2 (0,0)	0/1 (0,0)	0,766
Neoplasia hematológica	12/355 (3,4)	5/185 (2,7)	4/109 (3,7)	1/36 (2,8)	0/15 (0,0)	1/4 (25,0)	1/3 (33,3)	0/2 (0,0)	0/1 (0,0)	0,037
Diabetes mellitus	111/355 (31,3)	58/185 (31,4)	36/109 (33,0)	11/36 (30,6)	3/15 (20,0)	0/4 (0,0)	2/3 (66,7)	1/2 (50,0)	0/1 (0,0)	0,611
HIV/SIDA	4/355 (1,1)	2/185 (1,1)	0/109 (0,0)	1/36 (2,8)	1/15 (6,7)	0/4 (0,0)	0/3 (0,0)	0/2 (0,0)	0/1 (0,0)	0,497

¹ Os dados são apresentados como N (%), exceto quando especificado em contrário. ² Cateter Venoso Central (CVC). ³ Nutrição Parentérica (NP).

Tabela 4.8. Características demográficas e clínicas dos doentes em função dos isolados de *Candida* spp.¹ (continuação).

Características dos doentes	Total n= 355	<i>C. albicans</i> n= 185 (52,1)	<i>C. parapsilosis</i> n= 109 (30,7)	<i>C. glabrata</i> n= 36 (10,1)	<i>C. tropicalis</i> n= 15 (4,2)	<i>C. lusitaniae</i> n= 4 (1,1)	<i>C. guilliermondii</i> n= 3 (0,8)	<i>C. orthopsilosis</i> n= 2 (0,6)	<i>C. metapsilosis</i> n= 1 (0,3)	<i>p</i>
Comorbilidades										
Anemia	40/355 (11,3)	21/185 (11,4)	12/109 (11,0)	6/36 (16,7)	1/15 (6,7)	0/4 (0,0)	0/3 (0,0)	0/2 (0,0)	0/1 (0,0)	0,916
Infeção Trato Urinário	29/355 (8,2)	14/185 (7,6)	10/109 (9,2)	3/36 (8,3)	1/15 (6,7)	0/4 (0,0)	0/3 (0,0)	0/2 (0,0)	1/1 (100,0)	0,977
Imunodeficiência severa	7/355 (2,0)	4/185 (2,2)	2/109 (1,8)	0/36 (0,0)	1/15 (6,7)	0/4 (0,0)	0/3 (0,0)	0/2 (0,0)	0/1 (0,0)	0,913
Factores de risco										
Presença de CVC ²	216/355 (60,8)	110/185 (59,5)	67/109 (61,5)	21/36 (58,3)	9/15 (60,0)	3/4 (75,0)	3/3 (100,0)	2/2 (100,0)	1/1 (100,0)	0,725
Ventilação mecânica	141/355 (39,7)	70/185 (37,8)	44/109 (40,4)	13/36 (36,1)	6/15 (40,0)	3/4 (75,0)	2/3 (66,7)	2/2 (100,0)	1/1 (100,0)	0,330
NP ³	5/355 (1,4)	1/185 (0,5)	3/109 (2,8)	1/36 (2,8)	0/15 (0,0)	0/4 (0,0)	0/3 (0,0)	0/2 (0,0)	0/1 (0,0)	0,860
Cirurgia abdominal	82/355 (23,1)	42/185 (22,7)	27/109 (24,8)	4/36 (11,1)	1/15 (6,7)	2/4 (50,0)	1/3 (33,3)	0/2 (0,0)	0/1 (0,0)	0,702
Neutropenia	3/355 (0,8)	2/185 (1,1)	0/109 (0,0)	10/36 (27,8)	2/15 (13,3)	0/4 (0,0)	0/3 (0,0)	0/2 (0,0)	0/1 (0,0)	0,897
Cateter vesical	237/355 (66,8)	123/185 (66,5)	68/109 (62,4)	26/36 (72,2)	12/15 (80,0)	0/4 (0,0)	3/3 (100,0)	2/2 (100,0)	1/1 (100,0)	0,527
Diálise	36/355 (10,1)	22/185 (11,9)	9/109 (8,3)	2/36 (5,6)	1/15 (6,7)	0/4 (0,0)	0/3 (0,0)	1/2 (50,0)	0/1 (0,0)	0,033
COVID-19	14/355 (3,9)	10/185 (5,4)	3/109 (2,8)	1/36 (2,8)	0/15 (0,0)	0/4 (0,0)	0/3 (0,0)	0/2 (0,0)	0/1 (0,0)	0,919
Terapêutica										
Antibiótica	211/355 (59,4)	103/185 (55,7)	66/109 (60,6)	24/36 (66,7)	11/15 (73,3)	2/4 (50,0)	3/3 (100,0)	2/2 (100,0)	0/1 (0,0)	0,320
Antifúngica	12/355 (3,4)	4/185 (2,2)	5/109 (4,6)	2/36 (5,6)	0/15 (0,0)	0/4 (0,0)	1/3 (33,3)	0/2 (0,0)	0/1 (0,0)	0,145
UFC/mL										0,940
< 100	81/355 (22,8)	39/185 (21,1)	27/109 (24,8)	9/36 (25,0)	3/15 (20,0)	2/4 (50,0)	1/3 (33,3)	0/2 (0,0)	0/1 (0,0)	
100 – 1000	90/355 (25,4)	46/185 (24,9)	28/109 (25,7)	11/36 (30,6)	4/15 (26,7)	0/4 (0,0)	0/3 (0,0)	1/2 (50,0)	0/1 (0,0)	
> 1000	184/355 (51,8)	100/185 (54,1)	54/109 (49,5)	16/36 (44,4)	8/15 (53,3)	2/4 (50,0)	2/3 (66,7)	1/2 (50,0)	1/1 (100,0)	

¹ Os dados são apresentados como N (%), exceto quando especificado em contrário. ² Cateter Venoso Central (CVC). ³ Nutrição Parentérica (NP).

4.4.6 Índice de sobrevivência dos doentes

Relativamente aos resultados dos doentes estudados, para a UCI do HBA, a taxa de sobrevivência aos três meses foi determinada para o período de estudo de um ano, entre setembro de 2021 e setembro de 2022 ($n= 497$). O índice de mortalidade da população estudada foi de 161/497 (32,4%). Não foram identificadas associações significativas entre os factores de risco para colonização já identificados neste estudo ou outros factores de risco relacionados com patologias subjacentes ou com a UCI.

A mortalidade foi significativamente maior em doentes colonizados na admissão na UCI ($p= 0,010$) e com maior tempo de permanência na UCI ($p= 0,006$). Os resultados mostraram igualmente que a colonização por *C. albicans* está associada a um mau resultado ($p= 0,042$). No entanto, a análise não revelou uma associação significativa entre a densidade de colonização e as taxas de sobrevivência ($p= 0,132$) (Tabela 4.9).

Tabela 4.9. Avaliação do risco de sobrevivência (3 meses) em doentes colonizados na UCI do Hospital Beatriz Ângelo (D1-D8)¹.

Doentes em UCI <i>n= 497</i>	Total	Sobrevivência <i>n= 336</i>	Morte <i>n= 161</i>	<i>p</i>
Factores predisponentes				
Infeção pulmonar	83/497 (16,7)	52/336 (15,5)	31/161 (19,3)	0,291
Diálise	32/497 (6,4)	21/336 (6,3)	11/161 (6,8)	0,061
COVID-19	33/497 (6,6)	25/336 (7,4)	8/161 (5,0)	1,073
Profilaxia antifúngica				
Fluconazol	8/497 (1,6)	4/336 (1,2)	4/161 (2,5)	0,283
Equinocandinas	1/497 (0,2)	0/336 (0,0)	1/161 (0,6)	0,148
Dia de colheita				
D1	130/497 (26,2)	76/336 (22,6)	54/161 (33,5)	0,010
D5	53/129 (41,1)	34/336 (10,1)	19/161 (11,8)	0,570
D8	38/68 (55,9)	18/336 (5,4)	20/161 (12,4)	0,006
<i>Candida</i> spp.				
<i>C. albicans</i>	78/497 (15,7)	45/336 (13,4)	33/161 (20,5)	0,042
<i>C. parapsilosis</i>	48/497 (9,7)	30/336 (8,9)	18/161 (11,2)	0,426
<i>C. glabrata</i>	11/497 (2,2)	6/336 (1,8)	5/161 (3,1)	0,349
<i>C. tropicalis</i>	6/497 (1,2)	5/336 (1,5)	1/161 (0,6)	0,408
UFC/mL (> 1000)	64/497 (12,9)	38/336 (11,3)	26/161 (16,1)	0,132

¹ Os dados são apresentados como N (%), exceto quando especificado em contrário.

Da coorte de um ano do HBA, vale a pena mencionar que 17 doentes foram colonizados durante todo o período de internamento, e 8/17 (47,0%) tiveram um mau prognóstico aos 3 meses.

4.5 Discussão

Este foi o primeiro estudo desenhado e implementado na área metropolitana de Lisboa com vista ao conhecimento sobre a colonização fúngica dos doentes admitidos em UCI em Portugal. Este estudo de carácter prospetivo permitiu em tempo real fornecer os resultados à equipa clínica quanto à diversidade e intensidade de colonização dos doentes internados no serviço.

Para conhecer a taxa de colonização associada ao ambiente da UCI, foi avaliada a colonização, não apenas na admissão ao Serviço, mas incluiu os primeiros 8 dias de internamento na unidade. A recolha de amostras no momento da admissão proporcionou uma compreensão inicial do estado de colonização por *Candida* dos doentes ao entrarem na UCI, permitindo uma comparação com amostras subsequentes. A análise realizada entre o quinto e oitavo dias após a admissão (D5 e D8) também possibilitou compreender as intervenções implementadas durante a permanência na UCI no que se refere à colonização por espécies de *Candida*.

A prevalência de colonização fúngica foi de 27,3%, 42,9% e 52,7%, respetivamente, na admissão, D5 e D8. Após admissão na UCI, mais 15,3% dos doentes apresentaram-se colonizados e dos 89 doentes com amostras colhidas nos três dias, 29,2% estiveram permanentemente colonizados, o que demonstra a importância do ambiente da UCI na colonização por estes fungos leveduriformes. Embora a colonização na admissão possa refletir a colonização prévia dos doentes, observou-se um aumento percentual durante o período do estudo.

Ao comparar os resultados obtidos com estudos anteriores para a prevalência de doentes colonizados no momento da admissão na UCI, foram observadas taxas de colonização diferentes. Os estudos de Ahmad e colaboradores, Charles e colaboradores e León e colaboradores mostraram uma grande proporção de doentes, 45,6%, 39,1% e 52,2% respetivamente, já colonizados no momento da admissão na UCI (65, 347, 410). Um potencial factor diferenciador que poderá explicar os valores de colonização menores relativamente a estudos anteriores é a implementação das práticas de controlo de infeção através de banhos com soluções antissépticas na admissão e durante o internamento nas UCI em estudo. Tal como no estudo de León e colaboradores (59-63%), foi possível observar que nos doentes com colheitas sequenciais a taxa de colonização pode aumentar

de forma constante, de 27,3%, 42,9% e 52,7%, embora sem relevância estatística (411). No entanto, a comparação das taxas de colonização com estudos anteriores representou um desafio pois, com exceção de León e colaboradores, os restantes autores determinaram as taxas de colonização apenas de *Candida* spp., em diferentes tipos de amostras sépticas e apenas na admissão na UCI.

Os resultados para a densidade de colonização foram na sua maioria elevados (superiores a 1000 UFC/mL) (167/329; 50,8%), mas não se alteraram significativamente ao longo dos primeiros oito dias de internamento, tal como já foi referido por outros autores (65). Esta diferença pode ser explicada pelo curto período de vigilância adotado, já que outro estudo demonstrou que os doentes colonizados por *Candida* apresentaram um tempo de internamento na UCI e no hospital significativamente mais longo (412).

Considerando a unidade de cuidados de saúde, os resultados mostraram que o risco de ser colonizado depende da mesma. A probabilidade de um doente ser colonizado na UCI polivalente do HFF (UCIP) é significativa, quando comparada às demais UCI em estudo ($p=0,004$). É de salientar que as populações de doentes avaliadas são muito heterogéneas, havendo uma associação significativa entre as características clínicas dos doentes e a UCI. Relativamente aos resultados da colonização que refletem a colonização adquirida em cada UCI (amostragem em D5 e D8) a taxa não diferiu de forma significativa entre as UCI. Estes resultados no seu conjunto permitem afirmar que as taxas de colonização são dependentes da unidade local de saúde e sugestivas da relação com a exposição aos factores de risco associados.

Factores predisponentes para a colonização fúngica

Vários factores de risco têm sido associados à colonização fúngica, nomeadamente, extremos de idade (recém-nascidos de baixo peso e idosos), neoplasias hematológicas e outros cancros, quimioterapia, neutropenia, mucosite do trato digestivo, cateteres intravenosos e/ou tratamento prolongado com corticosteroides e até antimicrobianos, incluindo antifúngicos (413, 414). Neste estudo, os procedimentos invasivos na UCI, como ventilação mecânica invasiva, cateterização venosa central e doentes em diálise, apresentaram significância estatística numa análise de risco univariada. Estas observações são concordantes com um estudo retrospectivo no mesmo tempo temporal (era pandémica

e ano pós-pandemia) que evidenciam o risco de infecção/ colonização fúngica aumentado com a duração da ventilação mecânica invasiva (348). Das patologias subjacentes em avaliação, os doentes com doença pulmonar apresentaram maior risco de colonização, o que corrobora estudos anteriores (29, 65, 145, 346, 410, 411, 415, 416). No entanto, não se observou influência do tempo de internamento sobre os diferentes factores de risco (intrínsecos e extrínsecos) em avaliação nesta investigação.

Quando se pretendeu identificar os factores de risco independentes para colonização fúngica na pele de doentes em UCI, foi efetuada a análise de regressão logística que revelou três factores de risco relacionados principalmente com intervenções médicas durante os cuidados intensivos ou comorbilidades, nomeadamente, infecção pulmonar, COVID-19 e hemodiálise. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores, considerando a doença respiratória um dos melhores preditores de risco para o desenvolvimento de infecção por *Candida* (417, 418).

Porém e contrariamente às expectativas, a COVID-19 teve um efeito protetor contra o desenvolvimento da colonização por *Candida*. Está descrito que os doentes com COVID-19 apresentam múltiplas razões para estarem em maior risco de candidemia e os doentes gravemente doentes com COVID-19 estão em risco ainda maior de desenvolver candidemia devido à necessidade de cuidados intensivos (419, 420). No entanto, os resultados obtidos mostram a COVID-19 como factor protetor da colonização fúngica em doentes críticos. Estes resultados devem ser confirmados por outros estudos, mas poderá considerar-se a hipótese de que os doentes com COVID-19 internados em UCI recebam cuidados médicos intensos que podem ajudar a prevenir a colonização fúngica a partir do microbioma da pele ou do ambiente da UCI. Outra hipótese de base imunológica, consiste no inflamossoma superior destes doentes, que pode traduzir uma resposta imunitária inata maior sobre a colonização fúngica.

É de salientar que, para os factores de risco apontados, todos os OR foram pequenos, o que, de facto, está de acordo com uma análise que identificou 29 factores de risco para a infecção invasiva por *Candida* na UCI a partir de 34 estudos, com a maioria dos OR pequenos (29).

Contrariamente aos resultados obtidos em estudos anteriores, não se observou associação estatisticamente significativa entre a colonização por *Candida* e a presença de factores de risco como diabetes, cirurgia abdominal, HIV, neoplasias hematológicas,

tumores sólidos, nutrição parentérica, cirurgia abdominal e toma de antibióticos de espectro alargado (63, 361, 417).

Esta discrepância pode dever-se à amostra biológica utilizada nesta investigação, zaragatoas mucocutâneas, enquanto outros estudos utilizaram os isolados de hemoculturas. A corroborar esta justificação, tem-se o exemplo da toma de antibióticos que promovem um crescimento excessivo de leveduras na flora intestinal. Por conseguinte, vários estudos que avaliaram a colonização fúngica a partir de outras amostras biológicas (ex. zaragatoa retal), associaram o consumo de antibióticos ao aumento do índice de colonização fúngica (65, 144). Perante o exposto, pode considerar-se que existe uma plausibilidade biológica para que quase todos os factores de risco associados ao ambiente de UCI estejam significativamente associados à colonização/infeção por *Candida*.

Relação da prevalência das diferentes espécies de Candida com os factores demográficos e clínicos dos doentes

Após analisar a estatística descritiva para os isolados de *Candida* spp. e os diferentes factores epidemiológicos e clínicos dos doentes, não foi encontrada associação entre as espécies de *Candida* e factores demográficos como idade, sexo, raça e viagens ao estrangeiro nos últimos três meses. *C. glabrata* é geralmente mais comum entre indivíduos com idade superior a 60 anos, mas apesar da idade mediana da coorte ser de 67 anos, apenas 36/355 (10,1%) isolados foram identificados. Este resultado pode ser devido ao tipo de amostra biológica, ambiente nosocomial (UCI) e comorbilidades associadas, já que em estudos anteriores, a prevalência de *C. glabrata* foi superior em doentes transplantados de órgãos sólidos e internados em enfermarias que não UCI (18% a 29%, $p < 0,001$) (421, 422).

Nesta coorte, dos 109 isolados de *C. parapsilosis*, 67/109 (61,5%) e 44/109 (40,4%) dos doentes tinham um CVC e eram ventilados mecanicamente, respetivamente. Além disso, 27/109 (24,8%) dos doentes da UCI foram submetidos a cirurgia do trato gastrointestinal. No entanto, não foi encontrado significado estatístico apesar de *C. parapsilosis* representar um risco elevado para estes indivíduos imunocomprometidos (71). Da mesma forma, não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre

o uso prévio de antibióticos e antifúngicos e a colonização por diferentes espécies de *Candida*.

C. tropicalis tem origem no trato gastrointestinal e foi descrita no passado como uma causa comum de candidemia em doentes neutropénicos. Nesta amostra, apenas 0,9% dos doentes eram neutropénicos, o que poderá explicar apenas 4,2% dos isolados de *Candida* nesta coorte. Ainda assim, para os três doentes neutropénicos colonizados, não foi isolada *C. tropicalis*.

C. krusei é a menos comum das cinco principais espécies de *Candida* e é mais frequentemente encontrada em doentes com doenças malignas hematológicas subjacentes que receberam profilaxia antifúngica com fluconazol (60). Talvez esta seja uma das razões pela qual esta espécie não tenha sido isolada nos doentes da coorte estudada (apenas 2,4% dos doentes encontravam-se sob profilaxia com fluconazol e 1,1% apresentavam neoplasias hematológicas subjacentes).

No que se refere à colonização por *C. auris*, na Europa, os novos casos foram diagnosticados principalmente durante a pandemia da doença do coronavírus SARS-Co-2 (COVID-19), particularmente em Espanha (n= 591), Itália (n= 291) e Grécia (n= 71), bem como o primeiro caso clínico de Portugal (181, 183). No entanto, os resultados dos 35 doentes com COVID-19 em UCI estudados não apresentaram os mesmos resultados, tornando difícil determinar o papel desempenhado pela pandemia de COVID-19. No mesmo período, um estudo no Norte de Itália identificou um número de casos elevado de *C. auris*, detetados em 17 instalações de cuidados de saúde, sendo na sua maioria casos de colonização (91,8%) de uma coorte em que apenas um doente tinha um historial de viagens ao estrangeiro (423).

Não obstante os surtos mencionados, nos últimos anos, os vários estudos realizados em toda a Europa, relataram apenas casos isolados de *C. auris* em unidades hospitalares, mesmo durante a pandemia de SARS-CoV-2 (181, 396, 402, 424-426).

A escolha da área geográfica deste estudo, foi feita em função da densidade populacional, sendo a coorte de doentes do serviço de medicina intensiva os que contemplam os principais factores de risco intrínsecos e extrínsecos para a colonização/infeção por esta levedura. A nível mundial, foram definidos os indivíduos potencialmente em risco de colonização por *C. auris* e incluem doentes: admitidos nos hospitais do estudo com hospitalização recente fora do país; admitidos nos hospitais do

estudo com viagens recentes ao subcontinente indiano sem hospitalização; internados ou em ambulatório colonizados ou infetados por bactérias produtoras de carbapenemases (CPO); internados em unidades hospitalares associadas ao uso intensivo de antifúngicos; e contactos hospitalares de um caso índice de *C. auris* (177, 231, 232).

De acordo com informações retiradas do inquérito epidemiológico realizado no momento da admissão nas UCI, a coorte de doentes estudada não inclui nenhum dos factores de risco mencionados para colonização por *C. auris*, o que espelha os resultados obtidos neste estudo. Ainda assim, um estudo prospetivo com 488 doentes canadianos com risco potencial de colonização por *C. auris* mostrou uma prevalência baixa (0,4%). *C. auris* só foi identificada em doentes que estavam colonizados/infetados com CPO e que tinham recebido recentemente cuidados de saúde em regime de internamento no subcontinente indiano (427). Contrariamente, os relatórios dos Estados Unidos revelaram uma presença contínua de *C. auris* dos diferentes *clades* em unidades de cuidados de saúde de diversos estados (316, 386, 405, 428). Não obstante, o estudo recente de Rowlands e colaboradores evidenciou que os doentes admitidos em unidades de ventilação ou sob ventilação assistida em UCI apresentavam um risco mais elevado para colonização por *C. auris*. Porém, na coorte em estudo, 31,1% (210/675) dos doentes em UCI estavam sob ventilação assistida, mas a colonização foi sobretudo por *C. albicans*.

Evolução clínica dos doentes

Apesar dos resultados desta investigação serem de isolados colonizadores e não de responsáveis por infeção nosocomial, a colonização e a infeção são dificilmente distinguíveis na história natural da infeção fúngica (8). A distinção entre doentes colonizados que não necessitam de tratamento e aqueles propensos a desenvolver infeção invasiva foi identificada como um desafio clínico difícil no campo das doenças infecciosas há mais de 40 anos (350). Num estudo realizado por Garcia-Bustos e colaboradores, foi desenvolvido e validado um modelo preditivo de infeção em doentes em estado crítico colonizados, através de uma abordagem prospetiva, criando uma equação que poderia ajudar a prever o risco estimado de candidemia, dependente dos factores de risco presentes (232). Assim, a NP (OR ajustado 3,73), cirurgia prévia (OR ajustado 1,03), sépsis (OR ajustado 1,75), exposição prévia a antifúngicos (OR ajustado 1,17), cateteres

arteriais (OR ajustado 1,46), cateteres venosos centrais (OR ajustado 1,21), doença renal crónica avançada (OR ajustado de 1,35) e colonização multifocal (OR ajustado de colonização unifocal de 0,46) provaram ser preditores independentes de candidemia (232).

Neste estudo observacional, não foi possível estabelecer a relação entre o risco de infeção confirmada e o valor do índice de colonização, referido anteriormente por Eggimann e Pittet 2014, uma vez que está além dos objetivos propostos (350). No entanto, para a UCI do HBA os dados adicionais disponibilizados permitiram associar *C. albicans* a um maior índice de mortalidade, com diferença estatística entre admissão e tempo de permanência na UCI (D1, $p=0,008$ e D8, $p=0,031$), o que é consistente com as observações de outros estudos que validaram o valor da incidência de colonização por *Candida* (27, 58, 350, 414, 418). Igualmente para toda a coorte, foi possível associar a colonização por *C. albicans* com neoplasia hematológica ($p=0,037$) e hemodiálise ($p=0,033$). Efetivamente, *C. albicans* é a principal causa de CI em todo o mundo, exceto na Índia (88) e, ao longo do processo de infeção, utiliza múltiplos factores de virulência.

No entanto, existe uma limitação, uma vez que não foi disponibilizado para este estudo se a CI/candidemia foi a única razão, contribuiu ou não contribuiu para a morte nesta coorte de doentes. Com os dados clínicos disponíveis, não há informação suficiente para concluir se a colonização por *Candida* spp. aumenta a probabilidade de desenvolver candidemia ou infeção invasiva. No entanto, foi identificada uma associação significativa entre a colonização por *Candida* spp. e um pior prognóstico a três meses.

Embora as contagens elevadas de UFC possam indicar um aumento da colonização, não estão necessariamente associadas ao resultado clínico, uma vez que outros factores, como a imunidade do hospedeiro e as condições médicas subjacentes, também desempenham um papel importante. Porém, estes resultados são discordantes de estudos anteriores (65, 350). Uma das razões para essa discrepância é que os resultados se referem exclusivamente às taxas de colonização axilar e inguinal. Estudos prévios têm reconhecido a colonização de múltiplos locais do organismo humano como um importante factor de risco para infeção, assim como, foi avançada a hipótese de que o significado clínico da colonização é dependente do local no organismo (31, 414, 429). Assim, foi mostrado que a colonização das vias urinárias e do reto foi mais valiosa para monitorizar a infeção invasiva por *Candida* em comparação com a colonização

respiratória e cutânea na UCI (429). Porém, estudos mais recentes já destacaram a contribuição da microbiota pulmonar para o desenvolvimento e evolução das doenças fúngicas respiratórias (430).

No decorrer desta investigação podem ser referidas algumas limitações, nomeadamente, as conclusões clínicas e epidemiológicas basearem-se em isolados colonizadores e o estudo ter sido fundamentado apenas em uma amostra combinada de dois locais séticos. O foco da investigação foi nas espécies de *Candida*, *C. auris* e *C. parapsilosis*, prevalentes em amostras superficiais (pele) e identificadas como contribuintes significativos para episódios e surtos nosocomiais, especialmente em UCI (7). Ao identificar estes agentes patogénicos numa fase inicial, as unidades de cuidados de saúde podem implementar medidas de controlo de infeções adequadas para evitar a propagação destas estirpes resistentes e mitigar o risco de infeções nosocomiais (151, 397).

Por outro lado, apresentou uma franca limitação no que se refere à amostra populacional das duas UCI do HFF. Pelo carácter inerente à natureza do estudo que teve início efetivo em janeiro de 2020, este foi suspenso por questões de saúde pública (pandemia COVID-19) no final de março do mesmo ano, não voltando a ser retomado.

Relativamente à UCI do HBA, os consentimentos foram dados para o estudo ser efetuado durante um período de dois anos com vista à obtenção de uma amostra populacional representativa das admissões no serviço. Assim, este estudo teve início em setembro de 2021 com previsão para terminar em 2023. Porém, face à transição desta unidade hospitalar da esfera público-privada, exclusivamente para a pública, os recursos humanos envolvidos no projeto de investigação ficaram comprometidos. Por conseguinte, o diretor do Serviço de Medicina Intensiva (SMI) do HBA comunicou no final de 2022 que não estavam reunidas as condições para a continuação deste estudo observacional. Face ao exposto, não foi possível obter uma amostra em concordância com a amostra estimada em função de todos os objetivos associados a esta investigação. Da mesma forma, quando se procede à comparação entre as UCI das diferentes unidades hospitalares, está associado um viés relativo à dimensão de cada coorte aquando da inferência estatística.

5. Caracterização do microbioma da pele em doentes internados em unidades de cuidados intensivos

5.1 Introdução

Embora o microbioma da pele seja predominantemente bacteriano, os fungos desempenham funções essenciais no desenvolvimento, manutenção e reparação da pele (354).

O micobioma da pele humana é composto por uma comunidade diversificada e dinâmica de fungos, cuja distribuição depende das características ambientais das diferentes zonas da pele. Em áreas húmidas, secas e sebáceas, condições como humidade, presença de gordura ou exposição ao ar favorecem a multiplicação de determinados tipos de fungos. Estas determinantes, que moldam as comunidades fúngicas, são relativamente constantes entre indivíduos, o que resulta em perfis semelhantes de fungos em zonas com características ambientais semelhantes, independentemente do indivíduo (431). A composição do micobioma cutâneo "fisiológico" varia não só consoante os locais do organismo humano (431, 432), mas também pode ser influenciada por vários factores, como a idade (433), a etnia (22), o sexo e o estilo de vida (431, 433, 434).

Com o desenvolvimento das tecnologias ómicas, nomeadamente a metagenómica, tornou-se evidente que a micobiota da pele contém um espectro mais diversificado de comunidades fúngicas do que se pensava anteriormente (432, 435). O desenvolvimento adicional de tecnologias de inteligência artificial permitiu uma análise sofisticada de dados metagenómicos e físicos, permitindo inferências sobre a relação causal entre a hidratação da pele, a idade e os hábitos tabágicos com a composição do micobioma e a variação entre indivíduos (436).

A sequenciação do amplicão da região ITS tem sido sugerida como um método fiável e relativamente rápido para analisar o micobioma, sendo eficaz até mesmo em amostras de baixa biomassa, como é comum em amostras da pele (437). Esta metodologia revelou que o micobioma da pele em hospedeiros saudáveis é um sistema complexo e dinâmico cujas comunidades fúngicas pertencem principalmente aos filos Ascomycota (91,22%) e Basidiomycota (4,34%) (35, 434). No micobioma humano, foram identificadas 323 espécies fúngicas patogénicas pertencentes ao filo Ascomycota, com destaque para os géneros *Aspergillus*, *Candida*, *Coccidioides*, *Fusarium* e *Pneumocystis*. Para o filo Basidiomycota, foram reconhecidas 43 espécies com potencial patogénico, predominantemente dos géneros *Malassezia*, *Cryptococcus* e *Trichosporon* (35).

Num indivíduo saudável, o segmento fúngico do microbioma cutâneo é distinto, sendo as espécies do género *Malassezia* predominantes em todos os locais anatómicos (face, braço, mão, axila, região inguinal, costas, couro cabeludo, dedos dos pés e mãos) (20). A sua abundância relativa é mais elevada nas zonas sebáceas devido ao facto de *Malassezia* spp. não possuir a sintetase de ácidos gordos, tornando-as dependentes da decomposição de gorduras exógenas para a sua própria síntese de lípidos (49, 433). A falta de diversidade sugere que a pele pode constituir um nicho único para este género de fungos e que *Malassezia* spp. pode competir eficazmente com outros fungos neste ecossistema. No entanto, nas zonas superficiais ricas em glândulas sebáceas, a composição do micobioma é composta não só pelo género *Malassezia*, mas também pelos géneros *Candida* e *Rhodotorula* (20, 22) (Fig. 5.1).

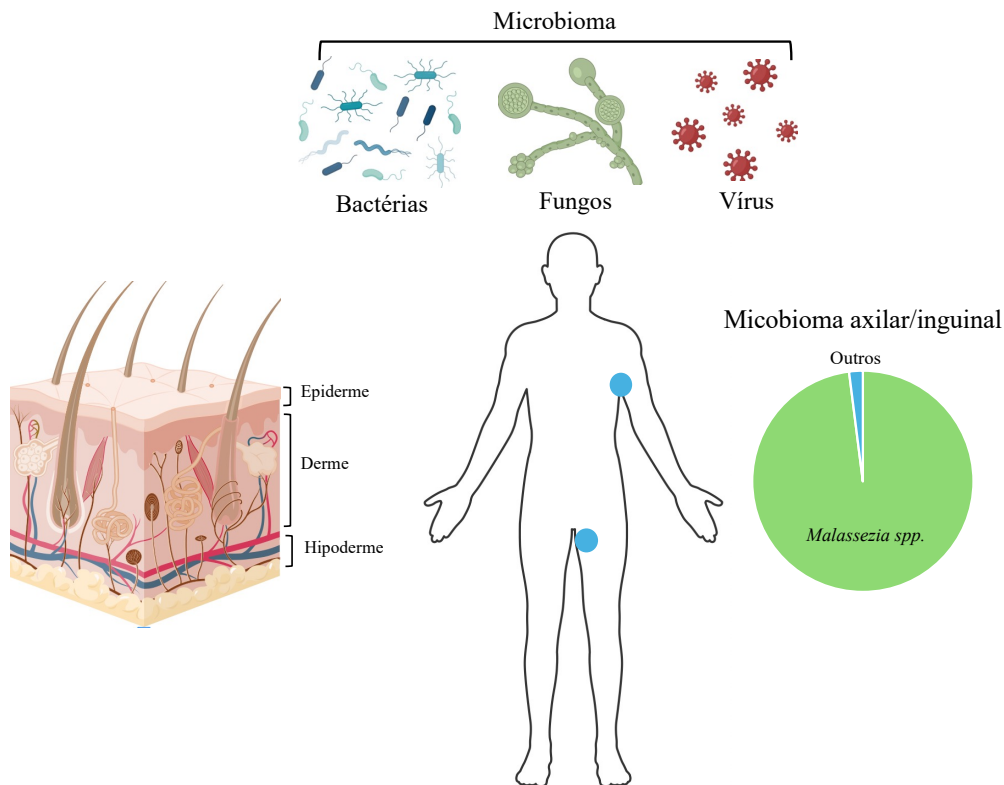


Figura 5.1. Estrutura e diversidade microbiana da pele saudável nas regiões axilar e inguinal do corpo humano. O gráfico representa a abundância de géneros fúngicos, adaptado de vários estudos (21, 344, 354). (Figura criada pelo autor).

Tuor e colaboradores, sugeriram que as alterações nas condições num ambiente específico podem causar uma desregulação do microbioma da pele, predispondo os indivíduos a infeções fúngicas (354). Estudos prévios, mostraram igualmente uma associação entre a disbiose fúngica da pele e doenças cutâneas comuns, como a caspa, a dermatite atópica e a pitíriase versicolor (438-440). Estes estudos destacaram a importância do microbioma da pele no estado de saúde do hospedeiro e a necessidade de mais investigações para entender o seu papel na patogénese humana.

Os doentes internados em UCI frequentemente enfrentam um risco elevado de infeções fúngicas devido a factores predisponentes, já referidos no Capítulo 1, como a imunossupressão, a hospitalização prolongada, ou os procedimentos invasivos (358). A compreensão do microbioma da pele nestes doentes pode fornecer informações valiosas sobre possíveis fontes de agentes patogénicos fúngicos e auxiliar nas estratégias de controlo de infeções. Apesar de estudos prévios terem observado que o microbioma cutâneo em doentes internados em UCI caracteriza-se por disbiose, com uma perda de especificidade local, ainda não é claro se o microbioma da pele é um marcador da doença subjacente, do tratamento na UCI ou se contribui para um mau resultado clínico (345).

Por conseguinte, torna-se relevante conhecer a composição do microbioma da pele nos doentes em UCI e se a sua diversidade e abundância relativa varia com a permanência na unidade. A compreensão destas eventuais alterações fornecerá potenciais informações sobre a forma como o hospedeiro humano resiste à colonização de potenciais invasores fúngicos.

5.2 Objetivos

Objetivo geral

- Determinar a composição do microbioma da pele em doentes em ambiente nosocomial de cuidados intensivos.

Objetivos específicos

- Caracterizar o microbioma num grupo de doentes monitorizados na admissão (D1) e ao oitavo dia (D8) de permanência na UCI;
- Identificar a abundância relativa dos grupos taxonómicos (Filo, Género e Espécie) da comunidade fúngica em amostras cutâneas de doentes em UCI;
- Comparar a diversidade e abundância de espécies da micobiota e microbioma em amostras do mesmo doente colhidas em D1 e D8.

5.3 Material e Métodos

5.3.1 Amostra

Para a avaliação do microbioma foram utilizadas amostras de exsudados combinados das regiões intertriginosas axilar e inguinal, provenientes de 50 doentes internados em UCI no Hospital Beatriz Ângelo com colheitas na admissão (D1) e ao oitavo dia de permanência na UCI (D8) entre 2021 e 2022. Na totalidade foram utilizadas 100 amostras, 50 em D1 e 50 em D8, tendo sido criados dois grupos de estudo (D1 e D8).

Dos 50 doentes, foram seleccionados 44 doentes que tinham pelo menos um dos factores de risco relevantes para colonização ou infeção fúngica em ambiente de UCI, conforme descrito na literatura (5, 92, 441). Assim, foram seleccionados os doentes que estavam sob antibioticoterapia, sob ventilação assistida, com cateter venoso central e doentes diabéticos. Os restantes 6 doentes não apresentavam estes factores de risco (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Caracterização dos factores de risco da coorte seleccionada para o estudo do microbioma.

Factores de risco para colonização/infeção fúngica	Coorte n= 50 (%)
Ventilação assistida	22 (44,0)
DMII	20 (40,0)
Antibioterapia	31 (62,0)
Cateter Venoso Central (CVC)	28 (56,0)
Outros factores de risco*	6 (12,0)

* Doença cardiovascular, infeção da pele, cateter vesical e COVID-19.

5.3.2 Fluxograma

O fluxograma incluiu a preparação da amostra, a purificação, a preparação da biblioteca, a sequenciação e a análise bioinformática subsequente (Fig. 5.2). Para manter a precisão e a fiabilidade foi efetuado um controlo de qualidade (CQ) em cada etapa do procedimento.

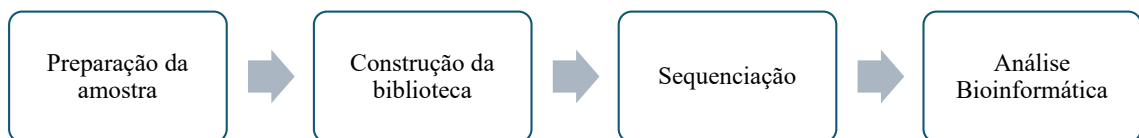


Figura 5.2. Fluxograma utilizado para o estudo do microbioma fúngico. Na preparação da amostra, uma mistura heterogénea de DNA genómico é extraída. Os *primers* foram desenhados para regiões específicas do gene *ITS2* permitindo a construção da biblioteca. Os produtos de PCR são sequenciados, e as sequências de baixa qualidade removidas. Várias análises são efetuadas incluindo a análise taxonómica, filogenética e a análise da composição, estrutura e diversidade da comunidade fúngica.

5.3.2.1 Preparação da amostra

As zaragatoas bilaterais combinadas da região axilar/inguinal em meio líquido de Amies foram previamente submetidas a agitação mecânica forte. O DNA foi extraído com o kit NZY Soil gDNA Isolation® (NZYTech) de acordo com as instruções do fabricante (Anexo 6, 9.2.3.4). As concentrações finais de DNA foram determinadas espectrofotometricamente através do equipamento Nano Drop ND-1000® (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA).

Para confirmar a quantidade e qualidade da amostra de DNA, foi também efetuado um PCR panfúngico. A reação de PCR foi otimizada a partir da descrita por Lau e colaboradores, tendo sido efetuada num volume de 25 µL constituído por uma mistura de

reação comercializada NZYTaq II 2x Master Mix® (NZYTech) que contém todos os componentes necessários para a reação de amplificação com exceção dos *primers* (enzima NZYTaq II DNA polymerase, dNTPs, tampões, MgCl₂ a 2,5mM). Os *primers* utilizados para as regiões ITS1 e ITS2 foram descritos por Lau e colaboradores e produzidos pela StabVida, Caparica, Portugal (251). A amplificação foi efetuada num termociclador T100® (Bio-Rad Laboratories, Inc.) com as condições de amplificação seguintes: 95°C durante 10 min, seguidos de 60 ciclos de 94°C durante 15s, 55°C durante 30s e 72°C durante 30s, e uma extensão final a 72°C durante 5 min. A qualidade do DNA foi avaliada por separação eletroforética e visualizado num transiluminador UV. O protocolo experimental efetuado para preparação da amostra está descrito no Capítulo 9 no Protocolo experimental de sequenciação da região ITS2 e análise bioinformática ponto 9.2.6. As amostras foram armazenadas a -20°C e enviadas para sequenciação na Novogene® UK, *Cambridge Sequencing Center*.

A determinação da concentração e qualidade do DNA foi novamente aferida e emitido um relatório de controlo de qualidade pela Novogene®. A concentração do DNA genómico extraído foi medida usando o Qubit 2.0, e a qualidade do DNA foi verificada por eletroforese em gel (Anexo 9, 9.2.6).

5.3.2.2 Construção da biblioteca e sequenciação

Atualmente, a região ITS é a mais sequenciada em estudos de ecologia molecular de fungos e é considerada como a sequência universal para estes organismos, com anotações detalhadas disponíveis na base de dados *User-friendly Nordic ITS Ectomycorrhiza Database* (UNITE) e *International Nucleotide Sequence Database Collaboration* (INSDC). A zona a amplificar correspondeu à zona de espaço de transcrição interna, ITS2 do DNA ribossómico (Tabela 5.2) (437).

Tabela 5.2. *Primers* utilizados na reação de amplificação em cadeia (PCR) (Adaptado de 437).

Região amplificada	Tamanho do fragmento	<i>Primers</i>	Sequências (5'-3')
ITS2	380pb	ITS3-2024F ITS4-2409R	GCATCGATGAAGAACGCAGC, TCCTCCGCTTATTGATATGC

As reações de PCR foram realizadas utilizando 200 ng de DNA com conjuntos de *primers* específicos para as regiões hipervariáveis ITS3-2024F e ITS4-2409R, que incluíam códigos de barras únicos. Os produtos da PCR foram separados em géis e os fragmentos com o tamanho de amplificação adequado foram extraídos e purificados. De uma forma sumarizada, a biblioteca foi verificada com Qubit e PCR em tempo real para quantificação. A mesma quantidade de produtos de PCR de cada amostra foi agrupada, reparada nas extremidades e ligada com adaptadores Illumina. As bibliotecas quantificadas foram agrupadas e sequenciadas numa plataforma Illumina Miseq para gerar leituras brutas de extremidade emparelhada de 250 pb (2×250 pb). Os procedimentos experimentais de preparação da biblioteca de DNA são apresentados na Figura 5.3 (Anexo 10, 9.2.7).

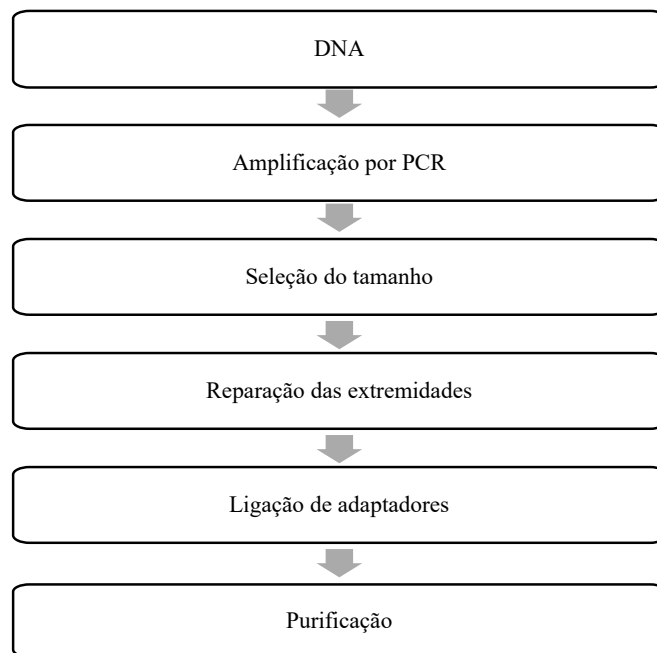


Figura 5.3. Fluxograma para a construção da biblioteca.

5.3.2.3 *Análise bioinformática*

Após a sequenciação, existe uma certa proporção de "dados sujos" nos dados brutos obtidos. Com a finalidade de tornar os resultados da análise da informação mais precisos e fiáveis, os dados brutos foram primeiro fundidos e filtrados para obter dados limpos. Em seguida, procedeu-se ao agrupamento das unidades taxonómicas operacionais (OTU) com base nos dados efetivos. De acordo com os resultados do agrupamento das OTU, foi

feita uma anotação taxonómica para a sequência representativa de cada OTU, a fim de obter a informação sobre os taxos correspondentes e a distribuição da sua abundância. A base de dados utilizada foi a UNITE versão 9.0.

Simultaneamente, as OTU foram analisadas para análise da diversidade alfa e beta, para obter informações sobre a riqueza e a uniformidade das amostras, informações sobre OTU comuns e únicas entre diferentes amostras e grupos. Os resultados da agregação de OTU permitiram ainda efetuar alinhamentos de sequências múltiplas e construir árvores filogenéticas. As diferenças entre amostras ou entre grupos relativamente às estruturas da comunidade microbiana são explicadas através da redução da dimensão (PCoA, PCA e NMDS) e UPGMA. Os métodos estatísticos, como o teste T, MetaStat, LEfSe, ANOSIM e MRPP, permitiram testar a importância da estrutura das diferenças da comunidade microbiana entre grupos. O fluxo de trabalho da análise de dados encontra-se ilustrado na Figura 5.4.

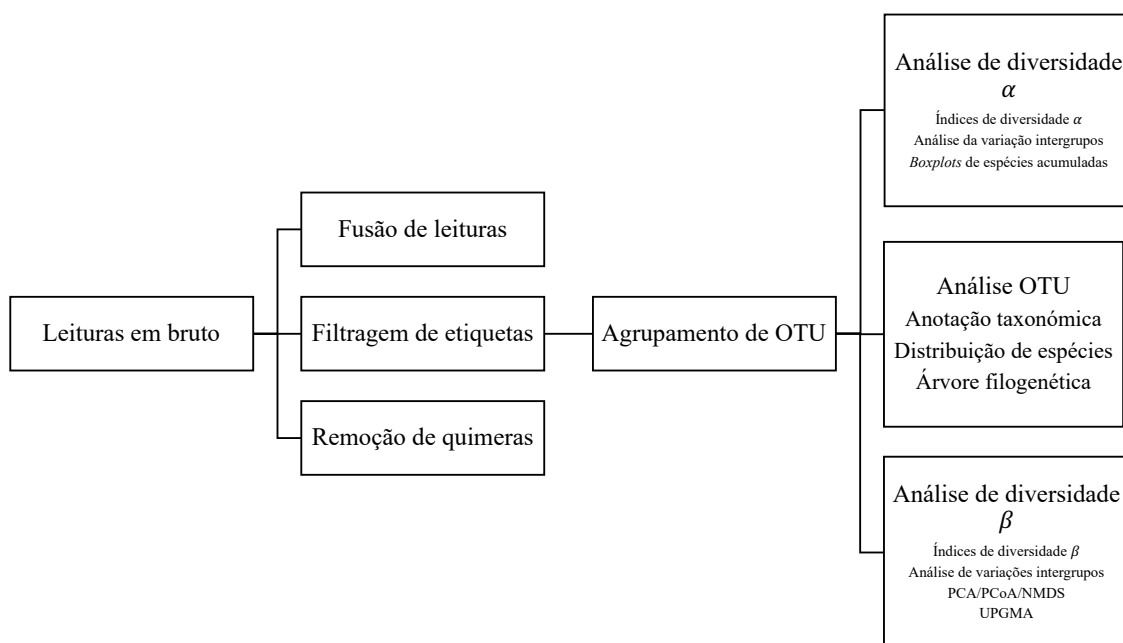


Figura 5.4. Fluxograma para a análise bioinformática.

A diversidade alfa refere-se à análise da diversidade e riqueza das espécies fúngicas dentro de uma única amostra, e pode indicar a variedade e a abundância de espécies dentro de uma comunidade microbiana específica (442). A diversidade alfa foi determinada através dos índices, Espécies observadas, Chao1, Shannon and Simpson. Todos estes índices foram calculados com o QIIME (Versão 1.9.1) e apresentados com o software R

(Versão 4.0.3). O índice Chao foi selecionado para identificar a riqueza da comunidade. Os índices de Shannon e Simpson foram utilizados para identificar a diversidade da comunidade.

A diversidade beta trata-se de uma análise comparativa da composição da comunidade microbiana entre duas ou mais amostras. Esta análise permite a compreensão de como o microbioma difere em função de diferentes factores, como a idade, patologia subjacente, ou terapêutica. Para medir a beta diversidade pode utilizar-se a distância de Bray-Curtis e UniFrac. As diferenças entre as várias amostras (grupos) são encontradas através da análise da diferença entre grupos do índice de diversidade beta e de métodos estatísticos multivariados, como a análise de componentes principais (PCA) e a análise de coordenadas principais (PCoA) (443). Algumas das vantagens dos índices de diversidade é a possibilidade de concentrar numa mesma medida, duas métricas da comunidade (riqueza e uniformidade) permitindo expressar estatisticamente esses atributos comunitários (Anexo 10, 9.2.7).

Para estudar a proximidade genética entre as diferentes amostras, foi utilizada a análise de agrupamento para construir uma árvore filogenética. O método *Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) é um método de agrupamento hierárquico muito utilizado para classificar e organizar amostras com base nas suas semelhanças. (442). As ideias básicas do UPGMA compreendem em primeiro lugar que as amostras com a distância mais próxima sejam agrupadas para formar um novo nó (como uma nova amostra). O seu ponto de ramificação está a 1/2 das duas amostras originais. Em seguida, a distância média entre a “amostra” recém-criada e as outras amostras é calculada e as duas amostras mais próximas podem ser encontradas novamente para repetir os passos anteriores. Quando todas as amostras estiverem agrupadas é possível obter um dendograma (Anexo 10, 9.2.7).

5.3.2.4 Análise estatística

Para a análises dos dados, foram efetuadas análises estatísticas que incluem os testes ANOSIM e T-test, para revelar a diferenciação da estrutura da comunidade.

A análise ANOSIM, trata-se de um teste não paramétrico que analisa a diferença entre grupos de dados de elevada dimensão. Ambas, têm por objetivo testar se as diferenças

entre grupos são significativamente maiores do que as diferenças dentro do grupo, o que pode determinar se o agrupamento é significativo. Todas as determinações foram efetuadas com o *software* *vegan* e o *software* *ggplot2* do R.

5.4 Resultados

5.4.1 Controlo de qualidade da amostra

Após a verificação da quantidade e qualidade da amostra, foram excluídas duas amostras. Os resultados obtidos após amplificação estão ilustrados na Figura 5.5. Por conseguinte, foram enviadas para sequenciação 98 amostras.

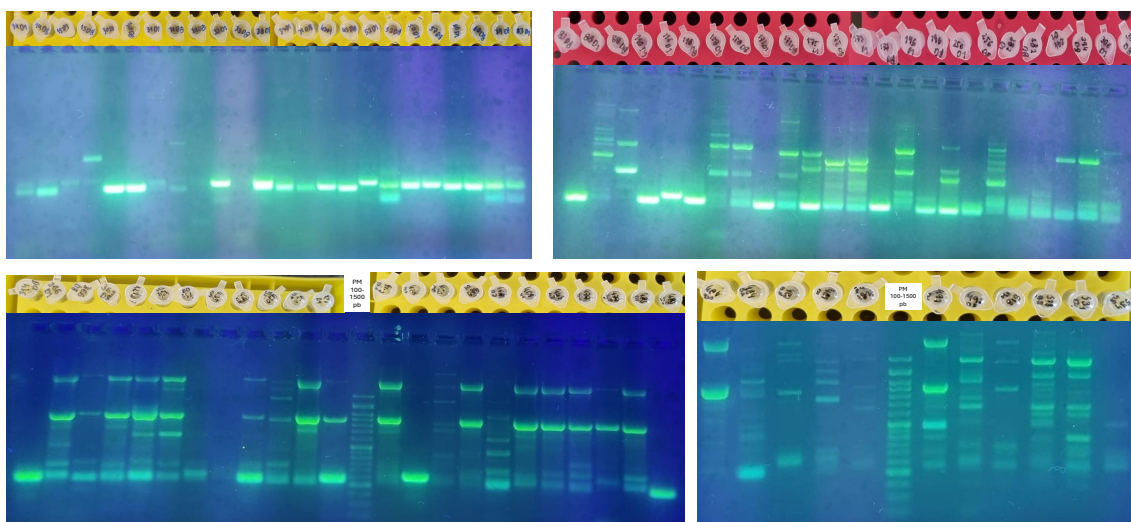


Figura 5.5. Perfis eletroforéticos dos produtos amplificados por PCR com *primers* para as regiões ITS1 e ITS2, visualizados em gel de agarose corado com marcador de DNA fluorescente (*greensafe*). As imagens confirmam a presença e a qualidade do DNA amplificado, com bandas correspondendo a diferentes tamanhos moleculares. PM- marcador de peso molecular de 50-1500 pb NZYDNA Ladder VI® (NZYTech, Lisboa, Portugal).

Após a verificação pelo CQ da empresa responsável pela sequenciação (Novogene®), a amostragem ficou limitada a 56 amostras sendo 42 amostras colhidas de 21 doentes em D1 e D8, conforme o fluxograma apresentado na Figura 5.6.

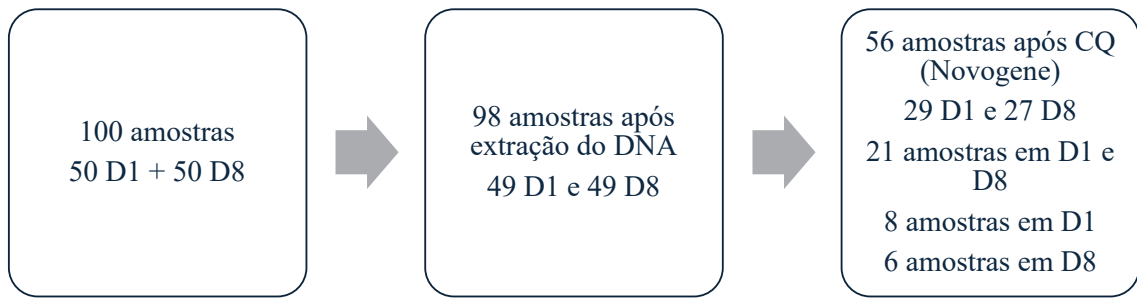


Figura 5.6. Total de amostras aprovadas para sequenciação.

5.4.2 Caracterização da coorte de doentes

Nesta coorte de doentes, 71,4% são do sexo masculino. A média de idades dos 35 doentes foi de 62 anos com uma variação de 39 a 90 anos. O índice APACHE apresentou uma média de 14,8 (apenas disponibilizado pela equipa clínica para 22 doentes). A caracterização clínica completa da coorte está descrita na Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Perfil clínico dos doentes com amostras sequenciadas.

Características clínicas	Coorte n= 35 (%)
Ventilação assistida	7 (20,0)
DMII	10 (28,6)
Antibioterapia	23 (65,7)
Cateter Venoso Central (CVC)	14 (40,0)
Outros factores de risco*	3 (8,6)

* Doença cardiovascular, infeção da pele, cateter vesical e COVID-19.

5.4.3 Processamento dos dados de sequenciação

O amplicão foi sequenciado na plataforma Illumina *paired-end* para gerar leituras brutas de 250 pb *paired-end* (Raw PE), sendo depois fundidas e pré-tratadas para obter *Clean Tags*. As sequências quiméricas nos *Clean Tags* foram detetadas e removidas para obter os *Effective Tags* que foram utilizados para análise subsequente.

Pré-processamento de sequências

Foi recolhido um total de 4.115,291 leituras (média $\pm$ DP: 73.487 ± 24.481), utilizando *primers* ITS2. As contagens totais de leituras não quiméricas foram de 70.722 ± 23.842 para os *primers* ITS2 e as contagens mínimas foram de 27.916.

5.4.4 Identificação e anotação taxonómica

Com a finalidade de estudar a composição da comunidade fúngica em cada amostra, as OTU foram obtidas por agrupamento com 97% de identidade nas etiquetas efetivas de todas as amostras, sendo depois identificadas. A base de dados de anotação do projeto é a Unite v9.0. De acordo com os resultados da anotação de OTU, foram obtidas tabelas de abundância de espécies ao nível do reino, filo, classe, ordem, família, género e espécie. As OTU foram estimadas utilizando o QIIME1 (v1.9.1), resultando em 425 géneros de fungos e 577 espécies de fungos, com uma média de 80 táxons identificados por amostra (intervalo de 5 a 463).

5.4.4.1 Abundância relativa a nível taxonómico do filo, género e espécie

A composição do microbioma a nível taxonómico do filo revelou que 99,6% do microbioma pertence ao filo Ascomycota sendo apenas 0,4% referente ao filo Basidiomycota. De acordo com os resultados da anotação taxonómica, a abundância relativa dos 10 e 30 principais géneros fúngicos para cada amostra é ilustrada, respetivamente, nos histogramas das Figuras 5.7 e 5.8. É possível observar que o género *Candida* está representado em todas as amostras, com exceção de uma (S33), colhida em D1, cujo género predominante é *Penicillium*.

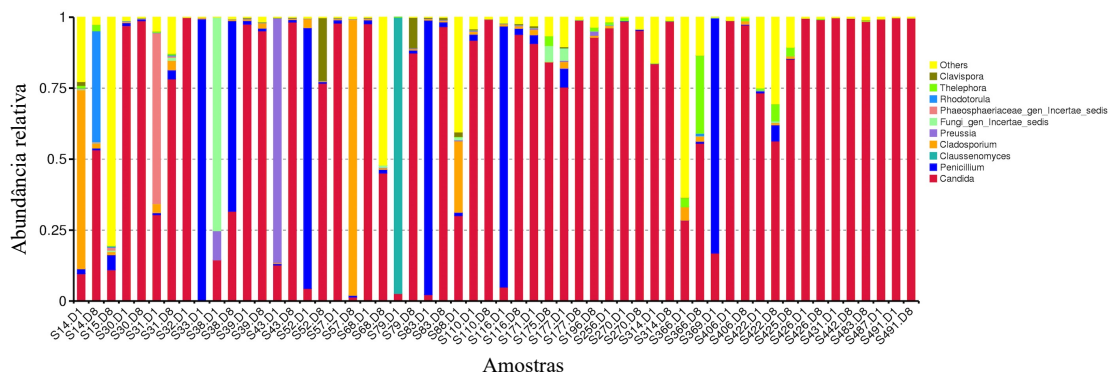


Figura 5.7. Abundância relativa dos 10 principais géneros fúngicos em cada amostra. “Outros” representa a abundância relativa total dos restantes géneros para além dos nomeados.

Para a abundância relativa dos 30 principais géneros fúngicos, é possível observar-se que as espécies do género *Candida* são prevalentes, mas refere-se igualmente a presença de espécies do género *Malassezia* (Fig. 5.8).

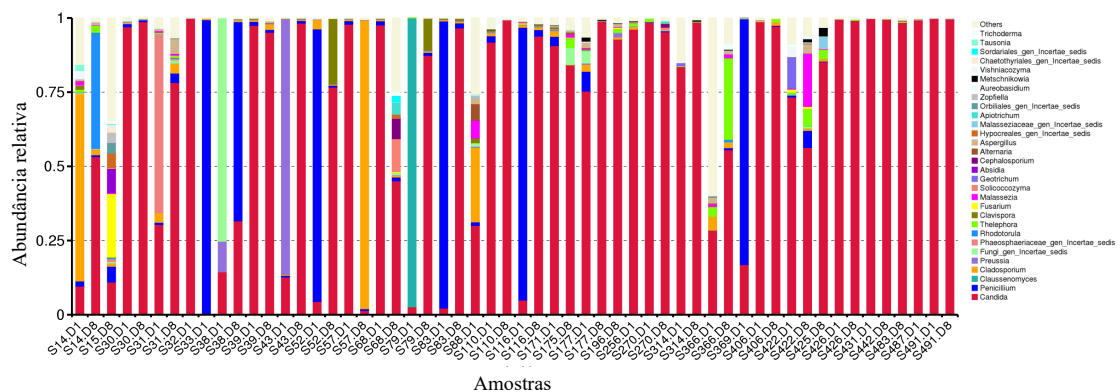


Figura 5.8. Abundância relativa dos 30 principais géneros fúngicos em cada amostra. “Outros” representa a abundância relativa total dos géneros restantes para além dos nomeados.

Quando se observa a abundância relativa por género fúngico na globalidade das amostras, a diversidade acima de 0,4% é baixa e torna-se ainda mais evidente o predomínio do género *Candida* (69,3%) em detrimento dos outros géneros (Fig.5.9).

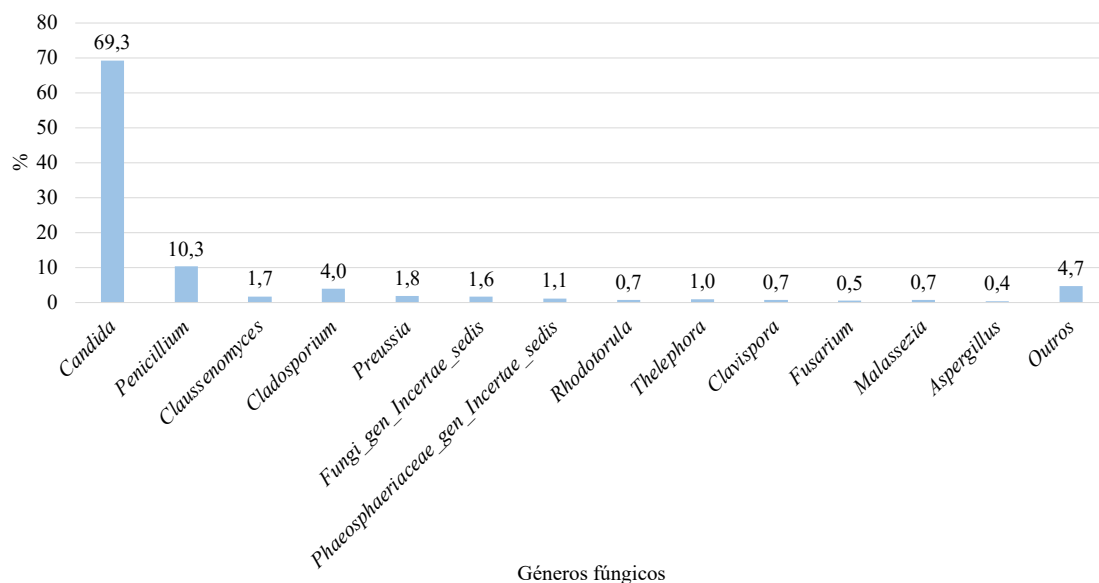


Figura 5.9. Média da abundância relativa (%) dos gêneros fúngicos presentes nas 56 amostras. “Outros” representa a abundância relativa total dos gêneros restantes para além dos nomeados.

Relativamente à abundância relativa das espécies, pode observar-se que *C. albicans* e *C. parapsilosis* estão presentes em simultâneo em 93% das amostras. Apenas para uma amostra (S483D8) se observou exclusivamente *C. albicans* (Fig. 5.10). Em D8, a espécie fúngica mais prevalente é *C. albicans* seguida por *C. parapsilosis*, ambas como espécies dominantes num microbioma que se apresenta com uma diversidade muito baixa.

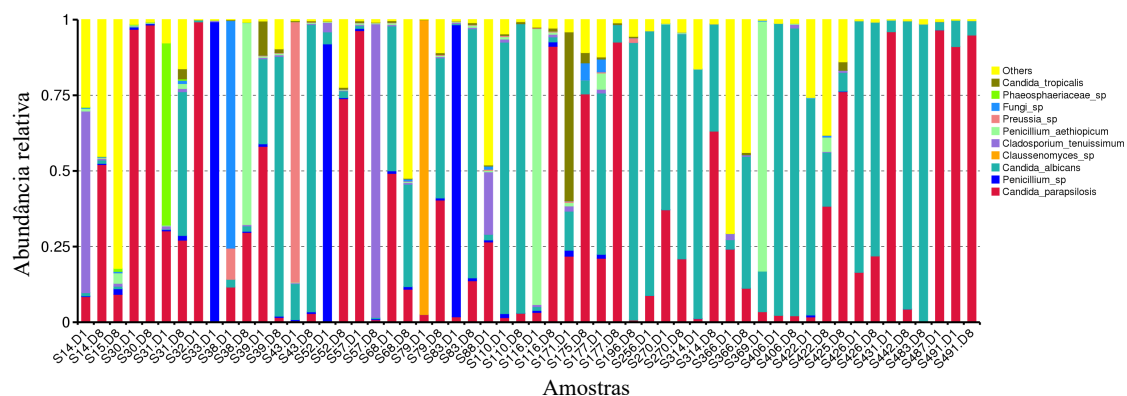


Figura 5.10. Abundância relativa das 10 principais espécies fúngicas em cada amostra. “Outros” representa a abundância relativa total das restantes espécies para além das nomeadas.

Quando se considera a média da abundância relativa das espécies fúngicas presentes no micobioma da totalidade das amostras, para valores superiores a 1,5% a diversidade não é elevada, sendo 67,5% do micobioma composto exclusivamente por *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Igualmente no que se refere à diversidade de espécies do género *Candida*, apenas os genomas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foram identificados (Fig. 5.11). No entanto, em menor abundância, foram também identificadas *C. lusitaniae*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. sake*.

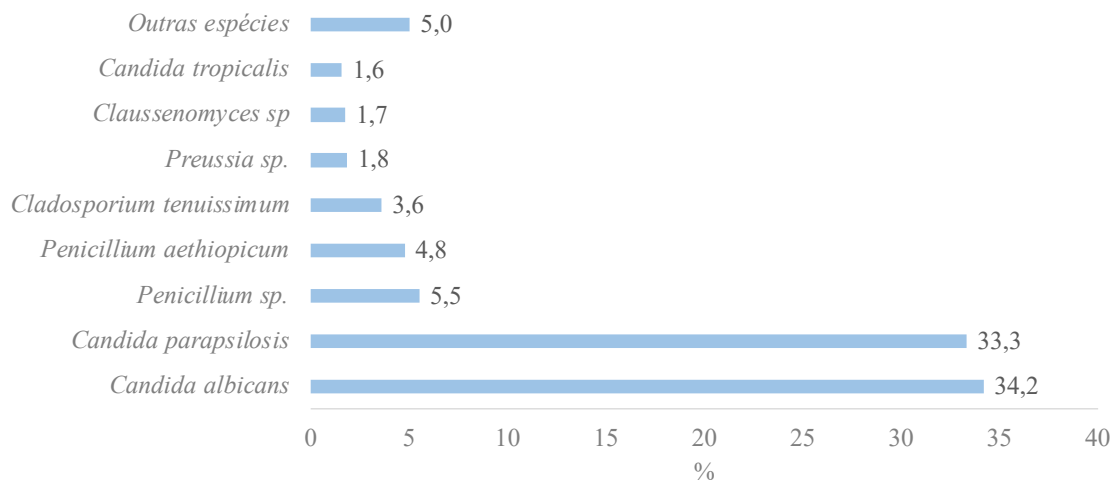


Figura 5.11. Média da abundância relativa (%) das espécies e géneros fúngicos presentes nas 56 amostras “Outras espécies” representa a abundância relativa total das restantes espécies para além das nomeadas.

Relativamente às espécies de *Malassezia*, todas foram detetadas abaixo de 1,5% e incluíram *M. restricta*, *M. globosa*, *M. sympodialis*, *M. arunalokei* e *M. dermatis*.

5.4.4.2 Diversidade e estrutura do micobioma em D1 e D8

Quando se pretendeu comparar o micobioma na admissão (D1) e após 8 dias de internamento na UCI (D8), observou-se um aumento da abundância relativa de *Candida* spp. e diminuição de *Penicillium* spp. (Fig. 5.12).

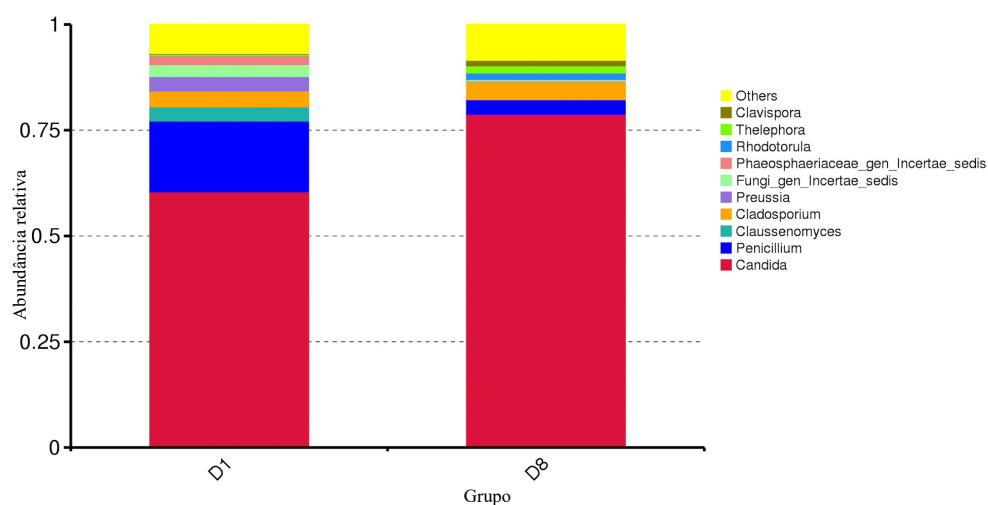


Figura 5.12. Abundância relativa dos 10 principais gêneros fúngicos na admissão (D1) e oitavo dia de permanência (D8) na UCI. “Outros” representa a abundância relativa total dos restantes gêneros para além dos nomeados.

A variação de espécies predominantes entre os dois grupos (D1 e D8) manifestou-se com o aumento de *C. albicans* seguido de *C. parapsilosis*. Pelo contrário para *C. tropicalis* observou-se uma descida. É de notar que no grupo D8 o microbioma é representado maioritariamente apenas por seis espécies fúngicas (Fig. 5.13).

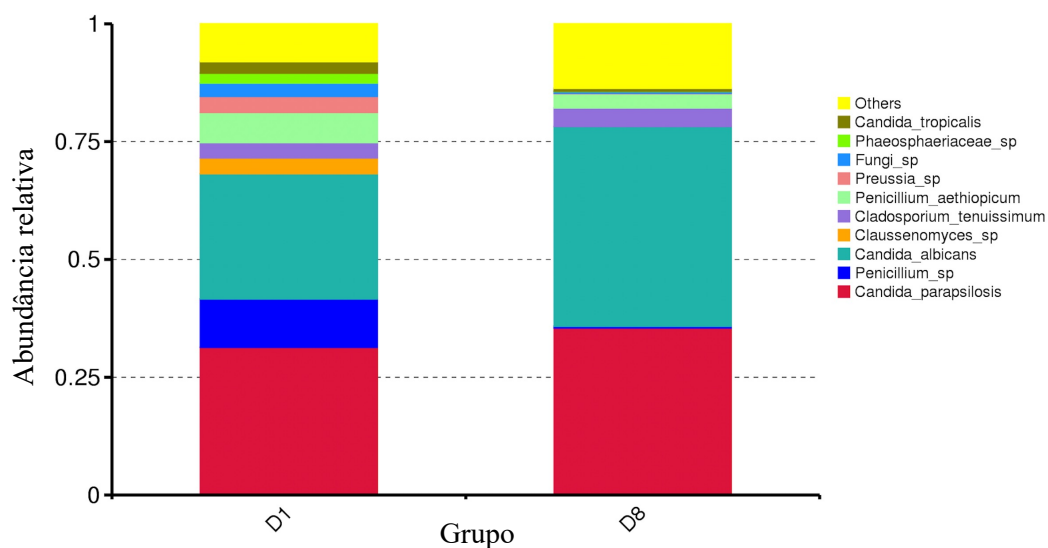


Figura 5.13. Abundância relativa das 10 principais espécies fúngicas na admissão (D1) e oitavo dia de permanência (D8) na UCI. “Outros” representa a abundância relativa total das restantes espécies para além das nomeadas.

Para estudar a relação filogenética dos géneros, foram seleccionados os 100 principais géneros e a árvore evolutiva foi desenhada utilizando as sequências representativas alinhadas. A abundância relativa de cada género também é evidenciada na Figura 5.14. Por conseguinte é possível observar o domínio do filo Ascomycota sendo os restantes géneros do filo Basidiomycota, nomeadamente o género *Malassezia*.

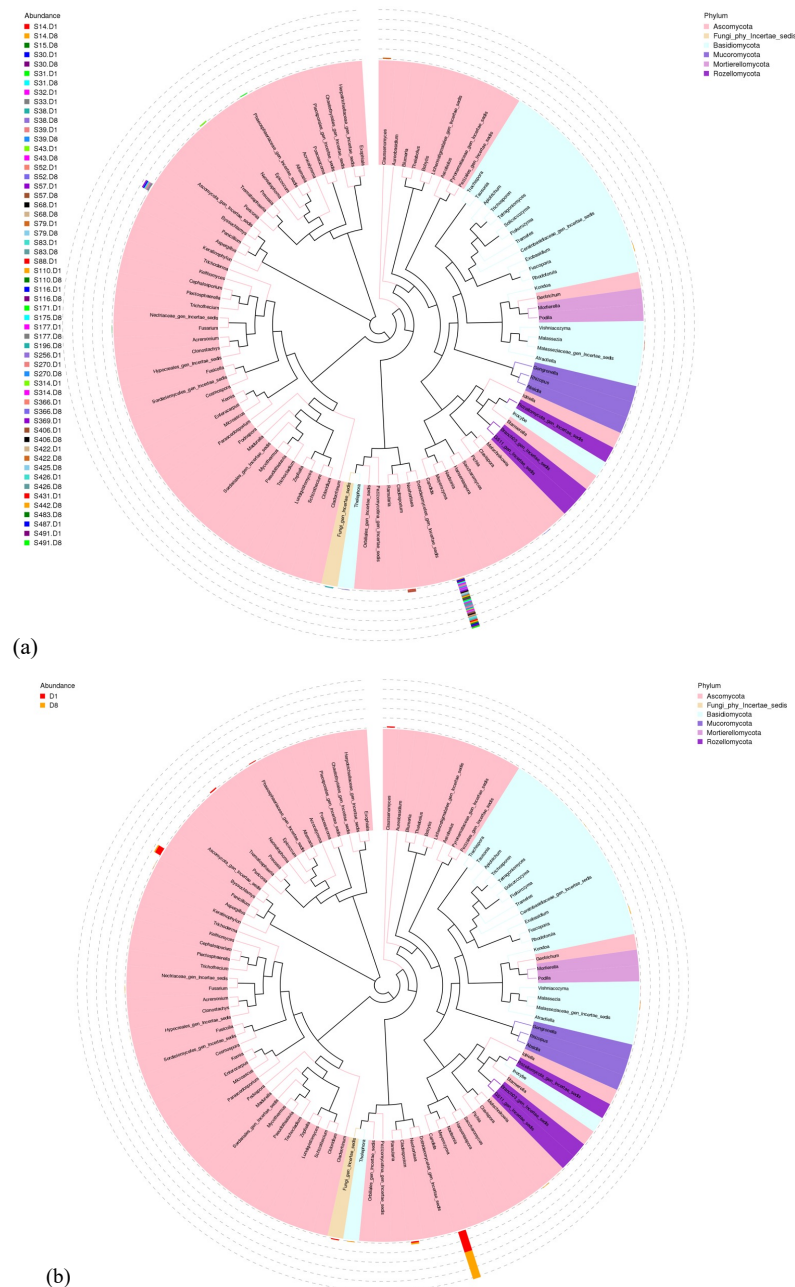


Figura 5.14. Árvore evolutiva por género: filos e abundância relativa nas amostras (a) e nos dois grupos em estudo (D1 e D8) (b). As cores dos ramos representam os diferentes filos. A abundância relativa de cada género em cada amostra e grupo é apresentada fora do círculo, com cores diferentes representando grupos distintos.

5.4.5 Micobiota vs Micobioma

Face ao conhecimento da micobiota para as amostras selecionadas para sequenciação, pretendeu-se efetuar a comparação da diversidade de espécies de *Candida* presentes. Por metodologias microbiológicas convencionais, foram detetadas 37 isolados de *Candida* spp. em 48 das 56 amostras (31 doentes). Não foram registadas culturas de outros fungos que não o género *Candida*, com os isolados distribuídos por *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (Tabela 5.4).

Em seis amostras (quatro doentes) as culturas fúngicas foram negativas e em dois doentes apenas uma das culturas foi positiva (S83D8 e S366D8) (Tabela 5.4). Os resultados da sequenciação mostraram concordância relativamente às espécies fúngicas identificadas previamente, mas evidenciaram outras espécies de *Candida*, embora estas últimas com menor abundância relativa (Tabela 5.4).

Tabela 5.4. Espécies de *Candida* presentes na micobiota e micobioma.

Amostra ¹	<i>Candida</i> spp. (cultura/MALDI-TOF MS)	<i>Candida</i> spp. identificadas por sequenciação
S14.D1/D8	Negativo	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. glabrata</i>
S15.D8	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. lusitaniae</i>
S30.D1/D8	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. lusitaniae</i>
S31.D1/D8	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. lusitaniae</i>
S32.D1	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i>
S33.D1	Negativo	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i>
S38.D1 ² /D8 ³	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i>
S39.D1 ³ /D8 ³	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. lusitaniae</i>
S43.D1/D8	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. lusitaniae</i>
S52.D1/D8	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. lusitaniae</i>
S57.D1/D8	<i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. lusitaniae</i>
S68.D1/D8	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. sake</i>
S79.D1/D8	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. lusitaniae</i>
S83.D1 ⁴ /D8	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. lusitaniae</i>
S88.D1	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. guilliermondii</i>
S110.D1/D8	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. lusitaniae</i>
S116.D1/D8	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. lusitaniae</i>
S171.D1	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. guilliermondii</i>
S175.D8	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i>
S177.D1/D8	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. lusitaniae</i>
S196.D8	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. lusitaniae</i>
S256.D1	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. lusitaniae</i>
S270.D1 ² /D8 ³	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i>
S314.D1/D8	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. lusitaniae</i>
S366.D1 ⁴ /D8	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. guilliermondii</i>
S369.D1	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i>
S406.D1/D8	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i>
S422.D1/D8	Negativo	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i>
S425.D8	Negativo	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. lusitaniae</i>
S426.D1/D8	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i>
S431.D1	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i>
S442.D8	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i>
S483.D8	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. lusitaniae</i>
S487.D1	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i>
S491.D1/D8	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i>

¹ Zaragatoa combinada região axilar/inguinal. ² Apenas *C. albicans* isolada. ³ Presença de cultura mista com *C. albicans*.

⁴ Cultura negativa.

No entanto, foram identificados por sequenciação géneros de fungos leveduriformes e filamentosos que não foram detetados através dos métodos microbiológicos baseados em cultura, tais como *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Malassezia* (Fig.5.8). É de

referir, que a microbiota retratou na maioria das amostras apenas uma monocultura (44 das 48 amostras positivas), contrariamente aos resultados de sequenciação que evidenciaram a presença de mais de uma espécie de *Candida* em todas as 56 amostras.

No que se refere à abundância relativa das principais espécies, os métodos baseados em cultura e as abordagens metagenômicas identificaram *C. albicans* (respetivamente 65,5% e 34,2%) e *C. parapsilosis* (respetivamente 27,6% e 33,3%). A coorte incluiu 20 doentes (S14-S175) de 2021 e 15 doentes (S177-S491) de 2022. Ao comparar a abundância relativa dos géneros predominantes no microbioma entre os dois anos consecutivos, 2021 e 2022, os resultados espelharam consistentemente os obtidos na análise da microbiota.

5.4.6 Índices de diversidade alfa e beta nos grupos D1 e D8

Os resultados da comparação dos índices de diversidade alfa entre os grupos D1 e D8 (número de espécies observadas, Shannon, Chao1 e Simpson) podem ser observados na Figura 5.15. Estes índices refletem o valor máximo, mínimo, mediano e anormal do índice de cada grupo. O grupo D8 apresentou valores discretamente mais elevados no índice de diversidade de Shannon e no número de espécies diretamente observadas (OTU) (respetivamente, D1: 1,125; 62 e D8: 1,398; 90) (Fig. 5.15). Por conseguinte, as amostras em D8 apresentam uma comunidade fúngica mais diversa e uniformemente distribuída.

A mesma tendência foi observada no índice de Chao1 (estimativa do número total de espécies presentes) e Simpson (estimativa da diversidade, como o índice Shannon, porém com peso maior para equabilidade) (respetivamente, D1: 82,419; 0,315 e D8: 111,469; 0,363). Após a aplicação do teste estatístico T Student pode concluir-se que não se observaram diferenças significativas para os 526 genomas fúngicos identificados entre o grupo D1 e D8 relativamente aos índices de diversidade alfa (Fig. 5.15). A análise revelou que o internamento na UCI, não afetou significativamente a riqueza e os diferentes índices de diversidade alfa.

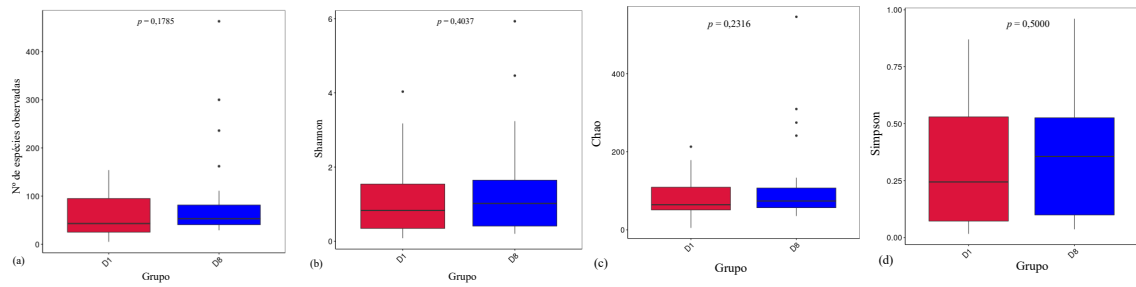


Figura 5.15. *Boxplots* dos índices de diversidade alfa (D1 e D8). (a) nº de espécies observadas; (b) Shannon; (c) Chao1 e (d) Simpson. Em cada gráfico está indicado o valor de p calculado pelo teste T Student.

A diversidade beta foi calculada utilizando a distância de UniFrac, para cada amostra separadamente e ordenado por análise de coordenadas principais (PCoA). Os resultados relativamente à diversidade beta, através da distância de UniFrac não ponderada (informa se as espécies presentes nas amostras são evolutivamente relacionadas ou completamente diferentes) e ponderada (informa se, além de serem ou não relacionadas, as abundâncias relativas dessas espécies variam entre as amostras), podem ser observados na Figura 5.16.a e 5.16.b, sem que tenham sido observadas diferenças estatísticas pelo teste de T Student.

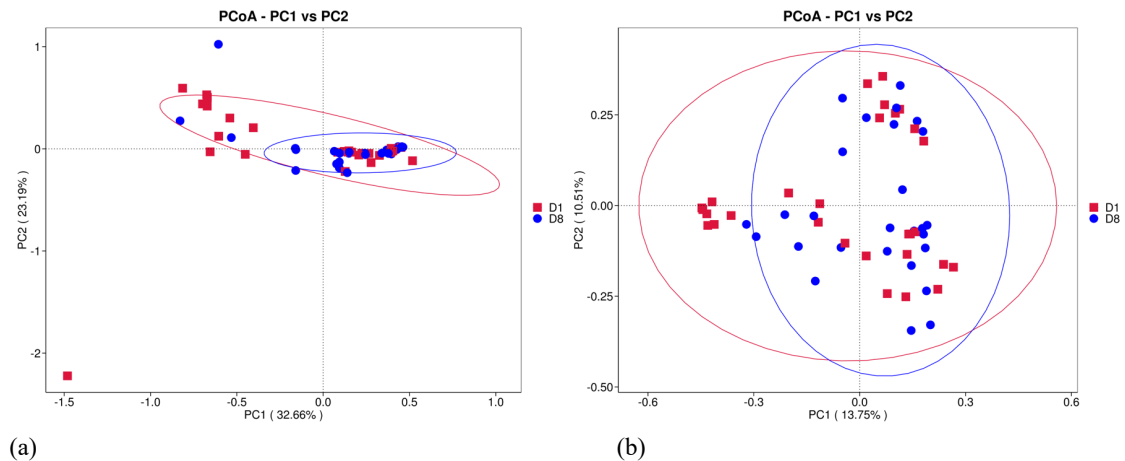


Figura 5.16. Análise de diversidade beta. Representação da distância UniFrac nas comunidades fúngicas calculada nos dois grupos em estudo (D1 e D8). (a) Análise de coordenada principal (PCoA) dos fungos por distância UniFrac não ponderada ($p=2,120$). (b) PCoA baseada na distância UniFrac ponderada ($p=8,586$). Cada ponto corresponde a uma amostra, representada por um componente principal no eixo X e outro componente principal no eixo Y, com cores atribuídas a cada grupo. A percentagem em cada eixo indica o valor da contribuição para a discrepância entre as amostras.

Nesta análise, não foi possível identificar uma composição significativamente diferente entre os grupos D1 e D8 através do teste não paramétrico ANOSIM ($R=$ -

0,00556 e $p = 0,499$). Um valor R positivo significa que a variação entre grupos é considerada significativa, enquanto um valor R negativo sugere que a variação interna do grupo é maior do que a variação entre grupos, e, portanto, não há diferenças significativas.

A distância filogenética entre as amostras observada através da árvore filogenética (UPGMA) evidencia que dos 21 doentes em que foram obtidas duas amostras cutâneas em diferentes momentos (D1 e D8), pode observar-se que apenas para dois doentes (30 e 426 D1/D8) há proximidade filogenética entre os micobiomas (Fig. 5.17). Para os restantes 19 doentes (90,5%) a distância filogenética é superior (Fig. 5.17). Apesar de os testes estatísticos terem mostrado que a composição de géneros é semelhante, a sua origem é diferente.

Se efetuarmos a comparação da abundância filogenética de espécies no mesmo doente com colheita em D1 e D8, na sua grande maioria apresentam grandes diferenças, o que mostra a influência do ambiente em UCI sobre o micobioma da pele. Em D8, a espécie fúngica mais prevalente é *C. albicans* seguida por *C. parapsilosis*, ambas como espécies dominantes num micobioma que se apresenta com uma diversidade muito baixa.

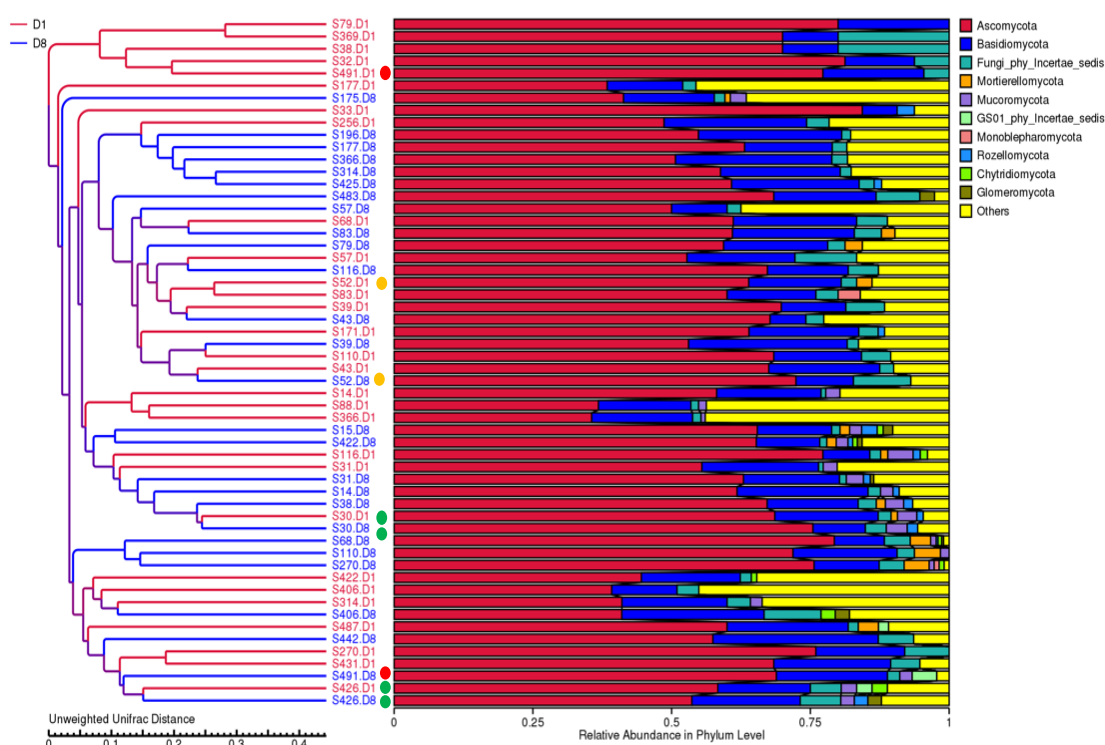


Figura 5.17. Representação da árvore filogenética e mapa de abundância relativa dos filos gerados pelo método *Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA). A árvore UPGMA é apresentada à esquerda, enquanto o mapa de abundância relativa dos filos é mostrado à direita. Os pontos verdes, amarelos e vermelhos destacam a proximidade genética das amostras em D1 e D8 para o mesmo doente.

5.4.7 Relação do microbioma com os factores de risco dos doentes em UCI

A maior abundância de *Candida* spp. (84,1% de todos os géneros fúngicos) foi detetada em doentes ventilados mecanicamente, seguida pelos doentes com CVC (81,9%), sob antibioticoterapia (68,3%) e diabéticos (62,3%). Nas amostras dos doentes que não apresentavam estes factores de risco, a abundância relativa de *Candida* spp. foi de 58,4%. No entanto, o aumento associado à presença da ventilação assistida, CVC, e doentes diabéticos não foi significativamente diferente dos doentes com e sem terapia anti-biótica, assim como, dos restantes três doentes com outros factores de risco.

5.5 Discussão

Na última década, têm vindo a ser publicados estudos muito interessantes sobre o papel determinante do microbioma respiratório e oral na doença invasiva (366). No que se refere ao microbioma cutâneo, este é apenas mencionado em indivíduos saudáveis e associado a infeções cutâneas (20, 47). Sabe-se no entanto que, em situações patológicas do hospedeiro, a abundância relativa de géneros e espécies de fungos individuais pode variar (21).

Composição do microbioma

O microbioma da pele foi analisado com base em amostras da zona axilar/inguinal de doentes em UCI. Neste estudo foi encontrada uma abundância relativa de 99% do filo Ascomycota, resultados em linha com estudos anteriores que referem que apesar de comunidades distintas de fungos ocuparem locais anatómicos variados, o filo Ascomycota engloba mais de 90% das comunidades fúngicas nos diferentes locais anatómicos, seguido pelo filo Basidiomycota e Mucoromycota (18, 35). Porém, em estudos prévios do microbioma da pele, em indivíduos do sexo feminino com sensibilidade cutânea aumentada, o filo Basidiomycota revelou-se o predominante (83,8%), seguido pelos filos Ascomycota (9,4%) e Mucoromycota (7,6%) (444). Estas variações na composição podem ser atribuídas à presença de patologias dermatológicas associadas.

Relativamente à diversidade de géneros fúngicos encontrada, nesta coorte de doentes observou-se uma diversidade fúngica baixa, com predomínio do género *Candida*. Estes resultados estão em linha com os resultados dos estudos anteriores efetuados em doentes em UCI, nos quais foi possível observar que a representação genómica do género *Malassezia* decresce (386, 445). *Candida* spp. também coloniza a pele de adultos saudáveis, embora tipicamente com abundância baixa em comparação com as espécies de *Malassezia* spp. Alguns estudos propuseram que a prevalência de adultos colonizados por *Candida* pode ser mais elevada no mundo ocidental, associada a dietas ricas em açúcar e gordura e à elevada utilização de antibióticos (446).

Esta disbiose também é observada no microbioma oral, com um aumento de *C. albicans* após a admissão na UCI (447, 448). Além disso, o microbioma do trato respiratório inferior em doentes internados em UCI é dominado por *Candida* spp. associado aos tratamentos e terapêuticas praticados na UCI e à terapêutica antibiótica (366). Apesar de não ser correto efetuar comparações deste estudo com os estudos anteriores efetuados em hospedeiros em ambulatório com e sem patologias dermatológicas, os resultados são concordantes pois mostram que a diversidade de fungos não *Malassezia* foi superior no grupo de doentes comparativamente com os controlos saudáveis (440).

No estudo realizado por Shajiei e colaboradores, que teve como objetivo definir o microbioma de doentes em UCI sob ventilação mecânica a partir de amostras de aspirados bronco-alveolares, foi observado que, embora o género *Malassezia* tenha sido o segundo mais frequentemente encontrado, a presença de *Candida* geralmente excluiu a deteção de *Malassezia* na maioria dos casos (449).

Os estudos de Huang e colaboradores e Proctor e colaboradores, particularmente direcionados para a pesquisa de *C. auris* no microbioma da pele de doentes em cuidados continuados e UCI, evidenciaram resultados semelhantes. O estudo efetuado por Huang e colaboradores mostrou que nos microbiomas da pele de residentes de unidades de cuidados paliativos na Califórnia sem a presença de *C. auris*, as espécies de *Malassezia* eram prevalentes. No geral, *Malassezia* spp. representava 80% da abundância relativa de fungos em 22 de 25 amostras analisadas. O estudo de Proctor e colaboradores, que avaliou o microbioma da pele de doentes em UCI com e sem colonização por *C. auris*, verificou que os doentes com microbiomas cutâneos dominados por espécies de *Malassezia* apresentavam um risco menor de colonização por *C. auris* (386). Outros autores

classificaram como “um estado de transição do microbioma da pele”, o microbioma constituído maioritariamente por um grupo diverso de *Candida* spp. que preconiza uma predisposição para colonização por *C. auris* (47).

Contrariamente a estes estudos de sequenciação do microbioma da pele em UCI e unidades paliativas, neste estudo não foram identificadas sequências de *C. auris*. Por conseguinte, seria espectável encontrar uma abundância relativa de *Malassezia* spp. superior, o que não se verificou (344, 354). Porém, estes resultados mostram que mesmo na ausência de *C. auris*, em doentes em estado crítico, o genoma de *Malassezia* foi substituído pelo de *Candida*. À semelhança de outros estudos (344, 449), observou-se que as espécies de *Candida* não estavam presentes ao mesmo tempo que as espécies de *Malassezia*, género que nesses trabalhos foi identificado como o segundo mais prevalente. As espécies destes dois géneros parecem excluir-se mutuamente quase completamente.

É possível justificar estas observações, tendo em conta que a colonização cutânea por *C. auris* e provavelmente pelas outras espécies de *Candida* ocorre mais frequentemente se a barreira cutânea estiver comprometida em consequência do envelhecimento ou de doença, sendo possível às espécies fúngicas competir através de mecanismos diretos (por exemplo, disponibilidade de nutrientes) e/ou indiretos (por exemplo, imunidade antifúngica) com as espécies residentes do microbioma.

Estas alterações no microbioma fazem parte de uma disbiose mais ampla em doentes críticos, que é preditiva do resultado clínico e pode ser alvo de terapias modificadoras do microbioma (343). Assim, estes estudos na globalidade são sugestivos de que o género *Malassezia* pode ser considerado um biomarcador associado a um microbioma saudável.

Micobiota vs Microbioma

Desde o advento das tecnologias de sequenciação de alto rendimento, o campo de investigação do microbioma registou um aumento acentuado. Os métodos moleculares permitiram mapear uma imagem detalhada da composição e abundância relativa dos fungos residentes na pele, em comparação com o que era possível com as abordagens tradicionais baseadas em culturas (344).

Em linha com estudos anteriores (43), os resultados obtidos com a sequenciação recriaram os resultados da cultura e mostraram uma colonização cutânea elevada, por espécies de *Candida*, particularmente *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Quando se comparou a abundância relativa dos géneros prevalentes do micobioma das amostras nos dois anos consecutivos, 2021 e 2022, mais uma vez os resultados traduziram os obtidos no estudo da micobiota. Por conseguinte, os resultados obtidos neste estudo corroboram outros autores que referem que os estudos do micobioma da pele poderão fornecer mais informações se for utilizada uma combinação destas duas metodologias (434).

Porém, para além das espécies fúngicas identificadas pela microbiologia convencional (ou seja, *Candida* spp.), a sequenciação, identificou outros fungos leveduriformes e filamentosos, tais como os géneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Malassezia*. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores, que identificaram uma maior diversidade do micobioma com a metagenómica, utilizando técnicas de sequenciação (449).

No que se refere aos índices de diversidade entre o micobioma na admissão à UCI (D1) e após internamento na UCI (D8) não foram encontradas variações significativas na diversidade e equidade, à semelhança dos resultados obtidos com o estudo da micobiota. Convém, no entanto, salientar que considerando a distância filogenética entre as amostras colhidas em D1 e D8, é possível equacionar que embora as espécies fúngicas sejam idênticas, são estirpes diferentes e adquiridas ao longo do internamento na UCI. Ao conhecimento atual, este estudo é pioneiro pelo que serão necessárias mais avaliações prospetivas por forma a confirmar estes resultados preliminares.

É de referir que as abordagens baseadas no DNA não conseguem diferenciar organismos fúngicos viáveis e DNA fúngico residual de contaminantes, o que pode dificultar a interpretação dos resultados. A mera deteção de DNA fúngico não significa que uma célula inteira esteja presente. E mesmo que uma célula fúngica esteja presente, não é possível assumir que esteja viva. Além disso, a interpretação dos resultados dos exames culturais e dos estudos moleculares é dificultada, principalmente porque o isolamento ocasional de uma espécie fúngica ou a presença do seu DNA, não significa que se trate de uma espécie colonizadora e integrante do micobioma, podendo apenas ser transitória.

A presença de fungos na pele pode ocorrer acidentalmente como resultado de contaminação com o solo, restos de plantas, ou após exposição à água ou ao ar. Os esporos fúngicos são normalmente transportados pelo ar e podem cair passivamente sobre a pele (20). Este facto é confirmado pelos resultados que indicam uma menor incidência de fungos na pele coberta do dorso e a maior prevalência nos espaços interdigitais que estão expostos a todos os tipos de contaminação (439). Na mesma linha, os resultados obtidos neste estudo mostraram uma colonização transitória de fungos ubiqüitários como os géneros *Penicillium* ou *Cladosporium*, apenas detetados em percentagens elevadas nas amostras na admissão à UCI. Por conseguinte, as investigações sobre o micobioma humano exigem uma análise de dados rigorosamente controlada para garantir robustez dos resultados da sequenciação (24). Algumas destas limitações podem ser atenuadas por uma análise conjunta da microbiota em paralelo com o micobioma, que foi o efetuado neste estudo.

Papel do micobioma da pele na infeção em UCI, perspetiva clínica

A admissão de doentes na UCI e a administração de terapia antimicrobiana são conhecidas por causar alterações na microbiota fúngica das áreas potencialmente colonizadas do corpo humano, conduzindo a uma prevalência aumentada de *Candida* (29, 32). De facto, tal como referido no Capítulo 4, a ventilação mecânica foi descrita como factor de risco para a colonização por *Candida* e, na realidade, numerosos factores em doentes em estado crítico, podem contribuir para a disbiose e mudança da comunidade fúngica para a colonização por este género fúngico (29). Os resultados obtidos mostraram que *Candida* spp. é o componente dominante do micobioma dos doentes em UCI, independentemente da terapia antibiótica ou de outras características clínicas e demográficas do doente (366, 449). Além disso, adicionou-se outro factor, o tempo de permanência na UCI. Apesar da diversidade alfa e beta não serem suportadas estatisticamente, é possível observar uma diminuição em D8 no número de géneros fúngicos presentes, embora o predomínio de *Candida* spp. se mantenha e até aumente. Igualmente interessante é verificar que as espécies de *Candida* presentes em D8 são na sua grande maioria distantes filogeneticamente das espécies de *Candida* em D1, o que permite concluir sobre o impacto da UCI sobre o micobioma.

Ainda que fora do âmbito desta investigação e apenas por ilações com estudos comparativos sobre a influência do ambiente físico da UCI sobre o micobioma. De uma forma mais específica é possível referir que o ambiente físico da UCI pode ter contribuído para a falta de variação significativa entre os resultados do dia de admissão e do dia 8, proporcionando um ambiente controlado com exposição consistente a factores ambientais. Os protocolos da UCI geralmente incluem rigorosas medidas de controlo de infeções (entre eles, os banhos de gluconato de clorhexidina), como limpeza frequente das superfícies, filtragem do ar e práticas estritas de higiene das mãos, que podem limitar as flutuações na carga microbiana e reduzir o risco de contaminação cruzada. Além disso, a temperatura e a humidade padronizadas, assim como a mobilidade limitada dos doentes nas salas da UCI, estabilizam ainda mais as condições nas quais a colonização por *Candida* ou outras dinâmicas microbianas poderiam variar. Estes controlos ambientais podem ajudar a manter um ambiente microbiano relativamente estável, minimizando assim as diferenças nos níveis de colonização ou na exposição microbiana entre a admissão e o dia 8 de internamento.

Esta avaliação sobre o micobioma apresentou algumas limitações. Inicialmente, a dificuldade na obtenção quantitativa de DNA, o que conduziu a uma redução da amostra inicial quase para metade (de 100 para 56 amostras). Este número de amostras baixo e inferior ao perspectivado inicialmente, dificultou a tentativa de associação das características clínicas dos doentes com a composição do micobioma. Por outro lado, a análise dos resultados da sequenciação do micobioma das amostras em estudo foi de uma coorte de doentes em estado crítico, pelo que a comparação com controlos saudáveis foi efetuada com base em estudos anteriores. Por conseguinte, a hipótese gerada sobre a utilização de espécies de *Malassezia* e *Candida* como biomarcadores de doença em UCI necessita de confirmação futura.

6. Perfis de Susceptibilidade *In Vitro* aos Antifúngicos

6.1 Introdução

A pandemia silenciosa de Resistência Antimicrobiana (RAM) é um fenómeno declarado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como uma das dez maiores ameaças globais à saúde pública que a humanidade enfrenta hoje. Estima-se que haverá mais de 10 milhões de mortes associadas a infeções por RAM, e a sua carga económica global acumulativa aumentará em 100,2 triliões de dólares americanos até 2050, se não forem tomadas medidas imediatas para combater a crise (450).

A pesquisa e vigilância de RAM até ao momento foi em grande parte focada na resistência antibacteriana, antiviral e antimalárica. No entanto, é bem conhecido que as infeções fúngicas também têm contribuído significativamente para a RAM. Os recentes surtos de infeções fúngicas sistémicas, particularmente em populações imunocomprometidas, e devido a *C. auris* multirresistentes, bem como a doença do “fungo negro” associada à COVID-19 por espécies de *Mucorales*, são exemplos de que as doenças fúngicas emergiram em parte, devido à escassez de antifúngicos eficazes (248, 451).

Em geral, as espécies de *Candida* são bastante suscetíveis aos fármacos antifúngicos e o padrão de susceptibilidade de uma determinada espécie aos fármacos é frequentemente previsível (452). No entanto, o aumento do uso de agentes antifúngicos, pode condicionar a ecologia natural e causar o aparecimento de isolados resistentes, assim como, o aumento de espécies não-*albicans* responsáveis por infeção (412). Esta alteração na etiologia traduz-se também no aparecimento de espécies com perfis de resistência intrínsecas e adquiridas às principais moléculas antifúngicas utilizadas na prática clínica (Tabela 6.1) (54, 83). Ainda assim, a contaminação cruzada entre doentes e profissionais de saúde apesar de descrita principalmente para *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. auris*, permanece rara (453). Neste cenário, o número limitado de classes de fármacos antifúngicos e o aparecimento de espécies de *Candida* multirresistentes, como *C. auris*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* é preocupante (322, 454).

Tabela 6.1. Principais classes de antifúngicos e os seus fármacos mais relevantes (Adaptado de Freitas e Vaz, 2014).

Polienos Os polienos ligam-se ao ergosterol presente na membrana celular fúngica e provocam o desequilíbrio hidroeletrolítico com saída de iões K^+ e Na^+, o que contribui para a morte das células fúngicas (efeito fungicida). Como exemplos de antimicóticos poliénicos tem-se o desoxicolato de anfotericina-B e a nistatina. Podem ser administrados por via intravenosa ou tópica, respetivamente.
Azóis Os azóis inibem a enzima fúngica 14α-desmetilase relevante na síntese do ergosterol. Os azóis utilizados clinicamente na terapêutica sistémica compreendem o fluconazol, voriconazol, isavuconazol, posaconazol e itraconazol. Podem ser administrados por via intravenosa ou por via oral.
Equinocandinas As equinocandinas inibem a síntese de glicano na parede celular, através da inibição não competitiva da enzima $1,3\text{-}\beta$ glicano sintetase. Apresentam atividade contra um largo espectro de espécies de <i>Candida</i>, incluindo <i>C. glabrata</i> e <i>C. krusei</i>, contra as quais o fluconazol tem pouca ou nenhuma atividade. Atualmente, existem quatro equinocandinas em uso clínico: a caspofungina, a anidulafungina, a micafungina e a rezafungina. Apenas podem ser administradas por via intravenosa.

Igualmente, um aumento significativo no uso de antifúngicos em regimes de profilaxia e terapia empírica, resultou no aparecimento de isolados clínicos resistentes, particularmente contra os triazóis (principalmente fluconazol) (158, 355).

As espécies de *Candida* colonizadoras e/ou responsáveis por infeção variam consoante a área geográfica, como tal, o tratamento deve basear-se em estudos locais realizados regularmente através de projetos bem consertados (342). Por conseguinte, os testes de susceptibilidade antifúngica *in vitro* desempenham um papel cada vez mais importante na orientação da decisão terapêutica (342). Assim, é necessário rastrear o surgimento de espécies ou isolados resistentes, especialmente em populações de alto risco, para melhorar a terapêutica antifúngica empírica. Ao conhecer a epidemiologia local da colonização por *Candida* e a prevalência dos padrões de resistência, os profissionais de saúde podem adequar os esquemas de terapia antifúngica empírica de forma mais eficaz, minimizando o risco de falha do tratamento e o aumento das taxas de resistência.

Acresce referir que a monitorização terapêutica de medicamentos (TDM) fornece uma mudança para estratégias de dosagem refinadas para antimicrobianos, em comparação com a dosagem padrão, que é necessária para aumentar a probabilidade de alcançar exposição adequada ao medicamento e sucesso clínico (329). Assim, é possível

considerar que a modificação da ecologia fúngica e as alterações no espectro etiológico das infecções fúngicas estão frequentemente ligadas à pré-exposição a agentes antifúngicos. Por conseguinte, será promissor dispor de dados epidemiológicos locais quanto aos perfis de susceptibilidade aos antifúngicos, especialmente em ambiente de medicina intensiva, para o controlo das infecções fúngicas e uma TDM eficiente.

Assim, neste capítulo pretendeu-se responder às seguintes questões de investigação: Existem perfis de resistência nos isolados colonizadores de *Candida* spp.? Esses perfis mantêm-se ao longo do tempo de internamento dos doentes na UCI? Existe alguma relação entre esses perfis de resistência e os factores predisponentes do hospedeiro para a infeção?

6.2 Objetivos

Objetivo geral

- Determinar os perfis de susceptibilidade aos quatro antifúngicos mais frequentemente utilizados na prática clínica em isolados colonizadores de *Candida* spp. provenientes de doentes internados em UCI, no período de 2020 a 2022.

Objetivos específicos

- Conhecer os perfis de susceptibilidade ao longo do tempo de permanência dos doentes na UCI;
- Relacionar os factores do hospedeiro predisponentes para a infeção com os perfis de resistência microbiológica.

6.3 Material e métodos

6.3.1 População e amostras de doentes

A avaliação da atividade *in vitro* das moléculas antifúngicas sistémicas, fluconazol, voriconazol, anfotericina B e anidulafungina foi conduzida a partir do estudo observacional prospetivo realizado em três UCI da área metropolitana de Lisboa entre janeiro de 2020 e dezembro de 2022 e previamente descrito no Capítulo 2 (Fig. 2.1). Para tal, foram utilizados os isolados do género *Candida* obtidos dos 675 doentes durante a sua permanência na UCI (Fig. 6.1).

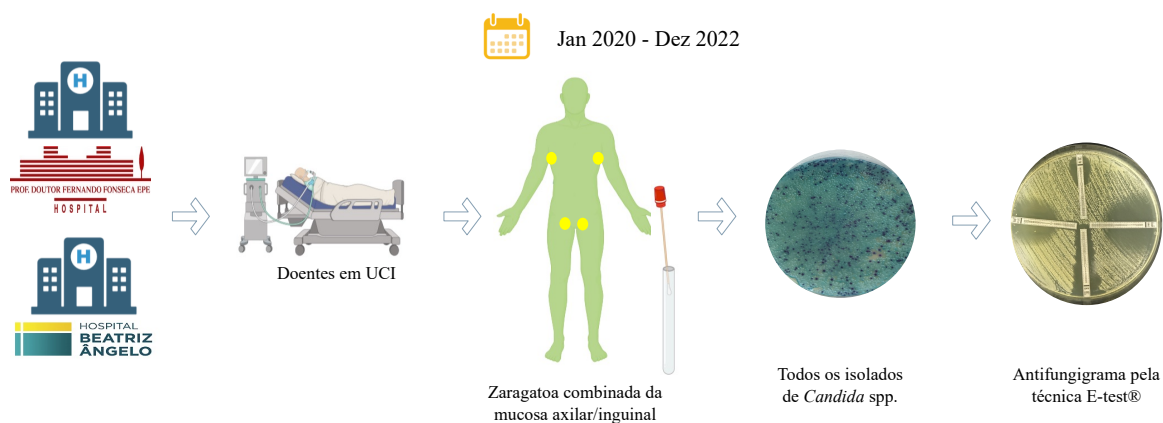


Figura 6.1. Fluxograma do estudo observacional para avaliação da atividade *in vitro* de moléculas antifúngicas sobre os isolados de *Candida* spp., em unidades de cuidados intensivos.

6.3.2 Isolados e meios de cultura

Este estudo prospetivo foi efetuado em todos os isolados clínicos de *Candida* spp. (Fig. 6.1). Além destes isolados foram usadas as estirpes de referência seguintes: *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. Os isolados e as estirpes de referência foram criopreservados a -80°C em meio YPD (Anexo 4, 9.2.1). O crescimento dos isolados e das estirpes de referência foi feito a uma temperatura de 30°C , com uma agitação orbital de 200 rpm, em meio YPD e depois repicado para Sabouraud Dextrose Agar. Nos ensaios de determinação da susceptibilidade dos isolados aos antifúngicos, foi usado o meio de *Roswell Park Memorial Institute*, RPMI1640® (bioMérieux, Marcy L'Etoile, França HiMedia, Maharashtra, India) (Anexo 4, 9.2.1).

6.3.3 Antifúngicos e inóculo

O perfil de susceptibilidade aos antifúngicos dos isolados foi determinado através da obtenção da concentração mínima inibitória (CMI) pelo método E-test® (bioMérieux, Marcy L'Etoile, França/ HiMedia, Maharashtra, India) segundo as instruções do fabricante, com ligeiras modificações.

A susceptibilidade *in vitro* dos isolados foi testada para quatro moléculas antifúngicas: anfotericina B, anidulafungina e voriconazol, com concentrações compreendidas entre 0,002-32 mg/L e fluconazol entre 0,016-256 mg/L.

Resumidamente, as placas de agar RPMI 1640® foram inoculadas por inundação com *zaragatoa* a partir de uma suspensão leveduriforme com turvação ajustada a 10⁶ células/mL (0,5 McFarland). O espalhamento do inóculo pela superfície do agar foi efetuado em quatro direções. As placas foram secas à temperatura ambiente (25°C) durante 15 min antes da aplicação da tira E-test®. Após colocação das tiras sobre o inóculo confluyente de células fúngicas, as tiras com gradiente de antifúngico foram incubadas a 35°C durante 24h, ou até 48h conforme necessário e recomendado pelo fabricante, período durante o qual o antifúngico se difunde no agar (Anexo 11, 9.2.8).

6.3.4 Leitura e interpretação

O teste foi lido utilizando a zona de inibição para marcar o ponto em que o crescimento fúngico em forma de elipse se intersecta com a tira, indicando um valor de CMI. Para os azóis e equinocandinas, o ponto final de leitura corresponde a uma inibição de 80% do crescimento em comparação com o controlo após 48h de incubação a 35°C. Para a anfotericina B, o ponto final da CMI é definido como a concentração mais baixa em que há 100% de inibição do crescimento em comparação com o controlo após 48h de incubação (333, 334). A CMI 50 e CMI 90 é definida como a CMI necessária para inibir o crescimento de 50 e 90% dos organismos, respetivamente.

Cada isolado foi testado duas vezes e, caso os resultados das duas primeiras medições da CMI não fossem consistentes dentro de uma margem de duas diluições, o Teste de Suscetibilidade aos Antifúngicos (TSAF) foi repetido para garantir a precisão dos resultados.

Os resultados das repetições de cada isolado foram aceites como finais. Os resultados das CMI foram interpretados com base nos pontos de rutura clínicos (CBP) recomendados pelo EUCAST. Na ausência de pontos de rutura clínicos definidos para algumas espécies de *Candida* e/ou moléculas antifúngicas, foram utilizados os valores de corte epidemiológico (ECOFF) para discriminar o tipo selvagem (WT) (WT; CMI $\leq$ ECOFF) e não WT (CMI $>$ ECOFF) (332).

Para o fluconazol, os isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* com CMI ≤ 2 mg/L e > 4 mg/L foram classificados como sensíveis (S) e resistentes (R), respetivamente; os isolados de *C. glabrata* com CMI ≥ 16 mg/L foram considerados como R; os isolados de *C. guilliermondii* foram considerados WT quando CMI ≤ 16 mg/L (ECOFF) (337).

A interpretação da CMI do voriconazol para *C. albicans* foi: CMI $\leq 0,06$ mg/L (S) e $\geq 0,25$ mg/L (R); para os isolados de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foi: CMI $\leq 0,125$ mg/L (S) e $\geq 0,250$ mg/L (R); os isolados de *C. glabrata* foram considerados WT quando a CMI $\leq 1,0$ mg/L (ECOFF) (332, 339, 340).

Para a anidulafungina, a interpretação de CMI foi CMI $\geq 0,03$ mg/L (R) para *C. albicans*; CMI $\geq 0,06$ mg/L (R) para *C. tropicalis* e *C. glabrata* e CMI ≥ 4 mg/L (R) para *C. parapsilosis*; os isolados de *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii* foram considerados WT quando a CMI $\leq 0,06$ e ≤ 4 mg/L (ECOFF), respetivamente (337).

No que se refere à anfotericina B, a interpretação de CMI foi de CMI ≤ 1 mg/L (S) para os isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Os isolados de *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii* foram considerados WT quando a CMI $\leq 0,5$ mg/L (ECOFF) (Tabela 6.2) (332, 339, 340).

Tabela 6.2 Categorias interpretativas para *Candida* spp. dos antifúngicos testados de acordo com as normas EUCAST e estudos relevantes (Adaptado de 332, 339 e 340).

Espécie	Antifúngico	Pontos de corte clínicos			ECOFF		
		mg/L					
		EUCAST		R	EUCAST	E-test ^a	E-test ^b
S ≤	I	WT ≤	WT ≤		WT≤		
<i>C. albicans</i>	Anfotericina B	1		1	1	1	1
	Anidulafungina	0,03		0,03	0,03	0,01	0,008
	Fluconazol	2	4	4	0,5	1	1
	Voriconazol	0,06	0,125-0,25	0,25	0,03	0,03	0,03
<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B	1		1	1	-	2
	Anidulafungina	4		4	4	8	8
	Fluconazol	2	4	4	2	2	2
	Voriconazol	0,125	0,25	0,25	0,06	0,25	0,12
<i>C. glabrata</i>	Anfotericina B	1		1	1	-	2
	Anidulafungina	0,06		0,06	0,06	0,03	0,03
	Fluconazol	0,001	≤ 16	16	16	64	-
	Voriconazol	NA		NA	1	1	-
<i>C. tropicalis</i>	Anfotericina B	1		1	1	-	2
	Anidulafungina	0,06		0,06	0,06	0,03	0,03
	Fluconazol	2	4	4	1	4	4
	Voriconazol	0,125	0,25	0,25	0,125	0,25	0,25
<i>C. lusitaniae</i>	Anfotericina B	NA		NA	(0,5)	-	1
	Anidulafungina	NA		NA	NA	NA	NA
	Fluconazol	NA		NA	NA	2	1
	Voriconazol	NA		NA	NA	0,03	0,03
<i>C. guilliermondii</i>	Anfotericina B	NA		NA	(0,5)	-	1
	Anidulafungina	NA		NA	NA	NA	NA
	Fluconazol	NA		NA	(16)	16	4
	Voriconazol	NA		NA	NA	0,5	0,12

NA- Não se aplica; ^a (332); ^b (339).

6.3.5 Análise estatística

As características demográficas, clínicas e micológicas do grupo de estudo foram organizadas numa base de dados e os dados foram analisados utilizando o software IBM SPSS Statistics v. 29.0 (IBM Corp., Armonk, NY). A análise dos dados foi efetuada com recurso a metodologias descritivas e inferenciais. A comparação das características demográficas e clínicas dos doentes foi efetuada através do teste do Qui-quadrado. Um valor de *p* inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo para todas as análises inferenciais acima mencionadas.

6.4 Resultados

6.4.1 Perfis de susceptibilidade antifúngica dos isolados de *Candida* spp.

No total, a susceptibilidade aos antifúngicos foi testada em 355 isolados de *Candida* spp. usando os pontos de corte interpretativos definidos pelo EUCAST. De uma forma mais específica e utilizando a denominação formal das espécies de *Candida*, a determinação foi realizada para *C. albicans* (n= 185), complexo *C. parapsilosis* (n= 112) [*C. parapsilosis stricto sensu* (n= 109), *C. metapsilosis* (n=1), *C. orthopsilosis* (n= 2)], *C. glabrata* (n= 36), *C. tropicalis* (n= 15), *C. lusitaniae* (n= 4) e *C. guilliermondii* (n= 3).

As leituras das CMI para as estirpes de referência utilizadas como controlo de qualidade (ATCC 6258 e ATCC 22019) situaram-se dentro dos intervalos limites descritos no EUCAST. Os intervalos de susceptibilidade dos isolados mais prevalentes de *Candida* spp. obtidos para os quatro agentes antifúngicos são apresentados na Figura 6.2.

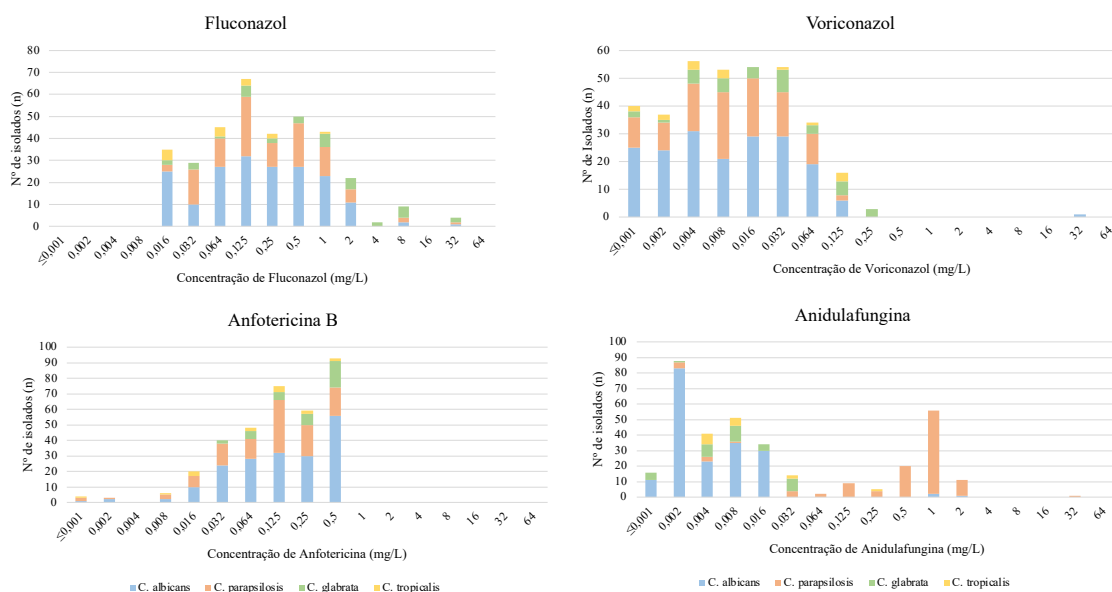


Figura 6.2. Perfis de susceptibilidade *in vitro* dos isolados das espécies de *Candida* aos antifúngicos testados.

A distribuição da CMI por espécie de *Candida* e antifúngico com base nos pontos de corte do EUCAST, para todos os isolados de *Candida* spp. testados está evidenciada na Tabela 6.3.

Tabela 6.3. Distribuição da CMI por espécie de *Candida* e antifúngico com base nos pontos de corte do EUCAST¹.

Número de isolados por CMI, em mg/L																	
Espécie (s) e antifúngico	≤0,001	0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
<i>C. albicans</i> (n= 185)																	
Fluconazol	0	0	0	0	25	10	27	32	27	27	23	11	0	2	0	1	0
Voriconazol	25	24	31	21	29	29	19	6	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Anfotericina B	1	2	0	2	10	24	28	32	30	56	0	0	0	0	0	0	0
Anidulafungina	11	83	23	35	30	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i> (complexo) (n= 112)																	
Fluconazol	0	0	0	0	3	16	13	27	11	20	13	6	0	2	0	1	0
Voriconazol	11	10	17	24	21	16	11	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anfotericina B	2	1	0	3	7	14	13	34	20	18	0	0	0	0	0	0	0
Anidulafungina	0	4	3	1	0	4	2	9	4	20	54	10	0	0	0	1	0
<i>C. glabrata</i> (n= 36)																	
Fluconazol	0	0	0	0	2	3	1	5	2	3	6	5	2	5	0	2	0
Voriconazol	2	1	5	5	4	8	3	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Anfotericina B	0	0	0	0	0	2	5	5	7	17	0	0	0	0	0	0	0
Anidulafungina	5	1	8	10	4	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. tropicalis</i> (n= 15)																	
Fluconazol	0	0	0	0	5	0	4	3	2	0	1	0	0	0	0	0	0
Voriconazol	2	2	3	3	0	1	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anfotericina B	1	0	0	1	3	0	2	4	2	2	0	0	0	0	0	0	0
Anidulafungina	0	0	7	5	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. lusitaniae</i> (n= 4)																	
Fluconazol	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Voriconazol	0	0	0	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anfotericina B	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	0	0	0	0
Anidulafungina	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. guilliermondii</i> (n= 3)																	
Fluconazol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0
Voriconazol	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anfotericina B	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anidulafungina	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total																	
Fluconazol	0	0	0	0	35	29	46	68	42	51	44	22	3	11	0	4	0
Voriconazol	40	38	56	54	56	56	34	17	3	0	0	0	0	0	0	1	0
Anfotericina B	4	3	1	7	20	40	48	76	60	93	1	0	2	0	0	0	0
Anidulafungina	16	91	43	51	35	14	3	9	5	20	56	11	0	0	0	1	0

¹Os quadrados com cores atribuídas por antifúngico representam os pontos de corte clínicos definidos pelo EUCAST.

Com o objetivo de identificar alguma alteração nos perfis de susceptibilidade de *Candida* spp. durante o período de internamento foi efetuado um acompanhamento contínuo, com a realização do TSAF nos isolados obtidos dos diferentes tempos de colheita em doentes persistentemente colonizados. Os resultados indicaram que, mesmo com a pressão seletiva imposta pelo ambiente nosocomial da UCI, os microrganismos mantiveram a susceptibilidade inicial. O padrão de susceptibilidade permaneceu inalterado desde a admissão (D1) até o oitavo dia (D8) de internamento na UCI.

Por conseguinte, para avaliar as taxas de resistência foram excluídos os isolados das espécies de *Candida* (n= 89) que colonizaram os mesmos doentes durante o seu internamento na UCI (D5 e D8). Assim, dos 355 isolados, foram incluídos 266 isolados de *Candida* spp. para determinar as taxas de resistência antifúngica utilizando as regras interpretativas descritas na Tabela 6.2. Os detalhes do intervalo da CMI, CMI50 e CMI90 são apresentados na Tabela 6.4.

Dos isolados analisados, 4,6% apresentaram perfis de resistência. No entanto, não foram identificados isolados multirresistentes. A maioria dos isolados de *Candida* spp. foram considerados suscetíveis ao fluconazol (CMI ≤ 2 mg/L), exceto os isolados de *C. glabrata* que são intrinsecamente menos suscetíveis *in vitro* a este fármaco. Ainda assim, 91,6% (22/24) foram considerados suscetíveis com exposição aumentada e apenas 8,3% (2/24) resistentes (Tabela 6.4). Para o voriconazol, os valores da CMI90 ficaram além do ponto de corte. É, no entanto, de referir que para a anfotericina B a CMI 90 ficou uma diluição abaixo do ponto de corte (0,5 mg/L). Relativamente à anidulafungina, a CMI90 para *C. tropicalis* ficou uma diluição acima do ponto de corte (0,125 mg/L). No entanto, para as restantes espécies de *Candida* a CMI90 da anidulafungina manteve-se uma diluição abaixo do ponto de corte (Fig. 6.2, Tabela 6.4).

A taxa global de resistência ao fluconazol foi de 2,7%, com 3 de 133 isolados de *C. albicans*, 2 de 89 de *C. parapsilosis* e 2 de 24 de *C. glabrata* identificados como resistentes (Tabela 6.4). Para o outro triazol testado, o voriconazol, foi observada susceptibilidade em 99,6% dos isolados. A resistência só foi observada para um isolado de *C. albicans*, mas é relevante referir que 4,5% (6/133) dos isolados de *C. albicans*, apresentaram uma CMI dentro da categoria I (Tabela 6.4). A taxa global de isolados de espécies de *Candida* do tipo não selvagem (NWT) para o fluconazol e voriconazol foi,

respetivamente, de 11,6% (n= 31; *C. albicans* [n= 27], *C. parapsilosis* [n= 2] e *C. glabrata* [n= 2]) e 7,5% (n= 20; *C. albicans* [n= 18] e *C. parapsilosis* [n= 2]).

O intervalo da CMI do fluconazol foi semelhante para *C. albicans* e *C. parapsilosis*, evidenciando valores entre $\leq 0,016$ e 32 mg/L (Tabela 6.4). Aplicando o valor de corte epidemiológico (ECOFF), todos os isolados de *C. glabrata* neste estudo revelaram sensibilidade ao voriconazol. A resistência cruzada ao fluconazol e ao voriconazol foi observada apenas num isolado de *C. albicans* (1/133; 0,8%). Todos os isolados que mostraram um fenótipo NWT ao voriconazol eram igualmente NWT para o fluconazol.

Relativamente à anfotericina B, todos os isolados de *Candida* spp. testados foram suscetíveis. Quanto aos quatro isolados de *C. lusitaniae* obtidos no decorrer do estudo, apenas um era do tipo selvagem (WT) (Tabela 6.4).

A maioria dos isolados testados, apresentaram taxas de susceptibilidade elevadas à anidulafungina. Globalmente, apenas 1,5% (4/259) dos isolados evidenciaram resistência à anidulafungina. A resistência à anidulafungina foi observada para três espécies de *Candida*: *C. tropicalis* (7,7%), *C. albicans* (1,5%) e *C. parapsilosis* (1,1%). Em todos os isolados de *C. glabrata* não foram encontrados perfis de resistência *in vitro* à anidulafungina (Tabela 6.4). Vale a pena mencionar que a resistência observada para os isolados de *C. tropicalis* foi à anidulafungina. Todos os isolados de *C. tropicalis* foram suscetíveis aos azóis e à anfotericina B.

Tabela 6.4. Perfil de susceptibilidades dos isolados de espécies de *Candida* obtidos de amostras de doentes em UCI, conforme determinado pelo EUCAST.

<i>Candida</i> spp.	Nº de isolados	Antifúngicos	CMI (mg/L)			Isolados (%)			Isolados (%)	
			Intervalo	CMI50	CMI90	S	I	R	WT	NWT
<i>C. albicans</i>	133	Fluconazol	0,016 – 32	0,250	2,0	130 (97,7)	NA	3 (2,3)	115 (79,3)	27 (20,3)
		Voriconazol	≤0,001 – 32	0,004	0,064	126 (94,7)	6 (4,5)	1 (0,8)	115 (86,5)	18 (13,5)
		Anfotericina B	≤0,001 – 1,0	0,125	0,5	133 (100)	NA	0 (0,0)	133 (100)	0 (0,0)
		Anidulafungina	≤0,001 – 2,0	0,002	0,016	131 (98,5)	NA	2 (1,5)	131 (98,5)	2 (1,5)
<i>C. parapsilosis</i> (complexo)	89	Fluconazol	0,016 – 32	0,125	1,0	87 (97,8)	NA	2 (2,2)	87 (97,8)	2 (2,2)
		Voriconazol	≤0,001 – 0,125	0,008	0,064	89 (100)	NA	0 (0,0)	87 (97,8)	2 (2,2)
		Anfotericina B	≤0,001 – 0,5	0,125	0,5	89 (100)	NA	0 (0,0)	89 (100)	0 (0,0)
		Anidulafungina	0,002 – 32,0	1,0	2,0	88 (98,9)	NA	1 (1,1)	88 (98,9)	1 (1,1)
<i>C. glabrata</i>	24	Fluconazol	0,125 – 32	2,0	32,0	NA	22 (91,6)	2 (8,3)	22 (91,6)	2 (8,3)
		Voriconazol	0,002 – 0,250	0,032	0,250	NA	NA	NA	24 (100)	0 (0,0)
		Anfotericina B	0,032 – 0,5	0,5	0,5	24 (100)	NA	0 (0,0)	24 (100)	0 (0,0)
		Anidulafungina	≤0,001 – 0,064	0,006	0,064	24 (100)	NA	0 (0,0)	24 (100)	0 (0,0)
<i>C. tropicalis</i>	13	Fluconazol	0,016 – 1,0	0,064	0,125	13 (100)	NA	0 (0,0)	13 (100)	0 (0,0)
		Voriconazol	≤0,001 – 0,125	0,004	0,125	13 (100)	NA	0 (0,0)	13 (100)	0 (0,0)
		Anfotericina B	≤0,001 – 0,5	0,064	0,50	13 (100)	NA	0 (0,0)	13 (100)	0 (0,0)
		Anidulafungina	0,004 – 0,250	0,008	0,125	12 (92,3)	NA	1 (7,7)	12 (92,3)	1 (6,7)
<i>C. lusitaniae</i>	4	Fluconazol	0,064 – 1,0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		Voriconazol	0,008 – 0,125	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		Anfotericina B	0,250 – 4,0	NA	NA	NA	NA	NA	1 (25,0)	3 (75,0)
		Anidulafungina	0,002 – 0,064	NA	NA	NA	NA	NA	4 (100)	0 (0,0)
<i>C. guilliermondii</i>	3	Fluconazol	4,0 – 8,0	NA	NA	NA	NA	NA	3 (100)	0 (0,0)
		Voriconazol	0,001 – 0,016	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		Anfotericina B	0,004 – 0,125	NA	NA	NA	NA	NA	3 (100)	0 (0,0)
		Anidulafungina	0,002 – 0,004	NA	NA	NA	NA	NA	3 (100)	0 (0,0)
Total	259 ¹	Fluconazol	0,016 – 32	0,250	2,0	225 (97,3)	27 (9,5)	7 (2,7)	231 (88,2) ²	31 (11,8) ²
		Voriconazol	≤0,001 – 32	0,008	0,064	252 (97,5)	6 (2,3)	1 (0,4)	237 (91,5)	22 (8,5)
		Anfotericina B	≤0,001 – 4,0	0,125	0,5	266 (100)	NA	0 (0,0)	266 (100) ³	0 (0,0) ³
		Anidulafungina	≤0,001 – 32,0	0,008	1	255 (98,5)	NA	4 (1,5)	262 (98,5) ³	4 (1,5) ³

NA: Não se aplica. ¹ As taxas de susceptibilidade não incluíram os quatro e três isolados de *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii*, respetivamente. ² Total de 262 isolados. ³ Total de 266 isolados.

Aplicando o valor de corte epidemiológico, os isolados de espécies crípticas do complexo de *C. parapsilosis* (dois isolados de *C. orthopsilosis* e um de *C. metapsilosis*), apresentaram susceptibilidade a todos os antifúngicos testados (Fig. 6.3).

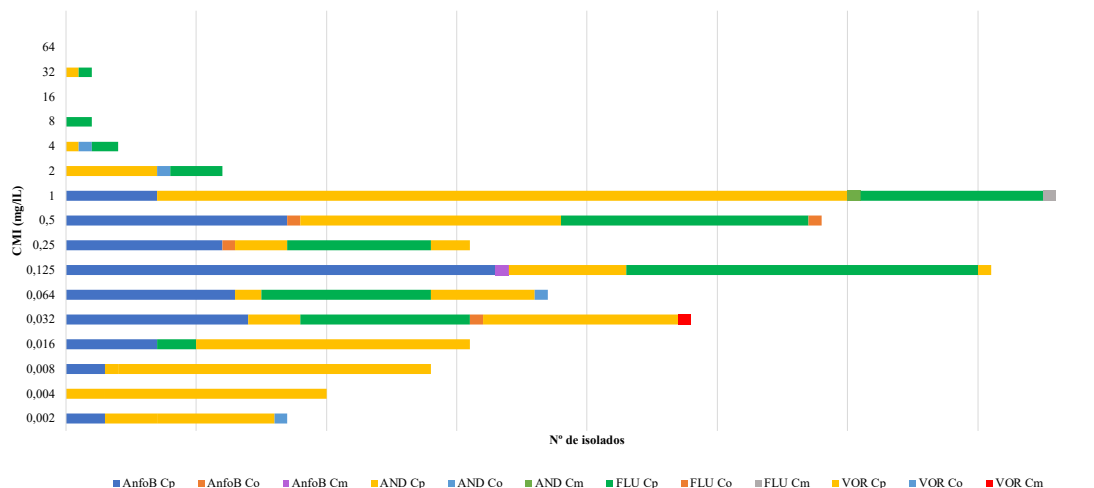


Figura 6.3. Perfis de susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos para *C. parapsilosis* (Cp), *C. orthopsilosis* (Co) e *C. metapsilosis* (Cm). Anfotericina B (AnfoB), anidulafungina (AND), fluconazol (FLU) e voriconazol (VOR).

6.4.2 Integração dos perfis de susceptibilidade com os dados clínico epidemiológicos

Quando foi avaliado a potencial variação na susceptibilidade microbiológica dos isolados obtidos dos doentes ao longo do tempo (2020-2022) verificou-se que não havia variação de mais de uma diluição nos perfis de susceptibilidade *in vitro*. Além disso, para a UCI do HBA, na qual o estudo foi efetuado continuamente durante 14 meses, a CMI50 e a CMI90 mantiveram-se estáveis ao longo do tempo. Igualmente, as taxas de fenótipos resistentes observadas para cada unidade hospitalar refletiram valores de CMI semelhantes com variações de 0,5% a 0,6% (Tabela 6.5). Quando os valores de corte clínicos definidos pelo EUCAST, foram aplicados sobre os isolados dos doentes, as duas UCI em estudo do HFF evidenciaram susceptibilidades de 96,4% e a UCI do HBA de 94,8%.

Tabela 6.5. Perfil de resistências dos isolados de *Candida* spp. nas UCI das unidades hospitalares em estudo^{1,2}.

<i>Candida</i> spp.	Antifúngicos							
	Fluconazol		Voriconazol		Anfotericina B		Anidulafungina	
	HFF	HBA	HFF	HBA	HFF	HBA	HFF	HBA
<i>C. albicans</i>	1/34 (3,9)	2/99 (2,0)	0/34 (0,0)	1/99 (1,0)	0/34 (0,0)	0/99 (0,0)	0/34 (0,0)	2/99 (2,0)
<i>C. parapsilosis</i>	1/37 (2,7)	1/52 (1,9)	0/37 (0,0)	0/52 (0,0)	0/37 (0,0)	0/52 (0,0)	1/37 (2,7)	0/52 (0,0)
<i>C. glabrata</i>	0/8 (0,0)	2/16 (12,5)	0/8 (0,0)	0/16 (0,0)	0/8 (0,0)	0/16 (0,0)	0/8 (0,0)	0/16 (0,0)
<i>C. tropicalis</i>	0/5 (0,0)	0/8 (0,0)	0/5 (0,0)	0/8 (0,0)	0/5 (0,0)	0/8 (0,0)	0/5 (0,0)	1/8 (12,5)
Total	2/84 (2,4)	5/175 (2,9)	0/84 (0,0)	1/175 (0,6)	0/84 (0,0)	0/175 (0,0)	1/84 (1,2)	3/175 (1,7)

¹Os dados são apresentados em n (%), salvo indicação em contrário.

²Esta Tabela inclui os 259 isolados de *Candida* analisados nos 675 doentes em UCI para os quais estão definidos valores de corte clínicos ou epidemiológicos. As outras 2 espécies de *Candida* spp. não incluídas na tabela foram *C. lusitanae* (n=4), *C. guilliermondii* (n=3).

É interessante notar que foram observados mais fenótipos de resistência ao fluconazol e à anidulafungina no HBA (Fig. 6.4). Além disso, é relevante mencionar que, nas duas unidades hospitalares, esses fenótipos de resistência foram observados em espécies de *Candida* tradicionalmente suscetíveis aos azóis: *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Dos fenótipos de resistência observados, 44,4% (4/9) foram identificados em amostras colhidas durante o internamento na UCI, embora este facto não tenha sido estatisticamente significativo ($p=0,635$).

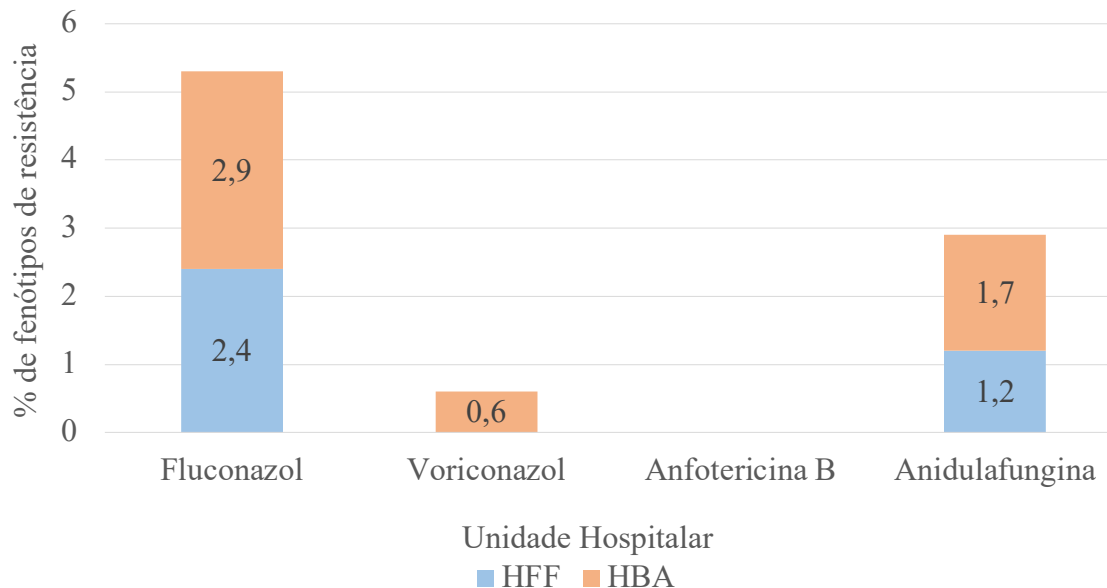


Figura 6.4. Prevalência global dos fenótipos de resistência nos isolados de *Candida* spp. em cada unidade hospitalar.

Para os isolados que evidenciaram fenótipos de resistência para os azóis e anidulafungina ilustraram-se respetivamente as características clínicas e sociodemográficas dos doentes (Tabela 6.6). Apenas a presença de ventilação mecânica assistida se mostrou associada à resistência aos azóis ($p = 0,016$). Não foram encontradas associações estatisticamente significativas para os outros factores predisponentes para infeção fúngica, como as doenças subjacentes e a terapêutica antimicrobiana concomitante.

Tabela 6.6. Principais características demográficas, clínicas e microbiológicas dos doentes com perfis fenotípicos de resistência aos azóis e equinocandinas (n= 9).

	Doente 1/ D8	Doente 2/ D1/D5	Doente 3/ D8	Doente 4/ D1	Doente 5/ D1	Doente 6/ D1 e D5	Doente 7/ D1	Doente 8/ D1	Doente 9/ D1	<i>p</i>
Unidade de Saúde	HFF (UCIP)	HFF (UCICRE)	HBA	HBA	HBA	HBA	HBA	HFF (UCIP)	HBA	0,692
Género	Masculino	Masculino	Feminino	Feminino	Feminino	Masculino	Masculino	Feminino	Feminino	0,819
Idade, anos	77	79	62	65	79	68	41	68	79	
<i>Candida</i> spp.	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	0,402
CMI [mg/L]										NA
Fluconazol	8,0	8,0	8,0	32	32					
Voriconazol	0,125	0,125	0,125	32	0,125					
Anidulafungina						1,0	2,0	32	0,250	
Doença subjacente	Doença respiratória /DMII ¹	Doença respiratória	Doença oncológica	Doença oncológica	DCV ²	DCV ²	Hb <10 mg/dl	Doença respiratória	Doença respiratória	0,500
Intervenções Médicas	CVC ³ /VA ⁴ /CV ⁵	CVC ³ /VA ⁴ /CV ⁵	Nenhum	CVC ³ /VA ⁴ /CV ⁵	CVC ³ /VA ⁴ /CV ⁵ /C ⁶	Ausentes	CVC ³	CV ⁵	CV ⁵	0,016
Terapêutica antibiótica	CTX ⁷ /Meropenem/ PIP-TZM ⁸	PIP-TZM ⁸	Quinolona	Nenhum	Nenhum	Meropenem	Não	Clarithromicina /AMC ⁹	Não	0,477
Terapêutica antivírica	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	0,658
Terapêutica antifúngica	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Fluconazol	0,165
Interpretação clínica	Colonização	Colonização	Colonização	Colonização	Colonização	Colonização	Colonização	Colonização	Colonização	NA
Sobrevivência a 3 meses	ND	ND	Não	Sim	Não	Não	Não	ND	Sim	0,792

¹Diabetes *mellitus* tipo II; ²Doença Cardiovascular; ³Cateter Vascular Central; ⁴Ventilação Assistida; ⁵Cateter Vesical; ⁶Cirurgia; ⁷Ceftriaxona; ⁸Piperacilina-Tazobactam; ⁹Amoxicilina com ácido clavulânico. NA: não se aplica. ND: não disponível.

6.5 Discussão

Este trabalho constitui o primeiro estudo piloto multicêntrico prospetivo em Portugal, para a caracterização do perfil antifúngico de isolados de *Candida* provenientes de doentes em UCI. Embora estudos semelhantes a este tenham sido realizados noutros países, a situação atual em Portugal relacionada com a susceptibilidade/resistência a antifúngicos de isolados clínicos de *Candida* de doentes internados em UCI é desconhecida, motivo este que torna este estudo de extrema relevância.

Questões práticas relacionadas com o TSAF para Candida spp.

As organizações responsáveis por definir os pontos de corte clínicos (CBP) de referência (EUCAST e CLSI) têm vindo a padronizar os valores, embora ainda existam diferenças substanciais (143, 249). De acordo com estudos anteriores, a interpretação dos CBP do E-test® é válida com os valores propostos pelo EUCAST (249, 332), razão pela qual foram utilizados nesta investigação as diretrizes interpretativas dos antifungigramas do EUCAST.

Relativamente ao estudo da susceptibilidade *in vitro* às diferentes classes de antifúngicos, a correlação das equinocandinas com os resultados clínicos ainda continua a ser objeto de discussão. No entanto, já há evidências concretas que mutações *FKS* em *C. albicans*/*glabrata* estão ligadas à falha da terapêutica (337). Acrescente-se que dada a instabilidade da caspofungina, tanto o CLSI quanto o EUCAST recomendam unanimemente que, para a interpretação dos testes de susceptibilidade antifúngica, sejam utilizadas as leituras da CMI de anidulafungina ou micafungina em vez das de caspofungina (325). Por conseguinte, neste estudo foi testada a anidulafungina, como um marcador da classe das equinocandinas. Refere-se que durante um período curto, por indisponibilidade do fornecedor, a caspofungina foi utilizada e efetivamente foi encontrado um número mais elevado de isolados com susceptibilidade reduzida entre as espécies de *Candida*. Esses isolados foram testados novamente com anidulafungina e revelaram fenótipos suscetíveis. Estas observações são concordantes com estudos anteriores que mostraram a ambiguidade na interpretação da CMI da caspofungina (457).

Salsé e colaboradores mostraram que os ECV da anidulafungina identificaram 92% dos mutantes em *FKS* como isolados não WT (contra 75% e 84% com os ECV da caspofungina e micafungina, respetivamente) (339). Os autores concluíram que os ECV da anidulafungina poderiam representar um marcador substituto para a triagem da resistência às equinocandinas em *Candida* spp., utilizando os pontos de corte pelos critérios do CLSI, como também já tinha sido sugerido por Pfaller e colaboradores (143, 339).

Dados relativamente robustos suportam os valores da CMI para os azóis e *C. albicans* enquanto parece menos evidente para as CNA, em particular para *C. glabrata*, para a qual tanto o CLSI quanto o EUCAST se abstêm de uma categorização clara e consideram a maioria dos isolados, respetivamente, na categoria de susceptível-dependente da dose (SDD) ou susceptível à exposição aumentada (I) (340, 458).

O papel e a interpretação dos TSAF em CNA que não *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis* ainda não estão completamente clarificados. Como na coorte estudada mais de 98% dos isolados de *Candida* estão compreendidos nas espécies para as quais existem pontos de corte clínicos, não foi complicado nem sequer questionável a interpretação dos resultados obtidos.

Neste estudo foi utilizado um método de difusão manual. As tiras E-test® de difusão em gradiente, constituem um método ideal para programas de vigilância global, uma vez que é tecnicamente simples, barato e requer pouco equipamento (249). Os valores da CMI obtidos por difusão de gradiente comparam-se favoravelmente aos valores gerados pela microdiluição do caldo, com um bom acordo essencial (EA) entre os dois métodos na maioria dos casos (331, 334). Além disso, com esta metodologia a discriminação é melhor entre os isolados suscetíveis e resistentes para anfotericina B (332).

Perfis de resistência aos antifúngicos

Em geral, as espécies de *Candida* são bastante suscetíveis aos fármacos antifúngicos e o padrão de susceptibilidade de uma determinada espécie é frequentemente previsível. A relevância da mudança de espectro na etiologia por *Candida*, deve-se ao facto de que algumas espécies não-*albicans* mostram resistência intrínseca (147, 459). Por exemplo, *C. glabrata* e *C. krusei* são menos suscetíveis aos azóis do que outras espécies e *C.*

parapsilosis é menos susceptível às equinocandinas devido aos polimorfismos naturais dos genes *FKS* (71, 342). Porém, podem ocorrer variações em isolados das diferentes espécies de *Candida* e, por conseguinte, estabelecer a susceptibilidade antifúngica é crucial para orientar a terapêutica. Por outro lado, a exposição prolongada aos antifúngicos, pode favorecer a seleção da resistência adquirida de *C. albicans* e de espécies de CNA (234). Os dados clínicos da coorte em estudo evidenciaram que de uma forma geral, os antifúngicos não foram utilizados para profilaxia e/ou tratamento empírico (0,9%). Como tal, não foi surpreendente observar taxas de resistência baixas, particularmente para o fluconazol.

À semelhança dos dados de estudos globais, nos isolados testados neste estudo, a resistência aos azóis foi observada em *C. albicans*, *C. parapsilosis*, e *C. glabrata*, enquanto a resistência às equinocandinas foi observada em *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (128, 337, 460, 461). Os testes de susceptibilidade à anfotericina B não são efetuados na rotina clínico laboratorial para *Candida* spp., uma vez que a resistência microbiológica é pouco frequente, com exceção de *C. lusitaniae* (301). Efetivamente, neste estudo não foram encontrados fenótipos de resistência à anfotericina B. Contudo, torna-se pertinente referir que os valores da CMI para este antifúngico revelaram-se muito próximos do ponto de corte estabelecido pelo EUCAST. Porém, se estes resultados forem comparados com pontos de corte definidos por metodologia E-test® e adotados por Espinel-Ingroff e colaboradores e Salsé e colaboradores que remetem os CBP para valores de CMI de 2mg/L, tal já não se verifica (339, 462).

Padrões de susceptibilidade de Candida spp.

Os azóis são agentes antifúngicos sistémicos eficazes contra a maioria das espécies de *Candida*, embora tenham sido descritos diferentes graus de susceptibilidade entre as espécies (463). Neste trabalho, as taxas globais de resistência foram de 2,7%, e 0,4% para o fluconazol e voriconazol, respetivamente, resultados concordantes com estudos anteriores, particularmente de outros países europeus ocidentais (69).

Os estudos sobre perfis de susceptibilidade a antifúngicos disponíveis em Portugal, no seu conjunto, não são recentes e apresentam amostras reduzidas, o que torna impossível tirar conclusões sobre a dinâmica da resistência a antifúngicos (130, 377).

Comparativamente com os resultados obtidos neste estudo, Faria-Ramos e colaboradores, por microdiluição em caldo com isolados de hemoculturas observaram perfis de resistência mais elevados, 5 e 12% para fluconazol e voriconazol, respetivamente (critérios EUCAST). Já Costa Oliveira e colaboradores, observaram taxas de resistência ao fluconazol mais elevadas, 20% (critérios CLSI). De acordo com um estudo de 2022, Portugal é um dos países que não fornece quaisquer dados sobre a resistência de *Candida* spp. (69).

Estudos realizados a nível nacional em vários países da Europa com isolados de *Candida* provenientes de episódios de fungémia reportaram taxas de resistência ao fluconazol que variam de 2,7% (Islândia) a 9,4% (Dinamarca) (95, 464, 465). Em Espanha, os valores observados para a resistência ao fluconazol variam entre 7,0% (131) e 9,1% (373).

Considerando o perfil de susceptibilidade aos azóis em função da espécie de *Candida*, este estudo encontrou 2,3% de resistência em *C. albicans* para o fluconazol, o que está de acordo com os resultados da literatura que referem taxas relativamente baixas de resistência adquirida aos azóis em *C. albicans* (1-6% em todo o mundo) (9, 325, 337, 466). Um ligeiro aumento da resistência ao fluconazol foi descrito na América Latina, mas permanece abaixo dos 3% (369).

Por oposição, alguns estudos regionais efetuados em países e continentes diferentes (China, Turquia e Egipto) relataram uma taxa de resistência ao fluconazol de 5-20% (144, 357, 467). Igualmente, um estudo a nível nacional na China revelou taxas mais elevadas de resistência ao fluconazol em *C. albicans* (9,6%) e *C. parapsilosis* (19,3%), o que pode ser reflexo de diferenças geográficas (358).

Nos isolados de CNA foi observada uma taxa de resistência baixa aos antifúngicos. A taxa de resistência ao fluconazol nas espécies CNA observada variou de 0,0% (*C. tropicalis*) a 8,3% (*C. glabrata*). Resultados anteriores de Portugal e Espanha detetaram taxas de resistência de 9% e 9,1% para *C. glabrata*, respetivamente (130, 372). Porém vários estudos europeus (67, 128, 372, 461) mostraram um aumento na resistência aos azóis entre as espécies de CNA associadas a candidemia, embora com diferentes percentagens (por exemplo, as percentagens de *C. glabrata* resistente ao fluconazol variam de 2,8% na Islândia (464) a 88,6% na Dinamarca (95)). Num estudo de vigilância global de 20 anos, utilizando os critérios do CLSI, a resistência aos azóis em isolados de

C. glabrata variou de 5,6% a 10,1% (9); contudo, estas taxas foram muito mais elevadas na América do Norte (10,6%) do que na Ásia-Pacífico (6,8%), Europa (4,9%), ou América Latina (2,6%) (337).

O fluconazol foi, ao longo da última década, considerado a principal opção para o tratamento empírico da candidemia invasiva (CI) causada por *Candida parapsilosis* (70). No entanto, diretrizes clínicas recentemente publicadas passaram a recomendar as equinocandinas como fármacos de primeira linha no tratamento desta espécie leveduriforme (468). Paralelamente, têm sido cada vez mais frequentemente reportados isolados de *C. parapsilosis* multirresistentes, incluindo resistência simultânea aos azóis e às equinocandinas, representando um desafio clínico relevante no contexto terapêutico (469, 470). O mecanismo de resistência mais frequentemente registado na prática clínica está associado a mutações específicas como a Y132F no gene *ERG11*, juntamente com a regulação positiva de *MDR1*, que confere resistência cruzada ao fluconazol e ao voriconazol (470). Neste trabalho, 2,2% (2/89) dos isolados de *C. parapsilosis* expressaram fenótipos de resistência e mais 2,2% (2/89) são NWT ao fluconazol, resultados em linha com as taxas globais de resistência ao fluconazol que variam entre 2 e 5% (125). Estudos anteriores efetuados em Portugal também evidenciaram taxas de resistência baixas (0 a 4%) para *C. parapsilosis* (130, 377). Contudo, taxas de resistência muito mais elevadas (15,1 a 90%) foram observadas em alguns países da Europa, Ásia, África e América Latina (128, 472). De facto, os resultados da taxa de resistência obtidos diferem dos resultados de outros países, como Itália ou Israel, onde 33 e 37,8%, respetivamente, dos isolados de *C. parapsilosis* eram resistentes (133, 466). Recentemente, esta espécie, conhecida pela sua capacidade de formar biofilmes, foi associada a um surto clonal de estirpes resistentes ao fluconazol numa UCI francesa, salientando a necessidade de testes de susceptibilidade de rotina aos azóis (471). Do mesmo modo, na Europa, um estudo italiano sobre candidemia de 2014 a 2019, apresentou uma taxa anual de resistência ao fluconazol para *C. parapsilosis* de 11,8% a 32,8% (133). A resistência estava principalmente relacionada com mutações em *ERG11* (463).

As duas espécies crípticas, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, isoladas nesta coorte estão frequentemente associadas a um perfil de susceptibilidade diminuída aos antifúngicos (71, 134). Porém, tal não se verificou neste estudo, em que os resultados das

CMI obtidos foram semelhantes aos de *C. parapsilosis* ss para todas as moléculas testadas. Vigezzi e colaboradores observaram CMI mais baixas para *C. parapsilosis* do que para *C. orthopsilosis* para o itraconazol e CMI mais elevadas para as equinocandinas ($p < 0,01$) (137). Da mesma forma, Gil-Alonso e colaboradores no mesmo ano reportaram que *C. metapsilosis* era a espécie do complexo mais susceptível às equinocandinas, seguida por *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis* (473). No entanto, o número de isolados utilizados nestes estudos foi bastante limitado, exclusivamente isolados de candidemia, pelo que estes resultados podem não refletir claramente a realidade.

Por conseguinte, face aos perfis de susceptibilidade antifúngica do complexo *C. parapsilosis* revelarem apenas diferenças ligeiras entre as três espécies de *Candida*, é sugestivo de que a discriminação das espécies crípticas em rotina não seja necessária para a prática clínica. As discrepâncias dos resultados obtidos com os estudos supracitados, se por lado podem tranquilizar as equipas de cuidados intensivos quanto à terapêutica antifúngica empírica/profilática por outro lado sublinham a necessidade de uma vigilância contínua e do desenvolvimento de estratégias de controlo eficazes para gerir a resistência aos azóis em *C. parapsilosis*.

Para *C. tropicalis* não foi detetado nenhum isolado resistente aos azóis, mas as taxas de resistência descritas noutros estudos chegaram aos 4,9%, com diferenças marcadas entre continentes (337). As taxas de resistência global na Ásia para *C. tropicalis*, mostraram uma sensibilidade relativamente baixa ao fluconazol e voriconazol, 55,6 e 61,1% (474), ou 28,6 e 28,5%, respetivamente (475).

Em relação aos estudos anteriores de susceptibilidade efetuados em Portugal para *C. tropicalis*, há um contraste com os resultados do presente estudo. Utilizando os critérios EUCAST, Faria-Ramos e colaboradores, observaram apenas 67% dos isolados de *C. tropicalis* suscetíveis aos azóis. No entanto, de 2014 a 2022, a concentração do ponto de rutura da resistência EUCAST mudou de 0,125 para 0,250 mg/L, o que pode explicar esta diferença.

Não há dados suficientes para demonstrar uma correlação entre o valor da CMI e o resultado clínico do fluconazol e voriconazol para *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* (249). Vários autores que utilizaram os critérios CLSI referem-se a *C. guilliermondii* como uma espécie que apresenta valores de CMI para o fluconazol intrinsecamente elevados (152, 342), mas os resultados obtidos neste estudo não mostraram esta tendência. Os isolados

de *C. guilliermondii* foram considerados WT com um intervalo de CMI entre 4,0 e 8,0 µg/mL.

A taxa global de resistência à anidulafungina obtida foi de 1,5%, resultados em linha com os publicados por outros autores (373, 457, 461). Os resultados de 20 anos do SENTRY *Antifungal Surveillance Program* demonstraram que a resistência às equinocandinas não mostrou mudanças dramáticas para as cinco espécies de *Candida* mais comuns (112, 337). De facto, a resistência às equinocandinas na Europa parece ainda insignificante (69). Estudos efetuados a nível nacional em isolados de *Candida* spp. de fungémia encontraram taxas de resistência que variam de 0% (Islândia) a 15% (Portugal) para as equinocandinas (caspofungina) (95, 130, 145, 464).

O perfil de resistência à anidulafungina encontrado em função da espécie de *Candida* mostrou a distribuição seguinte: *C. tropicalis* (1/13; 7,7%), *C. albicans* (2/133; 1,5%), e *C. parapsilosis* (1/89; 1,1%). *C. glabrata* e os restantes isolados de *Candida* spp. não mostraram qualquer resistência à anidulafungina. No entanto, Alexander e colaboradores demonstraram que sete dias de exposição à equinocandinas é suficiente para induzir mutações *FKS* em *C. glabrata* (476). Estes autores mostraram que a frequência da resistência às equinocandinas em *C. glabrata* aumentou de 4,9 para 12,3 % entre 2001 e 2010 (476). O traço haploide desta espécie pode explicar em parte o maior nível de expressão da resistência molecular exposta (158). Nesta coorte apenas cinco doentes estavam sob terapêutica profilática com equinocandinas, 4 em 5 eram doentes oncológicos, 3 em 5 doentes diabéticos e destes apenas um estava colonizado por *C. albicans* (D1-D8), isolado que se mostrou susceptível a todas as moléculas antifúngicas estudadas.

A resistência à anidulafungina de 7,7% de *C. tropicalis*, refere-se apenas a um isolado num total de 13 e não é possível tirar conclusões sobre o seu padrão de resistência. Uma das possibilidades para a aquisição de resistência de *C. tropicalis* às equinocandinas é a exposição prévia ao fármaco com tratamentos de curta duração, que não foi o caso neste doente.

Os resultados evidenciaram um intervalo de CMI de 0,002 - 32 mg/L, com MIC90 de 2 mg/L para o complexo de *C. parapsilosis*, valores em linha com os de estudos anteriores (355, 373, 457, 467). Juntamente com *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* é uma das duas

espécies de leveduras com valores de CMI mais elevados para as equinocandinas, mas os três isolados desta espécie mostraram-se WT (100%).

A resistência à anfotericina B continua a ser rara em espécies de *Candida*, com exceção de *C. lusitaniae* apesar da sua utilização em monoterapia durante anos. Isto pode ser devido ao seu efeito fungicida inerente, limitando a seleção de mutantes (477). Igualmente nesta coorte, 75% dos isolados de *C. lusitaniae* mostraram-se NWT.

Os estudos de vigilância chamaram a atenção para o aparecimento de perfis multirresistentes (MDR) entre *C. albicans* e isolados de CNA (475, 477). Nesta coorte, houve ausência de isolados de *Candida* multirresistentes, ou seja, resistentes a mais do que um fármaco de duas ou mais classes de antifúngicos. Estes resultados contrastam com estudos europeus anteriores, incluindo Portugal, que descreveram a emergência de estirpes MDR em *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, e *C. tropicalis* (69, 88, 130, 338). Uma possível explicação para essa ausência é que os isolados nos estudos citados têm origem distinta, sendo provenientes de episódios de candidemia e infeções invasivas, enquanto os deste estudo correspondem a isolados colonizadores.

Factores de influência e relação com as tendências de susceptibilidade

Durante a avaliação da potencial variação na susceptibilidade microbiológica dos isolados obtidos de doentes permanentemente colonizados, observou-se que o padrão de susceptibilidade permaneceu inalterado desde a admissão até o oitavo dia de internamento na UCI. Os resultados mostraram que, mesmo sob a pressão seletiva imposta pelas condições na UCI, os isolados de *Candida spp.* mantiveram a sua susceptibilidade inicial aos antifúngicos. Esta constatação é crucial, pois a emergência de resistência durante a permanência hospitalar é um dos principais desafios na prática clínica.

Dos vários factores descritos que possam favorecer a seleção de resistência adquirida de espécies de *C. albicans* e CNA, a exposição a antifúngicos é um dos mais relevantes (234). Como na coorte colonizada, os dados clínicos dos doentes mostraram que os antifúngicos são pouco utilizados para profilaxia e/ou tratamento empírico (3,5%), não foi surpreendente observar taxas de resistência mais baixas, especialmente para o fluconazol.

Entre os factores extrínsecos relacionados com a UCI, como a presença de CVC ou ventilação assistida, foi identificada uma associação entre os doentes colonizados por isolados com perfis fenotípicos de resistência aos azóis e a ventilação assistida invasiva. A ventilação assistida, particularmente no contexto da pneumonia associada à ventilação mecânica, tem sido associada à utilização de azitromicina e ao seu potencial para atenuar a inflamação pulmonar causada por *Acinetobacter baumannii* multirresistente (479). No entanto, a potencial ligação entre a ventilação assistida e os perfis de resistência aos azóis não é diretamente abordada nestes estudos. É necessária mais investigação para explorar esta potencial associação. A partir dos dados clínicos, tentou-se igualmente associar ao perfil de susceptibilidade antifúngica de *Candida* spp. patologias subjacentes ao internamento em UCI, como infeção respiratória, doença cardiovascular ou oncológica, mas não foi encontrada nenhuma associação com significado estatístico. Face ao exposto, não foi possível tirar conclusões sobre a resistência antifúngica e os factores predisponentes dos doentes, o que pode ser considerado uma limitação deste estudo. Outra possível limitação deste estudo é o facto de se basear em isolados de *Candida* colonizadores, o que dificulta estabelecer uma relação direta com a infeção e, assim, avaliar o impacto clínico dos perfis de resistência observados.

A manutenção do padrão de susceptibilidade observada durante o internamento na UCI, assim como ao longo do tempo para cada UCI em estudo, pode indicar a eficácia das práticas de controlo de infeção e do uso racional de antimicrobianos em UCI.

Para assegurar que os resultados epidemiológicos permanecem consistentes e que as dinâmicas da resistência microbiana são compreendidas, é crucial monitorizar continuamente diferentes contextos hospitalares, incluindo unidades de cuidados continuados. Esta vigilância permite ajustes na abordagem terapêutica, como demonstrado num dos hospitais participante que, perante os elevados índices de colonização por espécies de *Candida* não-*albicans*, alterou a terapêutica antifúngica profilática de azóis para equinocandinas. Assim, a adaptação da prática clínica pode responder rapidamente às mudanças no perfil microbiano e melhorar os resultados.

7. Discussão Geral, Conclusões e Perspetivas futuras

Discussão Geral

A investigação do microbioma em doentes internados em UCI, contribuiu com várias observações importantes, ampliando o conhecimento limitado sobre a epidemiologia da colonização fúngica. A análise dos resultados obtidos permitiu evidenciar a complexidade e a dinâmica da mesma em doentes internados em UCI, sendo particularmente relevante a identificação de factores predisponentes, a caracterização das espécies colonizadoras e a sua susceptibilidade antifúngica.

Desde o segundo capítulo, destacou-se a limitação dos métodos convencionais na identificação precisa de espécies fúngicas. Os resultados obtidos permitiram concluir que as metodologias convencionais ainda são úteis para identificar de forma fiável as espécies fúngicas, particularmente as de *Candida* spp. mais frequentemente isoladas de amostras clínicas. Porém, a incapacidade dos métodos fenotípicos em identificar com precisão espécies leveduriformes não *Candida*, espécies de *Candida* pouco comuns ou crípticas, indica claramente a importância dos testes moleculares, incluindo MALDI-TOF MS. Os ensaios de PCR utilizados permitiram uma identificação fiável das espécies, com o potencial de serem implementados de forma económica em estudos epidemiológicos. Por conseguinte, a introdução de técnicas moleculares revelou-se decisiva, permitindo uma caracterização mais rigorosa das espécies colonizadoras. Nesta investigação, a diversidade de espécies encontrada cingiu-se maioritariamente às espécies de *Candida* mais comuns, sendo *C. albicans* e *C. parapsilosis* as espécies colonizadoras mais prevalentes nos doentes das várias UCI. Não foram isoladas espécies raras e emergentes do género *Candida* e apenas foram isoladas espécies crípticas do complexo *C. parapsilosis*. O predomínio de *C. albicans* foi confirmado, ainda que em proporções quase equivalentes com espécies não-*albicans* (CNA), cujas implicações clínicas e epidemiológicas são cada vez mais relevantes.

No seguimento, o capítulo 3 focou-se na pesquisa de *C. auris*, uma espécie emergente com elevado potencial multirresistente. A ausência de deteção desta espécie em hospitais portugueses contrasta com a sua crescente prevalência em outros contextos internacionais, podendo indicar uma janela de oportunidade para medidas preventivas robustas. Os desafios metodológicos na sua identificação — tanto fenotípica como molecular — sublinham a necessidade de protocolos específicos para detetar

precocemente este fungo leveduriforme. Assim, a implementação do rastreio de *C. auris* em UCI, com a utilização de tecnologias moleculares em conjunto com as tradicionais tornou possível sugerir um protocolo de vigilância em que o meio *Manitol Salt Agar Auris* pode ser utilizado para rastrear possíveis isolados de *C. auris* e a PCR convencional ou MALDI-TOF-MS sejam metodologias passíveis de serem utilizadas para confirmar a identidade dos isolados. Para uma resposta rápida, mas dispendiosa, sugere-se a utilização de qPCR para a deteção de *C. auris* a partir de amostras clínicas.

Ao conhecimento do autor, este trabalho foi o primeiro estudo de vigilância da colonização por *C. auris* em UCI de hospitais terciários portugueses. Um ponto forte é o facto de ter sido especificamente concebido para rastrear *C. auris*, realizado antes e durante o segundo ano da pandemia de SARS-CoV-2 numa coorte de doentes de dois centros hospitalares na região suburbana de Lisboa. Em Portugal, ao conhecimento atual, não existem casos de colonização por *C. auris* e apenas foi notificado um caso clínico. Como tal, os protocolos de controlo de infeção não incluem vigilância para *C. auris*. Porém, a rápida disseminação desta espécie noutros países sugere que os hospitais portugueses devem considerar o rastreio ativo de grupos de risco elevado para permitir a deteção precoce e limitar a sua disseminação. Assim, o algoritmo de rastreio desenvolvido neste estudo pode ser integrado na rotina hospitalar para a deteção precoce de *C. auris*, similarmente ao que já é efetuado para outros microrganismos.

O estudo contribuiu igualmente com várias observações importantes para a informação publicada sobre a epidemiologia da colonização fúngica nas UCI. Nomeadamente, a distribuição das espécies de *Candida*, característica de cada UCI e de cada unidade hospitalar permitiu fornecer diretrizes locais de terapêutica antifúngica profilática e empírica. Particularmente para uma das UCI, a UCIP do HFF, na qual a prevalência de espécies de *Candida* não-*albicans* colonizadoras sugere o reforço da necessidade de um controlo epidemiológico para a gestão da terapêutica antifúngica. Assim, pode concluir-se que cada unidade hospitalar, e respetivas UCI, devem conhecer a própria epidemiologia. Não é possível antecipar a taxa de colonização fúngica em outras unidades hospitalares com base neste estudo. Na UCI do HBA, monitorizada em 2021 e 2022, os resultados indicaram uma estabilidade na distribuição de espécies fúngicas colonizadoras, com prevalência de *C. albicans*.

O capítulo 4 complementou os resultados dos capítulos anteriores, reforçando a associação entre a permanência em UCI e o aumento progressivo da colonização por *Candida* spp.. A taxa crescente de colonização entre o dia 1 e o dia 8 sugere que o ambiente hospitalar e as intervenções clínicas, contribuem decisivamente para esta dinâmica. Note-se que a dinâmica da colonização fúngica no HBA foi igualmente associada a uma menor taxa de sobrevivência a 3 meses, especificamente em doentes colonizados por *C. albicans*. É importante referir que *C. albicans* apesar de apresentar um perfil de susceptibilidade elevada aos antifúngicos utilizados na prática clínica é também a espécie de *Candida* com um maior portfólio de factores de virulência, o que corrobora uma letalidade superior para estes doentes. Assim, a observação de *C. albicans* como marcador de maior mortalidade, mesmo sem correlação direta com infeção invasiva, lança questões pertinentes sobre o papel da colonização na evolução clínica dos doentes.

Perante as observações dos resultados referentes aos factores de risco independentes para colonização fúngica nesta coorte, as equipas clínicas devem dar atenção especial aos doentes em hemodiálise e aos doentes com infeções respiratórias, com a implementação de medidas adaptadas para mitigar o risco de colonização e transmissão de *Candida* nestes grupos de risco.

Com a avaliação do grau de colonização fúngica, utilizando a contagem de unidades formadoras de colónias (UFC), verificou-se que os banhos com gluconato de clorohexidina (GCH), que fazem parte do programa de controlo de infeção preconizado pelo Serviço Nacional de Saúde em Portugal, não reduziram significativamente a aquisição ou descolonização de *Candida* spp. durante o internamento na UCI. Porém, é necessária mais investigação para avaliar o impacto específico dos banhos de GCH na redução de células viáveis fúngicas, particularmente de *Candida* spp.

No decorrer da investigação, os resultados obtidos foram fornecidos aos clínicos de forma atempada o que lhes permitiu tomar precauções para reduzir o risco de infeção. Com a identificação do padrão de colonização por *Candida* spp., ao longo dos dias de internamento, as equipas médicas puderam determinar quais os doentes que poderiam beneficiar de terapia antifúngica profiláctica. Esta percepção, aliada ao conhecimento de que diferentes espécies de *Candida* podem ter diferentes susceptibilidades aos fármacos antifúngicos permitiu que a equipa clínica adaptasse as suas estratégias de tratamento

antifúngico de forma mais eficaz. Perante os resultados de que uma elevada percentagem de doentes estava colonizada com espécies não-*albicans*, uma das instituições hospitalares procedeu à alteração das diretrizes internas de terapêutica antifúngica profilática com a mudança de um azol para um antifúngico da classe das equinocandinas, promovendo desta forma a redução do risco de a colonização do doente evoluir para infeção (candidemia).

No capítulo 5, a análise do micobioma cutâneo permitiu uma compreensão mais profunda da interação entre o estado clínico e a composição fúngica da pele. Quando foram estudados os genomas de uma parte da amostra global em D1 e D8, os resultados forneceram uma perspetiva diferente da diversidade fúngica e observou-se uma maior variedade de géneros fúngicos comparativamente à micobiota encontrada. Para além dos fungos leveduriformes foram igualmente detetados no micobioma destes doentes fungos filamentosos, particularmente na admissão. Porém, a distância filogenética observada mostrou que parte dos doentes estavam colonizados por estirpes adquiridas na UCI e diferentes das colonizadoras à admissão, o que permitiu reiterar a importância do ambiente da UCI sobre a colonização fúngica e eventual transmissão horizontal das estirpes colonizadoras.

Adicionalmente, verificou-se que, a presença de espécies de *Candida* não foi concomitante com o género fúngico potencialmente descrito como o principal colonizador da pele humana, o género *Malassezia*, sugerindo que estes dois géneros se excluem mutuamente quase por completo. O predomínio do género *Candida* em detrimento do género *Malassezia*, associado a estados saudáveis, revela uma disbiose significativa e persistente. Esta substituição pode ser interpretada como um reflexo da perturbação microbiana associada à hospitalização e às práticas clínicas intensivas. Além disso, os resultados sugerem que o micobioma cutâneo pode ser uma janela para monitorizar o estado imunológico e infeccioso do doente, abrindo possibilidades para futuras intervenções terapêuticas personalizadas. Porém, é complicado tirar conclusões dos resultados da metagenómica, pois se por um lado, permite uma melhor compreensão da abundância e diversidade do micobioma, por outro, não reflete com precisão a micobiota viável residente na pele. Assim, é possível concluir que o micobioma da pele em doentes em UCI é composto por poucos géneros fúngicos e é influenciado pelas características demográficas e clínicas dos doentes.

Por fim, o capítulo 6 fornece dados essenciais sobre a susceptibilidade antifúngica das espécies identificadas. O presente estudo constitui a primeira caracterização da susceptibilidade a fármacos antifúngicos de isolados colonizadores de *Candida* spp., juntamente com características clínicas/factores de risco para a colonização fúngica em UCI, em Portugal. Os resultados desta coorte mostraram que a resistência continua a ser pouco comum entre os isolados de *Candida* nas UCI em estudo, embora tenham sido identificados isolados resistentes de espécies de *Candida* tradicionalmente sensíveis às moléculas antifúngicas. Foi possível concluir que os perfis de susceptibilidade se mantiveram ao longo do tempo de permanência dos doentes na UCI, assim como não estão relacionados com a UCI. De acordo com os resultados deste estudo, o fluconazol é uma alternativa aceitável às equinocandinas como terapêutica inicial em doentes que não tiveram exposição prévia a azóis.

Porém, a identificação de casos de resistência a azóis e equinocandinas, mesmo que esporádicos, justifica a manutenção de programas de vigilância antifúngica, particularmente face à ameaça crescente de surtos por *C. parapsilosis* multirresistente em outros países. O estudo realça ainda que a diferenciação entre espécies crípticas, embora de menor relevância clínica no momento atual, pode vir a assumir maior importância perante alterações no panorama epidemiológico. Adicionalmente, apoia-se a necessidade de ter diretrizes de tratamento antifúngico baseadas na epidemiologia local para escolher as opções terapêuticas com a melhor cobertura antifúngica e menor pressão seletiva, idealmente no contexto de um programa de gestão antifúngica.

Este estudo analisou o padrão de susceptibilidade de isolados de espécies de *Candida* em Portugal evidenciando resultados com implicações globais. É sabido que as espécies resistentes raramente se limitam a locais específicos; qualquer área com estirpes altamente resistentes a fármacos pode atuar como um reservatório, a partir do qual as espécies resistentes podem ser transmitidas a outras partes do globo através dos seres humanos, da água, dos produtos agrícolas e dos animais. As informações aqui fornecidas podem ajudar a desenvolver, no futuro, recomendações de tratamento que poderão ter de ser adaptadas a nível global. Por conseguinte, os resultados obtidos com este estudo de vigilância perspetivam um impacto não só nacional, mas também internacional, ao determinar a importância do ambiente de saúde associado na promoção da transmissão de fungos resistentes.

Conclusões e Perspetivas Futuras

A articulação dos vários capítulos desta tese evidenciou a necessidade de uma vigilância micológica integrada nas UCI, que combine a identificação rigorosa das espécies, monitorização do perfil de resistência antifúngica e a avaliação do impacto da colonização fúngica no estado clínico dos doentes. A utilização de metodologias moleculares surge como um factor diferenciador e essencial para uma resposta rápida e eficaz a potenciais surtos ou mudanças no perfil colonizador. A colonização fúngica por *Candida* spp. mostrou-se frequente e crescente durante a permanência em UCI, associando-se a factores de risco específicos e a impactos clínicos relevantes, nomeadamente na sobrevivência a 3 meses. A vigilância ativa para *C. auris* revelou-se oportuna, sendo proposto um protocolo de rastreio integrado. O micobioma cutâneo dos doentes críticos revelou uma disbiose significativa com predomínio de *Candida* spp., indicando uma potencial utilidade como marcador clínico e alvo terapêutico. A susceptibilidade antifúngica das espécies isoladas mantém-se elevada, mas a identificação de isolados resistentes pode justificar programas contínuos de vigilância e gestão antifúngica. Adicionalmente, os resultados reforçam a relevância de considerar o micobioma como um marcador clínico emergente e potencial alvo terapêutico.

Finalmente, os conhecimentos obtidos nesta investigação sobre os padrões de colonização por espécies de *Candida* em UCI contribuíram para a melhoria da qualidade dos cuidados prestados aos doentes críticos. Os resultados alcançados permitiram ajustar de forma mais precisa a terapêutica antifúngica, tanto profilática como empírica, promovendo uma utilização mais racional dos antifúngicos. Esta adequação traduziu-se na redução dos custos associados ao tratamento e no encurtamento do tempo de internamento nas UCI.

A continuidade desta linha de investigação deverá privilegiar estudos multicêntricos, com amostras mais abrangentes, representativas de diferentes regiões geográficas, combinando metodologias clássicas com abordagens metagenómicas. Tal integração permitirá aprofundar a compreensão da relação entre a diversidade fúngica, os estados de disbiose e a evolução clínica dos doentes.

A validação de biomarcadores micológicos preditivos de risco de infeção e mortalidade poderá constituir um avanço determinante na aplicação da micologia clínica

à medicina de precisão. Neste contexto, torna-se essencial expandir o conhecimento sobre as complexas interações entre o microbioma e a saúde humana, com especial enfoque na sua influência sobre a resposta imunitária, o prognóstico e a susceptibilidade a infeções.

Os dados aqui apresentados representam uma base promissora para o desenvolvimento de novas estratégias de vigilância e intervenção, orientadas pela caracterização do microbioma. Entre estas, destaca-se a investigação do potencial da diversidade e densidade fúngica da pele como indicador precoce de infeção fúngica, o que poderá abrir caminho para novas abordagens diagnósticas e terapêuticas em ambiente hospitalar.

8. Referências Bibliográficas

Referências bibliográficas

1. Blackwell M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am J Bot.* 2011;98(3):426-38.
2. Freitas G, Vaz CP. Micologia Médica. 2014. Micologia Médica. Em *Microbiologia Médica* volume 2, Editor Lidel, pág 285-400.
3. Köhler JR, Casadevall A, Perfect J. The spectrum of fungi that infects humans. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;5(1):a019273.
4. Life-Worldwide.org. Available from: <https://en.fungaleducation.org/factsheets/>. consultado em dezembro de 2023.
5. Aydın S, Mert A, Yılmaz M, Al Maslamani M, Rahimi BA, Ayoade F, et al. Understanding clinical outcomes and factors influencing mortality in intensive care unit patients with COVID-19-associated candidemia. *Mycoses.* 2024;67(1):e13687.
6. Denning DW. Global incidence and mortality of severe fungal disease. *Lancet Infect Dis.* 2024. 24(7):e428-e438.
7. Lass-Flörl C, Kanj SS, Govender NP, Thompson GR, Ostrosky-Zeichner L, Govrins MA. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers.* 2024;10(1):20.
8. Alenazy H, Alghamdi A, Pinto R, Daneman N. *Candida* colonization as a predictor of invasive candidiasis in non-neutropenic ICU patients with sepsis: A systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis.* 2021;102:357-62.
9. Lamoth F, Lockhart SR, Berkow EL, Calandra T. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(suppl_1):i4-i13.
10. Parslow BY, Thornton CR. Continuing Shifts in Epidemiology and Antifungal Susceptibility Highlight the Need for Improved Disease Management of Invasive Candidiasis. *Microorganisms.* 2022;10(6).
11. Tiew PY, Mac Aogain M, Ali NABM, Thng KX, Goh K, Lau KJX, et al. The Mycobiome in Health and Disease: Emerging Concepts, Methodologies and Challenges. *Mycopathologia.* 2020; 185(2):207-231.
12. Consortium HMP. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012;486(7402):207-14.
13. Cui L, Morris A, Ghedin E. The human mycobiome in health and disease. *Genome Med.* 2013;5(7):63.
14. Underhill DM, Iliev ID. The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(6):405-16.
15. Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MC, Charles T, et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome.* 2020;8(1):103.
16. Nilsson RH, Anslan S, Bahram M, Wurzbacher C, Baldrian P, Tedersoo L. Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(2):95-109.
17. Kambouris M. E. VA. Myc(et)obiome: The Big Uncle in the Family. In: Manousos E. Kambouris AV, editor. In *Translational and Applied Genomics*: Academic Press; 2020. p. 29-52.
18. Hagihara M, Kato H, Shibata Y, Umemura T, Ariyoshi T, Hirai J, et al. Mycobiome and Mycobiome-Associated Diseases. *Med Mycol J.* 2023;64(3):55-62.
19. Seed PC. The human mycobiome. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;5(5):a019810.

20. Belvoncikova P, Splichalova P, Videnska P, Gardlik R. The Human Mycobiome: Colonization, Composition and the Role in Health and Disease. *J Fungi (Basel)*. 2022;8(10).
21. Jo JH, Kennedy EA, Kong HH. Topographical and physiological differences of the skin mycobiome in health and disease. *Virulence*. 2017;8(3):324-33.
22. Leong C, Schmid B, Toi MJ, Wang J, Irudayaswamy AS, Goh JPZ, et al. Geographical and Ethnic Differences Influence Culturable Commensal Yeast Diversity on Healthy Skin. *Front Microbiol*. 2019;10:1891.
23. Mishra K, Bukavina L, Ghannoum M. Symbiosis and Dysbiosis of the Human Mycobiome. *Front Microbiol*. 2021;12:636131.
24. Fan Y, Wu L, Zhai B. The mycobiome: interactions with host and implications in diseases. *Curr Opin Microbiol*. 2023;75:102361.
25. Caetano CF, Gaspar C, Martinez-de-Oliveira J, Palmeira-de-Oliveira A, Rolo J. The Role of Yeasts in Human Health: A Review. *Life (Basel)*. 2023;13(4):924.
26. Lai GC, Tan TG, Pavelka N. The mammalian mycobiome: A complex system in a dynamic relationship with the host. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2019;11(1):e1438.
27. Lagunes L, Rello J. Invasive candidiasis: from mycobiome to infection, therapy, and prevention. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016;35(8):1221-6.
28. Tong X, Leung MHY, Wilkins D, Cheung HHL, Lee PKH. Neutral Processes Drive Seasonal Assembly of the Skin Mycobiome. *mSystems*. 2019;4(2):e00004-19..
29. Thomas-Rüddel DO, Schlattmann P, Pletz M, Kurzai O, Bloos F. Risk Factors for Invasive *Candida* Infection in Critically Ill Patients: A Systematic Review and Meta-analysis. *Chest*. 2022;161(2):345-55.
30. Soriano A, Honore PM, Puerta-Alcalde P, Garcia-Vidal C, Pagotto A, Gonçalves-Bradley DC, et al. Invasive candidiasis: current clinical challenges and unmet needs in adult populations. *J Antimicrob Chemother*. 2023;78(7):1569-85.
31. Soulountsi V, Schizodimos T, Kotoulas SC. Deciphering the epidemiology of invasive candidiasis in the intensive care unit: is it possible? *Infection*. 2021; 49, 1107-1131.
32. Membrillo de Novales FJ, Ramírez-Olivencia G, Mata Forte MT, Zamora Cintas MI, Simón Sacristán MM, Sánchez de Castro M, et al. The Impact of Antibiotic Prophylaxis on a Retrospective Cohort of Hospitalized Patients with COVID-19 Treated with a Combination of Steroids and Tocilizumab. *Antibiotics (Basel)*. 2023;12(10):1515.
33. Francisco EC, Hagen F. JMM Profile: *Trichosporon* yeasts: from superficial pathogen to threat for haematological-neutropenic patients. *J Med Microbiol*. 2022;71(12).
34. Zhu T, Duan YY, Kong FQ, Galzote C, Quan ZX. Dynamics of Skin Mycobiome in Infants. *Front Microbiol*. 2020;11:1790.
35. Findley K, Oh J, Yang J, Conlan S, Deming C, Meyer JA, et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature*. 2013;498(7454):367-70.
36. Blot S, Dimopoulos G, Rello J, Vogelaers D. Is *Candida* really a threat in the ICU? *Curr Opin Crit Care*. 2008;14(5):600-4.
37. Briano F, Magnasco L, Sepulcri C, Dettori S, Dentone C, Mikulska M, et al. *Candida auris* Candidemia in Critically Ill, Colonized Patients: Cumulative Incidence and Risk Factors. *Infect Dis Ther*. 2022;11(3):1149-60.

38. Colombo AL, Padovan AC, Chaves GM. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. Clin Microbiol Rev. 2011;24(4):682-700.
39. Guo LN, Yu SY, Hsueh PR, Al-Hatmi AMS, Meis JF, Hagen F, et al. Invasive Infections Due to *Trichosporon*: Species Distribution, Genotyping, and Antifungal Susceptibilities from a Multicenter Study in China. J Clin Microbiol. 2019;57(2).
40. Brandt ME, Lockhart SR. Recent Taxonomic Developments with *Candida* and Other Opportunistic Yeasts. Curr Fungal Infect Rep. 2012;6(3):170-7.
41. Wirth F, Goldani LZ. Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2012;2012:465717.
42. Ioannou P, Vamvoukaki R, Samonis G. *Rhodotorula* species infections in humans: A systematic review. Mycoses. 2019;62(2):90-100.
43. Huang JJ, Chen XF, Tsui CKM, Pang CJ, Hu ZD, Shi Y, et al. Persistence of an epidemic cluster of epidemic cluster of *Rhodotorula mucilaginosa* in multiple geographic regions in China and the emergence of a 5-flucytosine resistant clone. Emerg Microbes Infect. 2022;11(1):1079-89.
44. Sharon C-A Chen JP, Arnaldo L Colombo*, Oliver A Cornely*, Andreas H Groll, Danila Seidel, Kerstin Albus, João Nobrega de Almeida Jr, Guillermo Garcia-Effron, Nicole Gilroy, Cornelia Lass-Flörl, Luis Ostrosky-Zeichner, Livio Pagano, Tamas Papp, Riina Rautemaa-Richardson, Jon Salmanton-García, Andrej Spec, Joerg Steinmann, Sevtap Arikian-Akdagli, Dorothee E Arenz, Rosanne Sprute, Luisa Duran-Graeff, Tomas Freiburger, Corrado Girmenia, Michelle Harris, Souha S Kanj, Maryam Roudbary, Olivier Lortholary, Joseph Meletiadis, Esther Segal, Felipe Francisco Tuon, Nathan Wiederhold, Tihana Bicanic, Jagdish Chander, Yee-Chun Chen, Po-Ren Hsueh, Margaret Ip, Patricia Munoz, Isabel Spriet, Elvis Temfack, Luis Thompson, Anna Maria Tortorano, Aristeia Velegraki, Nelesh P Govender*. Global guideline for the diagnosis and management of rare yeast infections: an initiative of the ECMM in cooperation with ISHAM and ASM. The Lancet Infectious Diseases. 2021;21 (12):e375-e86.
45. Vijaya Chandra SH, Srinivas R, Dawson TL, Common JE. Cutaneous *Malassezia*: Commensal, Pathogen, or Protector?. Front Cell Infect Microbiol. 2020;10:614446.
46. Li H, Goh BN, Teh WK, Jiang Z, Goh JPZ, Goh A, et al. Skin Commensal *Malassezia globosa* Secreted Protease Attenuates *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. J Invest Dermatol. 2018;138(5):1137-45.
47. Saheb Kashaf S, Proctor DM, Deming C, Saary P, Hölzer M, Taylor ME, et al. Integrating cultivation and metagenomics for a multi-kingdom view of skin microbiome diversity and functions. Nat Microbiol. 2022;7(1):169-79.
48. Rhimi W, Theelen B, Boekhout T, Otranto D, Cafarchia C. spp. Yeasts of Emerging Concern in Fungemia. Front Cell Infect Microbiol. 2020;10:370.
49. Saunders CW, Scheynius A, Heitman J. *Malassezia* fungi are specialized to live on skin and associated with dandruff, eczema, and other skin diseases. PLoS Pathog. 2012;8(6):e1002701.
50. Gushiken AC, Saharia KK, Baddley JW. Cryptococcosis. Infect Dis Clin North Am. 2021;35(2):493-514.
51. Zhao Y, Ye L, Zhao F, Zhang L, Lu Z, Chu T, et al. *Cryptococcus neoformans*, a global threat to human health. Infect Dis Poverty. 2023;12(1):20.
52. Beardsley J, Dao A, Keighley C, Garnham K, Halliday C, Chen SC, et al. What's New in *Cryptococcus gattii*: From Bench to Bedside and Beyond. J Fungi (Basel). 2022;9(1):41.

53. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:18026.
54. Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 2013;62(Pt 1):10-24.
55. Naglik JR, Moyes DL, Wächter B, Hube B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect*. 2011;13(12-13):963-76.
56. Lim SJ, Mohamad Ali MS, Sabri S, Muhd Noor ND, Salleh AB, Oslan SN. Opportunistic yeast pathogen *Candida* spp.: Secreted and membrane-bound virulence factors. *Med Mycol*. 2021;59(12):1127-44.
57. Shao TY, Haslam DB, Bennett RJ, Way SS. Friendly fungi: symbiosis with commensal *Candida albicans*. *Trends Immunol*. 2022;43(9):706-17.
58. Day AW, Kumamoto CA. Interplay between host and *Candida albicans* during commensal gut colonization. *PLoS Pathog*. 2023;19(9):e1011607.
59. Shao TY, Kakade P, Witchley JN, Frazer C, Murray KL, Ene IV, et al. *Candida albicans* oscillating UME6 expression during intestinal colonization primes systemic Th17 protective immunity. *Cell Rep*. 2022;39(7):110837.
60. Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, Steinbach WJ, Baddley JW, Verweij PE, et al. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis*. 2020;71(6):1367-76.
61. Poissy J, Rouzé A, Cornu M, Nseir S, Sendid B. The Changing Landscape of Invasive Fungal Infections in ICUs: A Need for Risk Stratification to Better Target Antifungal Drugs and the Threat of Resistance. *J Fungi (Basel)*. 2022;8(9):946.
62. Costa-de-Oliveira S, Rodrigues AG. Antifungal Resistance and Tolerance in Bloodstream Infections: The Triad Yeast-Host-Antifungal. *Microorganisms*. 2020;8(2):154.
63. Keighley CL, Pope A, Marriott DJE, Chapman B, Bak N, Daveson K, et al. Risk factors for candidaemia: A prospective multi-centre case-control study. *Mycoses*. 2021;64(3):257-63.
64. Chakrabarti A, Sood P, Rudramurthy SM, Chen S, Kaur H, Capoor M, et al. Incidence, characteristics and outcome of ICU-acquired candidemia in India. *Intensive Care Med*. 2015;41(2):285-95.
65. Charles PE, Dalle F, Aube H, Doise JM, Quenot JP, Aho LS, et al. *Candida* spp. colonization significance in critically ill medical patients: a prospective study. *Intensive Care Med*. 2005;31(3):393-400.
66. Koehler P, Stecher M, Cornely OA, Koehler D, Vehreschild MJGT, Bohlius J, et al. Morbidity and mortality of candidaemia in Europe: an epidemiologic meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(10):1200-12.
67. Bassetti M, Giacobbe DR, Vena A, Trucchi C, Ansaldi F, Antonelli M, et al. Incidence and outcome of invasive candidiasis in intensive care units (ICUs) in Europe: results of the EUCANDICU project. *Crit Care*. 2019;23(1):219.
68. Ricotta EE, Lai YL, Babiker A, Strich JR, Kadri SS, Lionakis MS, et al. Invasive Candidiasis Species Distribution and Trends, United States, 2009-2017. *J Infect Dis*. 2021;223(7):1295-302.
69. Galia L, Pezzani MD, Compri M, Callegari A, Rajendran NB, Carrara E, et al. Surveillance of Antifungal Resistance in Candidemia Fails to Inform Antifungal Stewardship in European Countries. *J Fungi (Basel)*. 2022;8(3).

70. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016;62(4):e1-50.
71. Branco J, Miranda IM, Rodrigues AG. *Candida parapsilosis* Virulence and Antifungal Resistance Mechanisms: A Comprehensive Review of Key Determinants. *J Fungi (Basel)*. 2023;9(1):80.
72. Daniel HM, Lachance MA, Kurtzman CP. On the reclassification of species assigned to *Candida* and other anamorphic ascomycetous yeast genera based on phylogenetic circumscription. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2014;106(1):67-84.
73. Spallone A, Schwartz IS. Emerging Fungal Infections. *Infect Dis Clin North Am*. 2021;35(2):261-77.
74. Kidd SE, Abdolrasouli A, Hagen F. Fungal Nomenclature: Managing Change is the Name of the Game. *Open Forum Infect Dis*. 2023;10(1):ofac559.
75. Turner SA, Butler G. The *Candida* pathogenic species complex. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(9):a019778.
76. Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology (Reading)*. 1995;141 (Pt 7):1507-21.
77. Tietz HJ, Hopp M, Schmalreck A, Sterry W, Czaika V. *Candida africana* sp. nov., a new human pathogen or a variant of *Candida albicans*? *Mycoses*. 2001;44(11-12):437-45.
78. Correia A, Sampaio P, James S, Pais C. *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006;56(Pt 1):313-7.
79. Alcoba-Flórez J, Méndez-Alvarez S, Cano J, Guarro J, Pérez-Roth E, del Pilar Arévalo M. Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus. *J Clin Microbiol*. 2005;43(8):4107-11.
80. Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol*. 2005;43(1):284-92.
81. Cendejas-Bueno E, Kolečka A, Alastruey-Izquierdo A, Theelen B, Groenewald M, Kostrzewa M, et al. Reclassification of the *Candida haemulonii* complex as *Candida haemulonii* (*C. haemulonii* group I), *C. duobushaemulonii* sp. nov. (*C. haemulonii* group II), and *C. haemulonii* var. *vulnera* var. nov.: three multiresistant human pathogenic yeasts. *J Clin Microbiol*. 2012;50(11):3641-51.
82. Francisco EC, de Jong AW, Colombo AL. *Candida haemulonii* Species Complex: A Mini-review. *Mycopathologia*. 2023;188(6):909-17.
83. Colombo AL, Guimarães T, Sukienik T, Pasqualotto AC, Andreotti R, Queiroz-Telles F, et al. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. *Intensive Care Med*. 2014;40(10):1489-98.
84. Kohlenberg A, Struelens MJ, Monnet DL, Plachouras D, Group TCASC. *Candida auris* epidemiological situation, laboratory capacity and preparedness in European Union and European Economic Area countries, 2013 to 2017. *Euro Surveill*. 2018;23(13), 18-00136.
85. Dewaele K, Lagrou K, Frans J, Hayette MP, Vernelen K. Hospital Laboratory Survey for Identification of *Candida auris* in Belgium. *J Fungi (Basel)*. 2019;5(3):84.

86. Martins-Santana L, Rezende CP, Rossi A, Martinez-Rossi NM, Almeida F. Addressing Microbial Resistance Worldwide: Challenges over Controlling Life-Threatening Fungal Infections. *Pathogens*. 2023;12(2):293.
87. Sullivan DJ, Moran GP, Coleman DC. *Candida dubliniensis*: ten years on. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;253(1):9-17.
88. Sharma M, Chakrabarti A. Candidiasis and Other Emerging Yeasts. *Curr Fungal Infect Rep*. 2023;1-10.
89. Arita GS, Vincenzi Conrado PC, Sakita KM, Vilugron Rodrigues-Vendramini FA, Faria DR, Kioshima ES, et al. Serial systemic candidiasis alters *Candida albicans* macromorphology associated with enhancement of virulence attributes. *Microb Pathog*. 2022;164:105413.
90. Saiprom N, Wongsuk T, Oonant W, Sukphopetch P, Chantratita N, Boonsilp S. Characterization of Virulence Factors in *Candida* Species Causing Candidemia in a Tertiary Care Hospital in Bangkok, Thailand.. *J Fungi (Basel)*. 2023;9(3):353.
91. Staniszevska M. Virulence Factors in *Candida* species. *Curr Protein Pept Sci*. 2020;21(3):313-23.
92. Brescini L, Mazzanti S, Morroni G, Pallotta F, Masucci A, Orsetti E, et al. Candidemia in Internal Medicine: Facing the New Challenge. *Mycopathologia*. 2022;187(2-3):181-8.
93. Macias-Paz IU, Pérez-Hernández S, Tavera-Tapia A, Luna-Arias JP, Guerra-Cárdenas JE, Reyna-Beltrán E. *Candida albicans* the main opportunistic pathogenic fungus in humans. *Rev Argent Microbiol*. 2022; 55(2):189-198.
94. Ture Z, Alp E. Infection control measures to prevent hospital transmission of *Candida*. *Hosp Pract (1995)*. 2018;46(5):253-7.
95. Astvad KMT, Johansen HK, Røder BL, Rosenvinge FS, Knudsen JD, Lemming L, et al. Update from a 12-Year Nationwide Fungemia Surveillance: Increasing Intrinsic and Acquired Resistance Causes Concern. *J Clin Microbiol*. 2018;56(4).
96. Khan Z, Ahmad S, Joseph L, Chandy R. *Candida dubliniensis*: an appraisal of its clinical significance as a bloodstream pathogen. *PLoS One*. 2012;7(3):e32952.
97. Klesiewicz K, Mrowiec P, Kania K, Skiba-Kurek I, Białecka J, Namysł M, et al. Prevalence of Closely Related *Candida albicans* Species among Patients with Vulvovaginal Candidiasis in Southern Poland Based on the hwp 1 Gene Amplification. *Pol J Microbiol*. 2023;72(1):69-77.
98. Khedri S, Santos ALS, Roudbary M, Hadighi R, Falahati M, Farahyar S, et al. Iranian HIV/AIDS patients with oropharyngeal candidiasis: identification, prevalence and antifungal susceptibility of *Candida* species. *Lett Appl Microbiol*. 2018;67(4):392-9.
99. Tahir M, Peseski AM, Jordan SJ. Case Report: *Candida dubliniensis* as a Cause of Chronic Meningitis. *Front Neurol*. 2020;11:601242.
100. Kakehi A, Hagiya H, Iio K, Nakano Y, Ihoriya H, Taira Y, et al. *Candida dubliniensis* fungemia in a patient with severe COVID-19: A case report. *J Infect Chemother*. 2022;28(10):1433-5.
101. Fotedar R, Al-Hedaithy SS. *Candida dubliniensis* at a university hospital in Saudi Arabia. *J Clin Microbiol*. 2003;41(5):1907-11.
102. Arastehfar A, Yazdanpanah S, Bakhtiari M, Fang W, Pan W, Mahmoudi S, et al. Epidemiology of candidemia in Shiraz, southern Iran: A prospective multicenter study (2016-2018). *Med Mycol*. 2021;59(5):422-30.
103. Lockhart SR. Do hospital microbiology laboratories still need to distinguish *Candida albicans* from *Candida dubliniensis*? *J Clin Microbiol*. 2011;49(12):4415.

104. Díaz-García J, Alcalá L, Martín-Rabadán P, Mesquida A, Sánchez-Carrillo C, Reigadas E, et al. Susceptibility of uncommon *Candida* species to systemic antifungals by the EUCAST methodology. *Med Mycol*. 2020;58(6):848-51.
105. Khaksar Baniasadi A, Ayatollahi Mosavi SA, Sharifi I, Bamorovat M, Salari S, Ahmadi A, et al. Vulvovaginal candidiasis in Iranian women: Molecular identification and antifungal susceptibility pattern. *J Obstet Gynaecol Res*. 2022;48(12):3292-303.
106. Shan Y, Fan S, Liu X, Li J. Prevalence of *Candida albicans*-closely related yeasts, *Candida africana* and *Candida dubliniensis*, in vulvovaginal candidiasis. *Med Mycol*. 2014;52(6):636-40.
107. Shokoohi G, Javidnia J, Mirhendi H, Rasekh-Jahromi A, Rezaei-Matehkolaei A, Ansari S, et al. Molecular identification and antifungal susceptibility profiles of *Candida dubliniensis* and *Candida africana* isolated from vulvovaginal candidiasis: A single-centre experience in Iran. *Mycoses*. 2021;64(7):771-9.
108. Kumar S, Kumar A, Roudbary M, Mohammadi R, Černáková L, Rodrigues CF. Overview on the Infections Related to Rare *Candida* Species. *Pathogens*. 2022;11(9), 963.
109. Borman AM, Johnson EM. Name Changes for Fungi of Medical Importance, 2018 to 2019. *J Clin Microbiol*. 2021;59(2): e01811-20.
110. Angoulvant A, Guitard J, Hennequin C. Old and new pathogenic *Nakaseomyces* species: epidemiology, biology, identification, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res*. 2016;16(2):fov114.
111. Asadzadeh M, Alanazi AF, Ahmad S, Al-Sweih N, Khan Z. Lack of detection of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* among 440 clinical *Candida glabrata sensu lato* isolates in Kuwait. *PLoS One*. 2019;14(10):e0223920.
112. Pfaller MA, Diekema DJ, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN. Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* Species From 1997-2016. *Open Forum Infect Dis*. 2019;6(Suppl 1):S79-S94.
113. Soullountsi V, Schizodimos T, Kotoulas SC. Deciphering the epidemiology of invasive candidiasis in the intensive care unit: is it possible? *Infection*. 2021;49(6):1107-31.
114. Zhang L, Zhou S, Pan A, Li J, Liu B. Surveillance of antifungal susceptibilities in clinical isolates of *Candida* species at 36 hospitals in China from 2009 to 2013. *Int J Infect Dis*. 2015;33:1-4.
115. Pemán J, Cantón E, Miñana JJ, Florez JA, Echeverría J, Ortega DN, et al. [Changes in the epidemiology of fungaemia and fluconazole susceptibility of blood isolates during the last 10 years in Spain: results from the FUNGEMYCA study]. *Rev Iberoam Micol*. 2011;28(2):91-9.
116. Pristov KE, Ghannoum MA. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(7):792-8.
117. Alobaid K, Asadzadeh M, Bafna R, Ahmad S. First Isolation of *Candida nivariensis*, an Emerging Fungal Pathogen, in Kuwait. *Med Princ Pract*. 2021;30(1):80-4.
118. Lockhart SR, Messer SA, Gherna M, Bishop JA, Merz WG, Pfaller MA, et al. Identification of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a large global collection of *Candida glabrata* isolates: comparison to the literature. *J Clin Microbiol*. 2009;47(4):1216-7.
119. Miranda-Zapico I, Eraso E, Hernández-Almaraz JL, López-Soria LM, Carrillo-Muñoz AJ, Hernández-Molina JM, et al. Prevalence and antifungal susceptibility patterns

- of new cryptic species inside the species complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a Spanish tertiary hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(10):2315-22.
120. Małek M, Mrowiec P, Klesiewicz K, Skiba-Kurek I, Szczepański A, Białecka J, et al. Prevalence of human pathogens of the clade *Nakaseomyces* in a culture collection-the first report on *Candida bracarensis* in Poland. *Folia Microbiol (Praha).* 2019;64(3):307-12.
 121. van Asbeck EC, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit Rev Microbiol.* 2009;35(4):283-309.
 122. Bonassoli LA, Bertoli M, Svidzinski TI. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *J Hosp Infect.* 2005;59(2):159-62.
 123. Nosek J, Holesova Z, Kosa P, Gacser A, Tomaska L. Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet.* 2009;55(5):497-509.
 124. Silva AP, Miranda IM, Lisboa C, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol.* 2009;47(8):2392-7.
 125. Tóth R, Nosek J, Mora-Montes HM, Gabaldon T, Bliss JM, Nosanchuk JD, et al. *Candida parapsilosis*: from Genes to the Bedside. *Clin Microbiol Rev.* 2019;32(2):e00111-18.
 126. Almirante B, Rodríguez D, Cuenca-Estrella M, Almela M, Sanchez F, Ayats J, et al. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol.* 2006;44(5):1681-5.
 127. Sharma C, Kumar N, Pandey R, Meis JF, Chowdhary A. Whole genome sequencing of emerging multidrug resistant *Candida auris* isolates in India demonstrates low genetic variation. *New Microbes New Infect.* 2016;13:77-82.
 128. Castanheira M, Deshpande LM, Messer SA, Rhomberg PR, Pfaller MA. Analysis of global antifungal surveillance results reveals predominance of Erg11 Y132F alteration among azole-resistant *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* and country-specific isolate dissemination. *Int J Antimicrob Agents.* 2020;55(1):105799.
 129. Kaur H, Singh S, Rudramurthy SM, Ghosh AK, Jayashree M, Narayana Y, et al. Candidaemia in a tertiary care centre of developing country: Monitoring possible change in spectrum of agents and antifungal susceptibility. *Indian J Med Microbiol.* 2020;38(1):110-6.
 130. Faria-Ramos I, Neves-Maia J, Ricardo E, Santos-Antunes J, Silva AT, Costa-de-Oliveira S, et al. Species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility profiles of yeast isolates from invasive infections during a Portuguese multicenter survey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33(12):2241-7.
 131. Guinea J, Zaragoza Ó, Escibano P, Martín-Mazuelos E, Pemán J, Sánchez-Reus F, et al. Molecular identification and antifungal susceptibility of yeast isolates causing fungemia collected in a population-based study in Spain in 2010 and 2011. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(3):1529-37.
 132. Vogiatzi L, Ilia S, Sideri G, Vagelakoudi E, Vassilopoulou M, Sdougka M, et al. Invasive candidiasis in pediatric intensive care in Greece: a nationwide study. *Intensive Care Med.* 2013;39(12):2188-95.

133. Mesini A, Mikulska M, Giacobbe DR, Del Puente F, Gandolfo N, Codda G, et al. Changing epidemiology of candidaemia: Increase in fluconazole-resistant *Candida parapsilosis*. *Mycoses*. 2020;63(4):361-8.
134. Brilhante RSN, Sales JA, da Silva MLQ, de Oliveira JS, Pereira LA, Pereira-Neto WA, et al. Antifungal susceptibility and virulence of *Candida parapsilosis* species complex: an overview of their pathogenic potential. *J Med Microbiol*. 2018;67(7):903-14.
135. Cantón E, Pemán J, Quindós G, Eraso E, Miranda-Zapico I, Álvarez M, et al. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(12):5590-6.
136. Guo J, Zhang M, Qiao D, Shen H, Wang L, Wang D, et al. Prevalence and Antifungal Susceptibility of. *Front Microbiol*. 2021;12:644000.
137. Vigezzi C, Icely PA, Dudiuk C, Rodríguez E, Miró MS, Castillo GDV, et al. Frequency, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis* species complex isolated from patients with candidemia in the central region of Argentina. *J Mycol Med*. 2019;29(4):285-91.
138. Puig-Asensio M, Pemán J, Zaragoza R, Garnacho-Montero J, Martín-Mazuelos E, Cuenca-Estrella M, et al. Impact of therapeutic strategies on the prognosis of candidemia in the ICU. *Crit Care Med*. 2014;42(6):1423-32.
139. Barbedo LS, Vaz C, Pais C, Figueiredo-Carvalho MHG, Muniz MM, Zancoppe-Oliveira RM, et al. Different scenarios for *Candida parapsilosis* fungaemia reveal high numbers of mixed *C. parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* infections. *J Med Microbiol*. 2015;64(Pt 1):7-17.
140. Marcos-Arias C, Mateo E, Jurado-Martín I, Pena-Fernández N, Cantón E, Pemán J, et al. Utility of two PCR-RFLP-based techniques for identification of *Candida parapsilosis* complex blood isolates. *Mycoses*. 2020;63(5):461-70.
141. Zuza-Alves DL, Silva-Rocha WP, Chaves GM. An Update on *Candida tropicalis* Based on Basic and Clinical Approaches. *Front Microbiol*. 2017;8:1927.
142. Atencia-Carrera MB, Cabezas-Mera FS, Tejera E, Machado A. Prevalence of biofilms in *Candida* spp. bloodstream infections: A meta-analysis. *PLoS One*. 2022;17(2):e0263522.
143. Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Etest methods with the CLSI broth microdilution method for echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. *J Clin Microbiol*. 2010;48(5):1592-9.
144. Zheng YJ, Xie T, Wu L, Liu XY, Zhu L, Chen Y, et al. Epidemiology, species distribution, and outcome of nosocomial *Candida* spp. bloodstream infection in Shanghai: an 11-year retrospective analysis in a tertiary care hospital. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2021;20(1):34.
145. Doi AM, Pignatari AC, Edmond MB, Marra AR, Camargo LF, Siqueira RA, et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146909.
146. Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *Int J Infect Dis*. 2010;14(11):e954-66.

147. Jamiu AT, Albertyn J, Sebolai OM, Pohl CH. Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. *Med Mycol*. 2021;59(1):14-30.
148. Mendoza-Reyes DF, Gómez-Gaviria M, Mora-Montes HM. *Candida lusitanae*: Biology, Pathogenicity, Virulence Factors, Diagnosis, and Treatment. *Infect Drug Resist*. 2022;15:5121-35.
149. Apsemidou A, Füller MA, Idelevich EA, Kurzai O, Tragiannidis A, Groll AH. Breakthrough Fungemia in an Immuno-Compromised Adolescent: Case Report and Review of the Literature. *J Fungi (Basel)*. 2020;6(4):380.
150. Tragiannidis A, Fegeler W, Rellensmann G, Debus V, Müller V, Hoernig-Franz I, et al. Candidaemia in a European Paediatric University Hospital: a 10-year observational study. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(2):E27-30.
151. Ceballos-Garzon A, Peñuela A, Valderrama-Beltrán S, Vargas-Casanova Y, Ariza B, Parra-Giraldo CM. Emergence and circulation of azole-resistant *C. albicans*, *C. auris* and *C. parapsilosis* bloodstream isolates carrying Y132F, K143R or T220L Erg11p substitutions in Colombia. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13:1136217.
152. Ghasemi R, Lotfali E, Rezaei K, Madinehzad SA, Tafti MF, Aliabadi N, et al. *Meyerozyma guilliermondii* species complex: review of current epidemiology, antifungal resistance, and mechanisms. *Braz J Microbiol*. 2022;53(4):1761-79.
153. Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol Immunol*. 2009;53(1):41-4.
154. Kim MN, Shin JH, Sung H, Lee K, Kim EC, Ryoo N, et al. *Candida haemulonii* and closely related species at 5 university hospitals in Korea: identification, antifungal susceptibility, and clinical features. *Clin Infect Dis*. 2009;48(6):e57-61.
155. Chowdhary A, Sharma C, Meis JF. *Candida auris*: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. *PLoS Pathog*. 2017;13(5):e1006290.
156. Calvo B, Melo AS, Perozo-Mena A, Hernandez M, Francisco EC, Hagen F, et al. First report of *Candida auris* in America: Clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia. *J Infect*. 2016;73(4):369-74.
157. Rhodes J, Fisher MC. Global epidemiology of emerging *Candida auris*. *Curr Opin Microbiol*. 2019;52:84-9.
158. Fisher MC, Alastruey-Izquierdo A, Berman J, Bicanic T, Bignell EM, Bowyer P, et al. Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. *Nat Rev Microbiol*. 2022;20(9):557-71.
159. Cristina ML, Spagnolo AM, Sartini M, Carbone A, Oliva M, Schinca E, et al. An Overview on *Candida auris* in Healthcare Settings. *J Fungi (Basel)*. 2023;9(9):913.
160. Coordination G, Alastruey-Izquierdo, A., World Health Organization, & World Health Organization. 2022. [<https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/363682/97892400060241-eng.pdf>. Acedido em dezembro de 2023.
161. Gabaldón T, Naranjo-Ortíz MA, Marcet-Houben M. Evolutionary genomics of yeast pathogens in the Saccharomycotina. *FEMS Yeast Res*. 2016;16(6).
162. Kean R, Brown J, Gulmez D, Ware A, Ramage G. *Candida auris*: A Decade of Understanding of an Enigmatic Pathogenic Yeast. *J Fungi (Basel)*. 2020;6(1):30.
163. Muñoz JF, Gade L, Chow NA, Loparev VN, Juieng P, Berkow EL, et al. Genomic insights into multidrug-resistance, mating and virulence in *Candida auris* and related emerging species. *Nat Commun*. 2018;9(1):5346.

164. Jackson BR, Chow N, Forsberg K, Litvintseva AP, Lockhart SR, Welsh R, et al. On the Origins of a Species: What Might Explain the Rise of *Candida auris*?. J Fungi (Basel). 2019;5(3):58.
165. Casadevall A, Kontoyiannis DP, Robert V. Environmental *Candida auris* and the Global Warming Emergence Hypothesis. mBio. 2021;12(2):e00360-21.
166. Arora P, Singh P, Wang Y, Yadav A, Pawar K, Singh A, et al. Environmental Isolation of *Candida auris* from the Coastal Wetlands of Andaman Islands, India. mBio. 2021;12(2):e03181-20..
167. Yadav A, Jain K, Wang Y, Pawar K, Kaur H, Sharma KK, et al. *Candida auris* on Apples: Diversity and Clinical Significance. mBio. 2022;13(2):e0051822.
168. Akinbobola AB, Kean R, Hanifi SMA, Quilliam RS. Environmental reservoirs of the drug-resistant pathogenic yeast *Candida auris*. PLoS Pathog. 2023;19(4):e1011268.
169. de Cássia Orlandi Sardi J, Silva DR, Soares Mendes-Giannini MJ, Rosalen PL. *Candida auris*: Epidemiology, risk factors, virulence, resistance, and therapeutic options. Microb Pathog. 2018;125:116-21.
170. Chowdhary A, Sharma C, Duggal S, Agarwal K, Prakash A, Singh PK, et al. New clonal strain of *Candida auris*, Delhi, India. Emerg Infect Dis. 2013;19(10):1670-3.
171. Kathuria S, Singh PK, Sharma C, Prakash A, Masih A, Kumar A, et al. Multidrug-Resistant *Candida auris* Misidentified as *Candida haemulonii*: Characterization by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and DNA Sequencing and Its Antifungal Susceptibility Profile Variability by Vitek 2, CLSI Broth Microdilution, and Etest Method. J Clin Microbiol. 2015;53(6):1823-30.
172. Cortegiani A, Misseri G, Giaratano A, Bassetti M, Eyre D. The global challenge of *Candida auris* in the intensive care unit. Crit Care. 2019;23(1):150.
173. Eckbo EJ, Wong T, Bharat A, Cameron-Lane M, Hoang L, Dawar M, et al. First reported outbreak of the emerging pathogen *Candida auris* in Canada. Am J Infect Control. 2021;49(6):804-7.
174. Di Pilato V, Codda G, Ball L, Giacobbe DR, Willison E, Mikulska M, et al. Molecular Epidemiological Investigation of a Nosocomial Cluster of *C. auris*: Evidence of Recent Emergence in Italy and Ease of Transmission during the COVID-19 Pandemic. J Fungi (Basel). 2021;7(2):140.
175. Ruiz Gaitán AC, Moret A, López Hontangas JL, Molina JM, Aleixandre López AI, Cabezas AH, et al. Nosocomial fungemia by *Candida auris*: First four reported cases in continental Europe. Rev Iberoam Micol. 2017;34(1):23-7.
176. van Schalkwyk E, Mpembe RS, Thomas J, Shuping L, Ismail H, Lowman W, et al. Epidemiologic Shift in Candidemia Driven by *Candida auris*, South Africa, 2016-2017. Emerg Infect Dis. 2019;25(9):1698-707.
177. Rudramurthy SM, Chakrabarti A, Paul RA, Sood P, Kaur H, Capoor MR, et al. *Candida auris* candidaemia in Indian ICUs: analysis of risk factors. J Antimicrob Chemother. 2017;72(6):1794-801.
178. de Jong AW, Francisco EC, de Almeida JN, Brandão IB, Pereira FM, Dias PHP, et al. Nanopore Genome Sequencing and Variant Analysis of the Susceptible *Candida auris* Strain L1537/2020, Salvador, Brazil. Mycopathologia. 2021;186(6):883-7.
179. Chowdhary A, Sharma A. The lurking scourge of multidrug resistant *Candida auris* in times of COVID-19 pandemic. J Glob Antimicrob Resist. 2020;22:175-6.
180. Desoubeaux G, Coste AT, Imbert C, Hennequin C. Overview about *Candida auris*: What's up 12 years after its first description? J Mycol Med. 2022;32(2):101248.

181. Henriques J, Mixão V, Cabrita J, Duarte TI, Sequeira T, Cardoso S, et al. *Candida auris* in Intensive Care Setting: The First Case Reported in Portugal. *J Fungi* (Basel). 2023;9(8):837.
182. Plachouras D, Lötsch F, Kohlenberg A, Monnet DL, group Casc. *Candida auris*: epidemiological situation, laboratory capacity and preparedness in the European Union and European Economic Area*, January 2018 to May 2019. *Euro Surveill.* 2020;25(12):2000240.
183. Kohlenberg A, Monnet DL, Plachouras D, group Casc, experts Cascgifn. Increasing number of cases and outbreaks caused by *Candida auris* in the EU/EEA, 2020 to 2021. *Euro Surveill.* 2022;27(46):2200846.
184. Jones CR, Neill C, Borman AM, Budd EL, Cummins M, Fry C, et al. The laboratory investigation, management, and infection prevention and control of *Candida auris*. *J Med Microbiol.* 2024;73(5):001820..
185. Chow NA, Gade L, Tsay SV, Forsberg K, Greenko JA, Southwick KL, et al. Multiple introductions and subsequent transmission of multidrug-resistant *Candida auris* in the USA: a molecular epidemiological survey. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(12):1377-84.
186. Ruiz-Gaitán A, Moret AM, Tasias-Pitarch M, Aleixandre-López AI, Martínez-Morel H, Calabuig E, et al. An outbreak due to *Candida auris* with prolonged colonisation and candidaemia in a tertiary care European hospital. *Mycoses.* 2018;61(7):498-505.
187. Pekard-Amenitsch S, Schriebl A, Posawetz W, Willinger B, Kölli B, Buzina W. Isolation of *Candida auris* from Ear of Otherwise Healthy Patient, Austria, 2018. *Emerg Infect Dis.* 2018;24(8):1596-7.
188. Chow NA, de Groot T, Badali H, Abastabar M, Chiller TM, Meis JF. Potential Fifth Clade of *Candida auris*, Iran, 2018. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(9):1780-1.
189. Spruijtenburg B, Badali H, Abastabar M, Mirhendi H, Khodavaisy S, Sharifisooraki J, et al. Confirmation of fifth *Candida auris* clade by whole genome sequencing.. *Emerg Microbes Infect.* 2022;11(1):2405-11.
190. Muñoz JF, Welsh RM, Shea T, Batra D, Gade L, Howard D, et al. Clade-specific chromosomal rearrangements and loss of subtelomeric adhesins in *Candida auris*. *Genetics.* 2021;218(1):iyab029.
191. Suphavitai C, Ko, K. K. K., Lim, K. M., Tan, M. G., Boonsimma, P., Keat Chu, J. J., ... & Nagarajan, N. Discovery of the sixth *Candida auris* clade in Singapore. *medRxiv.* 2023;2023-08.
192. Watkins RR, Gowen R, Lionakis MS, Ghannoum M. Update on the Pathogenesis, Virulence, and Treatment of *Candida auris*. *Pathog Immun.* 2022;7(2):46-65.
193. Rossato L, Colombo AL. *Candida auris*: What Have We Learned About Its Mechanisms of Pathogenicity? *Front Microbiol.* 2018;9:3081.
194. Nett JE. *Candida auris*: An emerging pathogen "incognito"? *PLoS Pathog.* 2019;15(4):e1007638.
195. Hata DJ, Humphries R, Lockhart SR, Committee CoAPM. *Candida auris*: An Emerging Yeast Pathogen Posing Distinct Challenges for Laboratory Diagnostics, Treatment, and Infection Prevention. *Arch Pathol Lab Med.* 2020. 144(1):107-114.
196. Chybowska AD, Childers DS, Farrer RA. Nine Things Genomics Can Tell Us About *Candida auris*. *Front Genet.* 2020;11:351.
197. Larkin E, Hager C, Chandra J, Mukherjee PK, Retuerto M, Salem I, et al. The Emerging Pathogen *Candida auris*: Growth Phenotype, Virulence Factors, Activity of Antifungals, and Effect of SCY-078, a Novel Glucan Synthesis Inhibitor, on Growth

- Morphology and Biofilm Formation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(5): e02396-16.
198. Ahmad S, Alfouzan W. : Epidemiology, Diagnosis, Pathogenesis, Antifungal Susceptibility, and Infection Control Measures to Combat the Spread of Infections in Healthcare Facilities. *Microorganisms.* 2021;9(4):807.
199. Garcia-Bustos V, Cabanero-Navalon MD, Ruiz-Saurí A, Ruiz-Gaitán AC, Salavert M, Tormo M, et al. What Do We Know about *Candida auris*? State of the Art, Knowledge Gaps, and Future Directions. *Microorganisms.* 2021;9(10):2177.
200. Chatterjee S, Alampalli SV, Nageshan RK, Chettiar ST, Joshi S, Tatu US. Draft genome of a commonly misdiagnosed multidrug resistant pathogen *Candida auris*. *BMC Genomics.* 2015;16:686.
201. Yue H, Bing J, Zheng Q, Zhang Y, Hu T, Du H, et al. Filamentation in *Candida auris*, an emerging fungal pathogen of humans: passage through the mammalian body induces a heritable phenotypic switch. *Emerg Microbes Infect.* 2018;7(1):188.
202. Du H, Bing J, Hu T, Ennis CL, Nobile CJ, Huang G. *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. *PLoS Pathog.* 2020;16(10):e1008921.
203. Fan S, Yue H, Zheng Q, Bing J, Tian S, Chen J, et al. Filamentous growth is a general feature of *Candida auris* clinical isolates. *Med Mycol.* 2021;59(7):734-40.
204. Wang X, Bing J, Zheng Q, Zhang F, Liu J, Yue H, et al. The first isolate of *Candida auris* in China: clinical and biological aspects. *Emerg Microbes Infect.* 2018;7(1):93.
205. Welsh RM, Bentz ML, Shams A, Houston H, Lyons A, Rose LJ, et al. Survival, Persistence, and Isolation of the Emerging Multidrug-Resistant Pathogenic Yeast *Candida auris* on a Plastic Health Care Surface. *J Clin Microbiol.* 2017;55(10):2996-3005.
206. Bravo Ruiz G, Lorenz A. What do we know about the biology of the emerging fungal pathogen of humans *Candida auris*? *Microbiol Res.* 2021;242:126621.
207. Singh R, Kaur M, Chakrabarti A, Shankarnarayan SA, Rudramurthy SM. Biofilm formation by *Candida auris* isolated from colonising sites and candidemia cases. *Mycoses.* 2019;62(8):706-709.
208. Horton MV, Johnson CJ, Kernien JF, Patel TD, Lam BC, Cheong JZA, et al. *Candida auris* Forms High-Burden Biofilms in Skin Niche Conditions and on Porcine Skin. *mSphere.* 2020;5(1): e00910-19.
209. Johnson CJ, Davis JM, Huttenlocher A, Kernien JF, Nett JE. Emerging Fungal Pathogen *Candida auris* Evades Neutrophil Attack. *mBio.* 2018;9(4).
210. Navarro-Arias MJ, Hernández-Chávez MJ, García-Carnero LC, Amezcua-Hernández DG, Lozoya-Pérez NE, Estrada-Mata E, et al. Differential recognition of *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, and *Candida auris* by human innate immune cells. *Infect Drug Resist.* 2019;12:783-94.
211. Bruno M, Kersten S, Bain JM, Jaeger M, Rosati D, Kruppa MD, et al. Transcriptional and functional insights into the host immune response against the emerging fungal pathogen *Candida auris*. *Nat Microbiol.* 2020;5(12):1516-31.
212. Xin H, Mohiuddin F, Tran J, Adams A, Eberle K. Experimental Mouse Models of Disseminated *Candida auris* Infection. *mSphere.* 2019;4(5).
213. Torres SR, Pichowicz A, Torres-Velez F, Song R, Singh N, Lasek-Nesselquist E, et al. Impact of *Candida auris* Infection in a Neutropenic Murine Model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64(3): e01625-19.

214. Yan L, Xia K, Yu Y, Miliakos A, Chaturvedi S, Zhang F, et al. Unique Cell Surface Mannan of Yeast Pathogen *Candida auris* with Selective Binding to IgG. *ACS Infect Dis*. 2020;6(5):1018-31.
215. Chaturvedi V, Linhardt RJ, Papon N. *Candida auris* Mannans and Pathogen-Host Interplay. *Trends Microbiol*. 2020;28(12):954-6.
216. Pathirana RU, Friedman J, Norris HL, Salvatori O, McCall AD, Kay J, et al. Fluconazole-Resistant *Candida auris* Is Susceptible to Salivary Histatin 5 Killing and to Intrinsic Host Defenses. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(2).
217. Sanches JM, Rossato L, Lice I, Alves de Piloto Fernandes AM, Bueno Duarte GH, Rosini Silva AA, et al. The role of annexin A1 in *Candida albicans* and *Candida auris* infections in murine neutrophils. *Microb Pathog*. 2021;150:104689.
218. Spivak ES, Hanson KE. *Candida auris*: an Emerging Fungal Pathogen. *J Clin Microbiol*. 2018;56(2): e01588-17.
219. Chakrabarti A, Sood P. On the emergence, spread and resistance of *Candida auris*. *J Med Microbiol*. 2021;70(3):001318.
220. Schelenz S, Hagen F, Rhodes JL, Abdolrasouli A, Chowdhary A, Hall A, et al. First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris*. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2016;5:35.
221. Adams E, Quinn M, Tsay S, Poirot E, Chaturvedi S, Southwick K, et al. *Candida auris* in Healthcare Facilities, New York, USA, 2013-2017. *Emerg Infect Dis*. 2018;24(10):1816-24.
222. Vallabhaneni S, Kallen A, Tsay S, Chow N, Welsh R, Kerins J, et al. Investigation of the First Seven Reported Cases of *Candida auris*, a Globally Emerging Invasive, Multidrug-Resistant Fungus - United States, May 2013-August 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65(44):1234-7.
223. Biagi MJ, Wiederhold NP, Gibas C, Wickes BL, Lozano V, Bleasdale SC, et al. Development of High-Level Echinocandin Resistance in a Patient With Recurrent *Candida auris* Candidemia Secondary to Chronic Candiduria. *Open Forum Infect Dis*. 2019;6(7):ofz262.
224. Pemán J, Ruiz-Gaitán A. Candidemia from urinary tract source: the challenge of candiduria. *Hosp Pract (1995)*. 2018;46(5):243-5.
225. Biswal M, Rudramurthy SM, Jain N, Shamanth AS, Sharma D, Jain K, et al. Controlling a possible outbreak of *Candida auris* infection: lessons learnt from multiple interventions. *J Hosp Infect*. 2017;97(4):363-70.
226. Kordalewska M, Perlin DS. Molecular Diagnostics in the Times of Surveillance for *Candida auris*. *J Fungi (Basel)*. 2019;5(3):77.
227. Rowlands J, Dufort E, Chaturvedi S, Zhu Y, Quinn M, Bucher C, et al. *Candida auris* admission screening pilot in select units of New York City health care facilities, 2017-2019. *Am J Infect Control*. 2023;51(8):866-70.
228. Rossi A, Chavez J, Iverson T, Hergert J, Oakeson K, LaCross N, et al. *Candida auris* Discovery through Community Wastewater Surveillance during Healthcare Outbreak, Nevada, USA, 2022. *Emerg Infect Dis*. 2023;29(2):422-5.
229. Zulli A, Chan EM, Shelden B, Duong D, Xu X, White B, et al. Detection of *Candida auris* in wastewater solids in 190 wastewater treatment plants in the United States suggests widespread occurrence in communities. *medRxiv*. 2024.
230. Eyre DW, Sheppard AE, Madder H, Moir I, Moroney R, Quan TP, et al. A *Candida auris* Outbreak and Its Control in an Intensive Care Setting. *N Engl J Med*. 2018;379(14):1322-31.

231. Sayeed MA, Farooqi J, Jabeen K, Mahmood SF. Comparison of risk factors and outcomes of *Candida auris* candidemia with non-*Candida auris* candidemia: A retrospective study from Pakistan. *Med Mycol*. 2020;58(6):721-9.
232. Garcia-Bustos V, Salavert M, Ruiz-Gaitán AC, Cabañero-Navalon MD, Sigona-Giangreco IA, Pemán J. A clinical predictive model of candidaemia by *Candida auris* in previously colonized critically ill patients. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(11):1507-13.
233. Pharkjaksu S, Boonmee N, Mitrpant C, Ngamskulrungrroj P. Immunopathogenesis of Emerging *Candida auris* and *Candida haemulonii* Strains.. *J Fungi (Basel)*. 2021;7(9):725.
234. Sanyaolu A, Okorie C, Marinkovic A, Abbasi AF, Prakash S, Mangat J, et al. *Candida auris*: An Overview of the Emerging Drug-Resistant Fungal Infection. *Infect Chemother*. 2022;54(2):236-46.
235. Azar MM, Turbett SE, Fishman JA, Pierce VM. Donor-Derived Transmission of *Candida auris* During Lung Transplantation. *Clin Infect Dis*. 2017;65(6):1040-2.
236. Castro L, Álvarez MI, Rojas F, Giusiano G, Martínez E. infection in the central catheter of a patient without sepsis symptoms. *Colomb Med (Cali)*. 2019;50(4):293-8.
237. Mamtani S, Aljanabi NM, Gupta Rauniyar RP, Acharya A, Malik BH. *Candida* Endocarditis: A Review of the Pathogenesis, Morphology, Risk Factors, and Management of an Emerging and Serious Condition. *Cureus*. 2020;12(1):e6695.
238. Lone SA, Ahmad A. *Candida auris*-the growing menace to global health. *Mycoses*. 2019;62(8):620-37.
239. Morales-López SE, Parra-Giraldo CM, Ceballos-Garzón A, Martínez HP, Rodríguez GJ, Álvarez-Moreno CA, et al. Invasive Infections with Multidrug-Resistant Yeast *Candida auris*, Colombia. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(1):162-4.
240. Ben-Ami R, Berman J, Novikov A, Bash E, Shachor-Meyouhas Y, Zakin S, et al. Multidrug-Resistant *Candida haemulonii* and *C. auris*, Tel Aviv, Israel. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(1):195-203.
241. Osei Sekyere J. *Candida auris*: A systematic review and meta-analysis of current updates on an emerging multidrug-resistant pathogen. *Microbiologyopen*. 2018;7(4):e00578.
242. Rhodes J, Abdolrasouli A, Farrer RA, Cuomo CA, Aanensen DM, Armstrong-James D, et al. Genomic epidemiology of the UK outbreak of the emerging human fungal pathogen *Candida auris*. *Emerg Microbes Infect*. 2018;7(1):43.
243. Abastabar M, Haghani I, Ahangarkani F, Rezai MS, Taghizadeh Armaki M, Roodgari S, et al. *Candida auris* otomycosis in Iran and review of recent literature. *Mycoses*. 2019;62(2):101-5.
244. Choi HI, An J, Hwang JJ, Moon SY, Son JS. Otomastoiditis caused by *Candida auris*: Case report and literature review. *Mycoses*. 2017;60(8):488-92.
245. Breazzano MP, Tooley AA, Godfrey KJ, Iacob CE, Yannuzzi NA, Flynn HW. *Candida auris* and endogenous panophthalmitis: clinical and histopathological features. *Am J Ophthalmol Case Rep*. 2020;19:100738.
246. Heath CH, Dyer JR, Pang S, Coombs GW, Gardam DJ. *Candida auris* Sternal Osteomyelitis in a Man from Kenya Visiting Australia, 2015. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(1):192-4.
247. Supreeth S, Al Ghafri KA, Jayachandra RK, Al Balushi ZY. First Report of *Candida auris* Spondylodiscitis in Oman: A Rare Presentation. *World Neurosurg*. 2020;135:335-8.

248. Bandara N, Samaranayake L. Emerging and future strategies in the management of recalcitrant *Candida auris*. *Med Mycol*. 2022;60(4): myac008.
249. Berkow EL, Lockhart SR, Ostrosky-Zeichner L. Antifungal Susceptibility Testing: Current Approaches. *Clin Microbiol Rev*. 2020;33(3): e00069-19.
250. Hamm PS, Mueller RC, Kuske CR, Porras-Alfaro A. Keratinophilic fungi: Specialized fungal communities in a desert ecosystem identified using cultured-based and Illumina sequencing approaches. *Microbiol Res*. 2020;239:126530.
251. Lau A, Chen S, Sorrell T, Carter D, Malik R, Martin P, et al. Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens. *J Clin Microbiol*. 2007;45(2):380-5.
252. Zhao Y, Tsang CC, Xiao M, Chan JFW, Lau SKP, Kong F, et al. Yeast identification by sequencing, biochemical kits, MALDI-TOF MS and rep-PCR DNA fingerprinting. *Med Mycol*. 2018;56(7):816-27.
253. Lockhart SR, Lyman MM, Sexton DJ. Tools for Detecting a "Superbug": Updates on *Candida auris* Testing. *J Clin Microbiol*. 2022;60(5):e0080821.
254. Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol*. 1996;34(1):58-61.
255. Paulo C, Mourão C, Veiga PM, Marques JM, Rocha G, Alves AF, et al. Retrospective analysis of clinical yeast isolates in a hospital in the centre of Portugal: spectrum and revision of the identification procedures. *Med Mycol*. 2009;47(8):836-44.
256. Sarvestani HK, Ramandi A, Getso MI, Razavyoon T, Javidnia J, Golrizi MB, et al. Mass spectrometry in research laboratories and clinical diagnostic: a new era in medical mycology. *Braz J Microbiol*. 2022;53(2):689-707.
257. Fontecha G, Montes K, Ortiz B, Galindo C, Braham S. Identification of Cryptic Species of Four *Candida* Complexes in a Culture Collection. *J Fungi (Basel)*. 2019;5(4):117.
258. Criseo G, Scordino F, Romeo O. Current methods for identifying clinically important cryptic *Candida* species. *J Microbiol Methods*. 2015;111:50-6.
259. Wickes BL, Wiederhold NP. Molecular diagnostics in medical mycology. *Nat Commun*. 2018;9(1):5135.
260. Trabelsi H, Neji S, Hadrich I, Khemakhem N, Sellami H, Makni F, et al. Contribution of the internal transcribed spacer regions to the detection and identification of human fungal pathogens. *Curr Res Transl Med*. 2019;67(3):100-6.
261. Oberle M, Wohlwend N, Jonas D, Maurer FP, Jost G, Tschudin-Sutter S, et al. The Technical and Biological Reproducibility of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Based Typing: Employment of Bioinformatics in a Multicenter Study. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164260.
262. Samantaray S, Singh R. Evaluation of MALDI-TOF MS for Identification of Species in the *Candida parapsilosis* Complex from Candidiasis Cases. *J Appl Lab Med*. 2022;7(4):889-900.
263. Jang KS, Kim YH. Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications. *J Microbiol*. 2018;56(4):209-16.
264. Maldonado I, Cataldi S, Garbasz C, Relloso S, Striebeck P, Guelfand L, et al. [Identification of *Candida* yeasts: Conventional methods and MALDI-TOF MS]. *Rev Iberoam Micol*. 2018;35(3):151-4.

265. Arastehfar A, Fang W, Pan W, Liao W, Yan L, Boekhout T. Identification of nine cryptic species of *Candida albicans*, *C. glabrata*, and *C. parapsilosis* complexes using one-step multiplex PCR. BMC Infect Dis. 2018;18(1):480.
266. Rolling T, Hohl TM, Zhai B. Minority report: the intestinal mycobiota in systemic infections. Curr Opin Microbiol. 2020;56:1-6.
267. Hoggard M, Vesty A, Wong G, Montgomery JM, Fourie C, Douglas RG, et al. Characterizing the Human Mycobiota: A Comparison of Small Subunit rRNA, ITS1, ITS2, and Large Subunit rRNA Genomic Targets. Front Microbiol. 2018;9:2208.
268. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(16):6241-6.
269. Fang W, Wu J, Cheng M, Zhu X, Du M, Chen C, et al. Diagnosis of invasive fungal infections: challenges and recent developments. J Biomed Sci. 2023;30(1):42.
270. Borman AM, Szekely A, Linton CJ, Palmer MD, Brown P, Johnson EM. Epidemiology, antifungal susceptibility, and pathogenicity of *Candida africana* isolates from the United Kingdom. J Clin Microbiol. 2013;51(3):967-72.
271. Hazirolan G, Altun HU, Gumral R, Gursoy NC, Otlu B, Sancak B. Prevalence of *Candida africana* and *Candida dubliniensis*, in vulvovaginal candidiasis: First Turkish *Candida africana* isolates from vulvovaginal candidiasis. J Mycol Med. 2017;27(3):376-81.
272. Romeo O, Criseo G. Molecular epidemiology of *Candida albicans* and its closely related yeasts *Candida dubliniensis* and *Candida africana*. J Clin Microbiol. 2009;47(1):212-4.
273. Romeo O, Criseo G. *Candida africana* and its closest relatives. Mycoses. 2011;54(6):475-86.
274. Gharehbolagh SA, Fallah B, Izadi A, Ardestani ZS, Malekifar P, M Borman A, et al. Distribution, antifungal susceptibility pattern and intra-*Candida albicans* species complex prevalence of *Candida africana*: A systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2020;15(8):e0237046.
275. Donnelly SM, Sullivan DJ, Shanley DB, Coleman DC. Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of ACT1 intron and exon sequences. Microbiology (Reading). 1999;145 (Pt 8):1871-82.
276. Borman AM, Linton CJ, Oliver D, Palmer MD, Szekely A, Odds FC, et al. Pyrosequencing analysis of 20 nucleotides of internal transcribed spacer 2 discriminates *Candida parapsilosis*, *Candida metapsilosis*, and *Candida orthopsilosis*. J Clin Microbiol. 2009;47(7):2307-10.
277. Theill L, Dudiuk C, Morano S, Gamarra S, Nardin ME, Méndez E, et al. Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida albicans* and its related species *Candida dubliniensis* and *Candida africana* isolated from vulvovaginal samples in a hospital of Argentina. Rev Argent Microbiol. 2016;48(1):43-9.
278. Mirhendi H, Bruun B, Schönheyder HC, Christensen JJ, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, et al. Differentiation of *Candida glabrata*, *C. nivariensis* and *C. bracarensis* based on fragment length polymorphism of ITS1 and ITS2 and restriction fragment length polymorphism of ITS and D1/D2 regions in rDNA. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011;30(11):1409-16.
279. Monstein HJ, Tärnberg M, Persis S, Johansson AG. Comparison of a capillary gel electrophoresis-based multiplex PCR assay and ribosomal intergenic transcribed spacer-

- 2 amplicon sequencing for identification of clinically important *Candida* species. J Microbiol Methods. 2014;96:81-3.
280. Telleria O, Ezpeleta G, Herrero O, Miranda-Zapico I, Quindós G, Cisterna R. Validation of the PCR-dHPLC method for rapid identification of *Candida glabrata* phylogenetically related species in different biological matrices. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2012;893-894:150-6.
281. Borman AM, Fraser M, Johnson EM. CHROMagar™ Candida Plus: A novel chromogenic agar that permits the rapid identification of *Candida auris*. Med Mycol. 2020.
282. Mulet Bayona JV, Salvador García C, Tormo Palop N, Gimeno Cardona C. Evaluation of a novel chromogenic medium for *Candida* spp. identification and comparison with CHROMagar™ Candida for the detection of *Candida auris* in surveillance samples. Diagn Microbiol Infect Dis. 2020;98(4):115168.
283. de Jong AW, Dieleman C, Carbia M, Mohd Tap R, Hagen F. Performance of Two Novel Chromogenic Media for the Identification of Multidrug-Resistant *Candida auris* Compared with Other Commercially Available Formulations. J Clin Microbiol. 2021;59(4).
284. Ruiz-Gaitán A, Sigona-Giangreco I, Pérez-Royo JM, Garcia-Bustos V, García-Hita M, Valentín-Gómez E, et al. Usefulness of Chromogenic Media with Fluconazole Supplementation for Presumptive Identification of *Candida auris*. Diagnostics (Basel). 2023;13(2):231.
285. Borman AM, Szekely A, Johnson EM. Comparative Pathogenicity of United Kingdom Isolates of the Emerging Pathogen *Candida auris* and Other Key Pathogenic *Candida* Species. mSphere. 2016;1(4): e00189-16.
286. Das S, Singh S, Tawde Y, Chakrabarti A, Rudramurthy SM, Kaur H, et al. A Selective Medium for Isolation and Detection of *Candida auris*, an Emerging Pathogen. J Clin Microbiol. 2021;59(2):e00326-20.
287. Ibrahim A, Peyclit L, Abdallah R, Khelaifia S, Chamieh A, Rolain JM, et al. SCA Medium: A New Culture Medium for the Isolation of All *Candida auris* Clades. J Fungi (Basel). 2021;7(6):433.
288. Mizusawa M, Miller H, Green R, Lee R, Durante M, Perkins R, et al. Can Multidrug-Resistant *Candida auris* Be Reliably Identified in Clinical Microbiology Laboratories? J Clin Microbiol. 2017;55(2):638-40.
289. Mahmoudi S, Agha Kuchak Afshari S, Aghaei Gharehbolagh S, Mirhendi H, Makimura K. Methods for identification of *Candida auris*, the yeast of global public health concern: A review. J Mycol Med. 2019;29(2):174-9.
290. Jeffery-Smith A, Taori SK, Schelenz S, Jeffery K, Johnson EM, Borman A, et al. *Candida auris*: a Review of the Literature. Clin Microbiol Rev. 2018;31(1): e00029-17.
291. Ahmad A, Spencer JE, Lockhart SR, Singleton S, Petway DJ, Bagarozzi DA, et al. A high-throughput and rapid method for accurate identification of emerging multidrug-resistant *Candida auris*. Mycoses. 2019;62(6):513-8.
292. Kordalewska M, Zhao Y, Lockhart SR, Chowdhary A, Berrio I, Perlin DS. Rapid and Accurate Molecular Identification of the Emerging Multidrug-Resistant Pathogen *Candida auris*. J Clin Microbiol. 2017;55(8):2445-52.
293. Leach L, Zhu Y, Chaturvedi S. Development and Validation of a Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of *Candida auris* from Surveillance Samples. J Clin Microbiol. 2018;56(2): e01223-17.

294. Malczynski M, Dowlow N, Rezaeian S, Rios J, Dirnberger L, Zembower JA, et al. Optimizing a real-time PCR assay for rapid detection of *Candida auris*. J Med Microbiol. 2020;69(6):824-9.
295. Ibrahim A, Baron SA, Yousfi H, Hadjadj L, Lalaoui R, Morand S, et al. Development and standardization of a specific real-time PCR assay for the rapid detection of *Candida auris*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2021;40(7):1547-51.
296. Sattler J, Noster J, Brunke A, Plum G, Wiegel P, Kurzai O, et al. Comparison of Two Commercially Available qPCR Kits for the Detection of *Candida auris*. J Fungi (Basel). 2021;7(2):154.
297. Lima A, Widen R, Vestal G, Uy D, Silbert S. A TaqMan Probe-Based Real-Time PCR Assay for the Rapid Identification of the Emerging Multidrug-Resistant Pathogen *Candida auris* on the BD Max System. J Clin Microbiol. 2019;57(7): e01604-18.
298. Mulet Bayona JV, Salvador García C, Tormo Palop N, Gimeno Cardona C. Validation and implementation of a commercial real-time PCR assay for direct detection of *Candida auris* from surveillance samples. Mycoses. 2021;64(6):612-5.
299. Sexton DJ, Bentz ML, Welsh RM, Litvintseva AP. Evaluation of a new T2 Magnetic Resonance assay for rapid detection of emergent fungal pathogen *Candida auris* on clinical skin swab samples. Mycoses. 2018;61(10):786-90.
300. Tamura T, Alshahni MM, Makimura K. Evaluation of CHROMagar™ Candida Plus chromogenic agar for the presumptive identification of *Candida auris*. Microbiol Immunol. 2022;66(6):292-8.
301. Chatelon J, Cortegiani A, Hammad E, Cassir N, Leone M. Choosing the Right Antifungal Agent in ICU Patients. Adv Ther. 2019;36(12):3308-20.
302. de Moraes DC. Current scenario of the search for new antifungal agents to treat *Candida auris* infections: An integrative review. J Mycol Med. 2022;32(1):101232.
303. Gintjee TJ, Donnelley MA, Thompson GR. Aspiring Antifungals: Review of Current Antifungal Pipeline Developments. J Fungi (Basel). 2020;6(1):28.
304. Cavassin FB, Baú-Carneiro JL, Vilas-Boas RR, Queiroz-Telles F. Sixty years of Amphotericin B: An Overview of the Main Antifungal Agent Used to Treat Invasive Fungal Infections. Infect Dis Ther. 2021;10(1):115-47.
305. Maubon D, Garnaud C, Calandra T, Sanglard D, Cornet M. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? Intensive Care Med. 2014;40(9):1241-55.
306. Calvo M, Scalia G, Palermo CI, Oliveri S, Trovato L. Comparison between EUCAST Broth Microdilution and MIC Strip Test in Defining Isavuconazole *In Vitro* Susceptibility against. Antibiotics (Basel). 2023;12(2):251.
307. Woods M, McAlister JA, Geddes-McAlister J. A One Health approach to overcoming fungal disease and antifungal resistance. WIREs Mech Dis. 2023;15(4):e1610.
308. Lee Y, Robbins N, Cowen LE. Molecular mechanisms governing antifungal drug resistance. NPJ Antimicrob Resist. 2023;1(1):5.
309. Thompson GR, Cadena J, Patterson TF. Overview of antifungal agents. Clin Chest Med. 2009;30(2):203-15.
310. Vitiello A, Ferrara F, Boccellino M, Ponzo A, Cimmino C, Comberiati E, et al. Antifungal Drug Resistance: An Emergent Health Threat. Biomedicines. 2023;11(4):1063.

311. Gow NAR, Johnson C, Berman J, Coste AT, Cuomo CA, Perlin DS, et al. The importance of antimicrobial resistance in medical mycology. *Nat Commun.* 2022;13(1):5352.
312. Sathi FA, Paul SK, Ahmed S, Alam MM, Nasreen SA, Haque N, et al. Prevalence and Antifungal Susceptibility of Clinically Relevant *Candida* Species, Identification of *Candida auris* and *Kodamaea ohmeri* in Bangladesh. *Trop Med Infect Dis.* 2022;7(9):211.
313. Maenchantrarath C, Khumdee P, Samosornsuk S, Mungkornkaew N, Samosornsuk W. Investigation of fluconazole susceptibility to *Candida albicans* by MALDI-TOF MS and real-time PCR for CDR1, CDR2, MDR1 and ERG11. *BMC Microbiol.* 2022;22(1):153.
314. Sanglard D, Ischer F, Parkinson T, Falconer D, Bille J. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(8):2404-12.
315. Morio F, Loge C, Besse B, Hennequin C, Le Pape P. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;66(4):373-84.
316. Jacobs SE, Jacobs JL, Dennis EK, Taimur S, Rana M, Patel D, et al. *Candida auris* Pan-Drug-Resistant to Four Classes of Antifungal Agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2022;66(7):e0005322.
317. Coste AT, Kritikos A, Li J, Khanna N, Goldenberger D, Garzoni C, et al. Emerging echinocandin-resistant *Candida albicans* and *glabrata* in Switzerland. *Infection.* 2020;48(5):761-6.
318. Walker LA, Munro CA, de Bruijn I, Lenardon MD, McKinnon A, Gow NA. Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. *PLoS Pathog.* 2008;4(4):e1000040.
319. Singh SD, Robbins N, Zaas AK, Schell WA, Perfect JR, Cowen LE. Hsp90 governs echinocandin resistance in the pathogenic yeast *Candida albicans* via calcineurin. *PLoS Pathog.* 2009;5(7):e1000532.
320. Park S, Kelly R, Kahn JN, Robles J, Hsu MJ, Register E, et al. Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(8):3264-73.
321. Hoenigl M, Sprute R, Arastehfar A, Perfect JR, Lass-Flörl C, Bellmann R, et al. Invasive candidiasis: investigational drugs in the clinical development pipeline and mechanisms of action. *Expert Opin Investig Drugs.* 2022;31(8):795-812.
322. Lamothe F. Novel Therapeutic Approaches to Invasive Candidiasis: Considerations for the Clinician. *Infect Drug Resist.* 2023;16:1087-97.
323. Hoenigl M, Sprute R, Egger M, Arastehfar A, Cornely OA, Krause R, et al. The Antifungal Pipeline: Fosmanogepix, Ibrexafungerp, Olorofim, Opelconazole, and Rezafungin. *Drugs.* 2021;81(15):1703-29.
324. Shaw KJ, Ibrahim AS. Fosmanogepix: A Review of the First-in-Class Broad Spectrum Agent for the Treatment of Invasive Fungal Infections. *J Fungi (Basel).* 2020;6(4):239.
325. Lamothe F, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Role and Interpretation of Antifungal Susceptibility Testing for the Management of Invasive Fungal Infections. *J Fungi (Basel).* 2020;7(1):17.

326. Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, Garbino J, Kullberg BJ, Lortholary O, et al. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. Clin Microbiol Infect. 2012;18 Suppl 7:19-37.
327. Calandra T, Roberts JA, Antonelli M, Bassetti M, Vincent JL. Diagnosis and management of invasive candidiasis in the ICU: an updated approach to an old enemy. Crit Care. 2016;20(1):125.
328. Berkow EL, Lockhart SR. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. Infect Drug Resist. 2017;10:237-45.
329. Bassetti M, Poulakou G, Kollef MH. The most recent concepts for the management of bacterial and fungal infections in ICU. Intensive Care Med. 2018;44(11):2000-3.
330. Wiederhold NP. Antifungal Susceptibility Testing: A Primer for Clinicians. Open Forum Infect Dis. 2021;8(11):ofab444.
331. Barry AL, Pfaller MA, Rennie RP, Fuchs PC, Brown SD. Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth microdilution, Etest, and disk diffusion methods. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(6):1781-4.
332. Espinel-Ingroff A. Commercial Methods for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Strengths and Limitations as Predictors of Resistance. J Fungi (Basel). 2022;8(3):309.
333. Alexander BD, Byrne TC, Smith KL, Hanson KE, Anstrom KJ, Perfect JR, et al. Comparative evaluation of Etest and sensititre yeastone panels against the Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents. J Clin Microbiol. 2007;45(3):698-706.
334. Dannaoui E, Espinel-Ingroff A. Antifungal Susceptibly Testing by Concentration Gradient Strip Etest Method for Fungal Isolates: A Review. J Fungi (Basel). 2019;5(4):108.
335. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL. Correlation between the procedure for antifungal susceptibility testing for *Candida* spp. of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) and four commercial techniques. Clin Microbiol Infect. 2005;11(6):486-92.
336. Johnson EM, Borman AM. Susceptibility Testing of *Candida auris* Isolates. Methods Mol Biol. 2022;2517:55-71.
337. Rogers TR, Verweij PE, Castanheira M, Dannaoui E, White PL, Arendrup MC, et al. Molecular mechanisms of acquired antifungal drug resistance in principal fungal pathogens and EUCAST guidance for their laboratory detection and clinical implications. J Antimicrob Chemother. 2022;77(8):2053-73.
338. Orasch C, Marchetti O, Garbino J, Schrenzel J, Zimmerli S, Mühlethaler K, et al. *Candida* species distribution and antifungal susceptibility testing according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and new vs. old Clinical and Laboratory Standards Institute clinical breakpoints: a 6-year prospective candidaemia survey from the fungal infection network of Switzerland. Clin Microbiol Infect. 2014;20(7):698-705.
339. Salsé M, Gangneux JP, Cassaing S, Delhaes L, Fekkar A, Dupont D, et al. Multicentre study to determine the Etest epidemiological cut-off values of antifungal drugs in *Candida* spp. and *Aspergillus fumigatus* species complex. Clin Microbiol Infect. 2019;25(12):1546-52.
340. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2020. Overview of antifungal ECOFFs and clinical breakpoints for yeasts, moulds and

dermatophytes using the EUCAST E.Def 7.3, E.Def 9.3 and E.Def 11.0 procedures. Version 2.0, valid from 2020-09-24

[Available from: <https://www.eucast.org/astoffungi/clinicalbreakpointsforantifungals/>. Consultado em novembro 2020.

341. Fasciana T, Cortegiani A, Ippolito M, Giarratano A, Di Quattro O, Lipari D, et al. *Candida auris*: An Overview of How to Screen, Detect, Test and Control This Emerging Pathogen. *Antibiotics* (Basel). 2020;9(11):778.
342. Sadeghi G, Ebrahimi-Rad M, Mousavi SF, Shams-Ghahfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M. Emergence of non-*Candida albicans* species: Epidemiology, phylogeny and fluconazole susceptibility profile. *J Mycol Med*. 2018;28(1):51-8.
343. Akrami K, Sweeney DA. The microbiome of the critically ill patient. *Curr Opin Crit Care*. 2018;24(1):49-54.
344. Ruchti F, LeibundGut-Landmann S. New insights into immunity to skin fungi shape our understanding of health and disease. *Parasite Immunol*. 2023;45(2):e12948.
345. Klassert TE, Zubiria-Barrera C, Denkel L, Neubert R, Schneegans A, Kulle A, et al. Skin dysbiosis and loss of microbiome site specificity in critically ill patients. *Microbiol Spectr*. 2024;12(3):e0307823.
346. Palabiyikoğlu I, Oral M, Tulunay M. *Candida* colonization in mechanically ventilated patients. *J Hosp Infect*. 2001;47(3):239-42.
347. Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU. Epidemiology of *Candida* colonization in an intensive care unit of a teaching hospital in Kuwait. *Med Mycol*. 2003;41(6):487-93.
348. Avkan-Oğuz V, Çelîk M, Eren-Kutsoylu O, Nazli A, Uğur YL, Taylan A, et al. Fungal colonization and infections in patients with COVID-19 in intensive care units: A real-life experience at a tertiary-care hospital. *Respir Med Res*. 2022;82:100937.
349. Romeo O, Scordino F, Pernice I, Lo Passo C, Criseo G. A multiplex PCR protocol for rapid identification of *Candida glabrata* and its phylogenetically related species *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis*. *J Microbiol Methods*. 2009;79(1):117-20.
350. Eggimann P, Pittet D. *Candida* colonization index and subsequent infection in critically ill surgical patients: 20 years later. *Intensive Care Med*. 2014;40(10):1429-48.
351. Fanello S, Bouchara JP, Sauteron M, Delbos V, Parot E, Marot-Leblond A, et al. Predictive value of oral colonization by *Candida* yeasts for the onset of a nosocomial infection in elderly hospitalized patients. *J Med Microbiol*. 2006;55(Pt 2):223-8.
352. Rosenvinge FS, Dzajic E, Knudsen E, Malig S, Andersen LB, Løvig A, et al. Performance of matrix-assisted laser desorption-time of flight mass spectrometry for identification of clinical yeast isolates. *Mycoses*. 2013;56(3):229-35.
353. Pinto-Magalhães S, Martins A, Lacerda S, Filipe R, Prista-Leão B, Pinheiro D, et al. Candidemia in a Portuguese tertiary care hospital: Analysis of a 2-year period. *J Mycol Med*. 2019;29(4):320-4.
354. Tuor M, LeibundGut-Landmann S. The skin mycobiome and intermicrobial interactions in the cutaneous niche. *Curr Opin Microbiol*. 2023;76:102381.
355. Sasso M, Roger C, Poujol H, Barbar S, Lefrant JY, Lachaud L. Changes in the distribution of colonising and infecting *Candida* spp. isolates, antifungal drug consumption and susceptibility in a French intensive care unit: A 10-year study. *Mycoses*. 2017;60(12):770-80.
356. Giacobbe DR, Maraolo AE, Simeon V, Magnè F, Pace MC, Gentile I, et al. Changes in the relative prevalence of candidaemia due to non-*albicans* *Candida* species in adult

- in-patients: A systematic review, meta-analysis and meta-regression. *Mycoses*. 2020;63(4):334-42.
357. M El-Ganiny A, E Yossef N, A Kamel H. Prevalence and antifungal drug resistance of nosocomial *Candida* species isolated from two university hospitals in Egypt. *Curr Med Mycol*. 2021;7(1):31-7.
358. Wang B, He X, Lu F, Li Y, Wang Y, Zhang M, et al. Isolates From Blood and Other Normally Sterile Foci From ICU Patients: Determination of Epidemiology, Antifungal Susceptibility Profile and Evaluation of Associated Risk Factors. *Front Public Health*. 2021;9:779590.
359. Bailly S, Maubon D, Fournier P, Pelloux H, Schwebel C, Chapuis C, et al. Impact of antifungal prescription on relative distribution and susceptibility of *Candida* spp. - Trends over 10 years. *J Infect*. 2016;72(1):103-11.
360. Ahmad S, Asadzadeh M. Strategies to Prevent Transmission of *Candida auris* in Healthcare Settings. *Curr Fungal Infect Rep*. 2023;17(1):36-48.
361. Schroeder M, Weber T, Denker T, Winterland S, Wichmann D, Rohde H, et al. Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia in critically ill patients in Germany: a single-center retrospective 10-year analysis. *Ann Intensive Care*. 2020;10(1):142.
362. Macauley P, Epelbaum O. Epidemiology and Mycology of Candidaemia in non-oncological medical intensive care unit patients in a tertiary center in the United States: Overall analysis and comparison between non-COVID-19 and COVID-19 cases. *Mycoses*. 2021;64(6):634-40.
363. Haghighatfard A, Abbasi S, Alijani P, Afyooni Akbari F, Rashidi H, Dehghan P. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia in intensive care units in Isfahan, Iran. *Curr Med Mycol*. 2022;8(3):30-4.
364. Boattini M, Pinto MF, Christaki E, Fasciana T, Falces-Romero I, Tofarides A, et al. Multicentre Surveillance of *Candida* Species from Blood Cultures during the SARS-CoV-2 Pandemic in Southern Europe (CANCoVEU Project). *Microorganisms*. 2023;11(3):560.
365. Willger SD, Grim SL, Dolben EL, Shipunova A, Hampton TH, Morrison HG, et al. Characterization and quantification of the fungal microbiome in serial samples from individuals with cystic fibrosis. *Microbiome*. 2014;2:40.
366. Krause R, Moissl-Eichinger C, Halwachs B, Gorkiewicz G, Berg G, Valentin T, et al. Mycobiome in the Lower Respiratory Tract - A Clinical Perspective. *Front Microbiol*. 2016;7:2169.
367. Delhaes L, Monchy S, Fréalle E, Hubans C, Salleron J, Leroy S, et al. The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community--implications for therapeutic management. *PLoS One*. 2012;7(4):e36313.
368. Taverne-Ghadwal L, Kuhns M, Buhl T, Schulze MH, Mbaitolum WJ, Kersch L, et al. Epidemiology and Prevalence of Oral Candidiasis in HIV Patients From Chad in the Post-HAART Era. *Front Microbiol*. 2022;13:844069.
369. da Matta DA, Souza ACR, Colombo AL. Revisiting Species Distribution and Antifungal Susceptibility of *Candida* Bloodstream Isolates from Latin American Medical Centers. *J Fungi (Basel)*. 2017;3(2).
370. Khan Z, Ahmad S, Al-Sweih N, Mokaddas E, Al-Banwan K, Alfouzan W, et al. Changing trends in epidemiology and antifungal susceptibility patterns of six bloodstream *Candida* species isolates over a 12-year period in Kuwait. *PLoS One*. 2019;14(5):e0216250.

371. Fakhim H, Vaezi A, Javidnia J, Nasri E, Mahdi D, Diba K, et al. *Candida africana* vulvovaginitis: Prevalence and geographical distribution. J Mycol Med. 2020;30(3):100966.
372. Díaz-García J, Mesquida A, Sánchez-Carrillo C, Reigadas E, Muñoz P, Escribano P, et al. Monitoring the Epidemiology and Antifungal Resistance of Yeasts Causing Fungemia in a Tertiary Care Hospital in Madrid, Spain: Any Relevant Changes in the Last 13 Years? Antimicrob Agents Chemother. 2021;65(4).
373. Díaz-García J, Gómez A, Machado M, Alcalá L, Reigadas E, Sánchez-Carrillo C, et al. Blood and intra-abdominal *Candida* spp. from a multicentre study conducted in Madrid using EUCAST: emergence of fluconazole resistance in *Candida parapsilosis*, low echinocandin resistance and absence of *Candida auris*. J Antimicrob Chemother. 2022;77(11):3102-3109.
374. Tsay S, Kallen A, Jackson BR, Chiller TM, Vallabhaneni S. Approach to the Investigation and Management of Patients With *Candida auris*, an Emerging Multidrug-Resistant Yeast. Clin Infect Dis. 2018;66(2):306-11.
375. Kajihara T, Yahara K, Nagi M, Kitamura N, Hirabayashi A, Hosaka Y, et al. Distribution, trends, and antifungal susceptibility of *Candida* species causing candidemia in Japan, 2010-2019: A retrospective observational study based on national surveillance data. Med Mycol. 2022;60(9):myac071.
376. Correia A, Sampaio P, Almeida J, Pais C. Study of molecular epidemiology of candidiasis in Portugal by PCR fingerprinting of *Candida* clinical isolates. J Clin Microbiol. 2004;42(12):5899-903.
377. Costa-de-Oliveira S, Pina-Vaz C, Mendonça D, Gonçalves Rodrigues A. A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008;27(5):365-74.
378. Ziccardi M, Souza LO, Gandra RM, Galdino AC, Baptista AR, Nunes AP, et al. *Candida parapsilosis* (*sensu lato*) isolated from hospitals located in the Southeast of Brazil: Species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes. Int J Med Microbiol. 2015;305(8):848-59.
379. Pharkjaksu S, Chongtrakool P, Suwannakarn K, Ngamskulrungrroj P. Species distribution, virulence factors, and antifungal susceptibility among *Candida parapsilosis* complex isolates from clinical specimens at Siriraj Hospital, Thailand, from 2011 to 2015. Med Mycol. 2018;56(4):426-33.
380. Dalla Lana DF, Falci DR, Sanha V, Jaskulski Filho SD, Schuch F, Pasqualotto AC. Candidaemia Mortality Has not Changed Over the Last 2 Decades in Brazil. Mycopathologia. 2020;185(4):685-90.
381. Kaan Ö, Koç AN, Atalay MA, Mutlu Sarigüzel F. Molecular epidemiology, antifungal susceptibility and virulence factors of *Candida glabrata* complex strains in Kayseri/Turkey. Microb Pathog. 2021;154:104870.
382. Nasri E, Vaezi A, Falahatinejad M, Rizi MH, Sharifi M, Sadeghi S, et al. Species distribution and susceptibility profiles of oral candidiasis in hematological malignancy and solid tumor patients. Braz J Microbiol. 2023;54(1):143-9.
383. Sikora M, Kuthan R, Piskorska-Malolepsza K, Golas-Pradzynska M, Domański D, Augustynowicz-Kopeć E, et al. Prevalence and Antifungal Susceptibility of the Emerging Fungal Species, *Candida nivariensis*, Isolated in a Teaching Hospital in Poland. Pol J Microbiol. 2019;68(3):303-8.
384. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Isla G, Rodriguez D, Almirante B, Pahissa A, et al. Prevalence of *Candida bracarensis* and *Candida nivariensis* in a Spanish collection

- of yeasts: comparison of results from a reference centre and from a population-based surveillance study of candidemia. *Med Mycol*. 2011;49(5):525-9.
385. Díaz E, Turégano C. Daily skin antisepsis and hygiene in the critically ill patient. *Med Intensiva (Engl Ed)*. 2019;43 Suppl 1:13-7.
386. Proctor DM, Dangana T, Sexton DJ, Fukuda C, Yelin RD, Stanley M, et al. Integrated genomic, epidemiologic investigation of *Candida auris* skin colonization in a skilled nursing facility. *Nat Med*. 2021;27(8):1401-9.
387. Sabino R, Veríssimo C, Pereira Á, Antunes F. *Candida auris*, an Agent of Hospital-Associated Outbreaks: Which Challenging Issues Do We Need to Have in Mind? *Microorganisms*. 2020;8(2):181.
388. Weber DJ, Sickbert-Bennett EE, Kanamori H, Rutala WA. New and emerging infectious diseases (Ebola, Middle Eastern respiratory syndrome coronavirus, carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, *Candida auris*): Focus on environmental survival and germicide susceptibility. *Am J Infect Control*. 2019;47S:A29-A38.
389. Cortegiani A, Misseri G, Fasciana T, Giammanco A, Giaratano A, Chowdhary A. Epidemiology, clinical characteristics, resistance, and treatment of infections by *Candida auris*. *J Intensive Care*. 2018;6:69.
390. Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender NP, et al. Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. *Clin Infect Dis*. 2017;64(2):134-40.
391. Ostrowsky B, Greenko J, Adams E, Quinn M, O'Brien B, Chaturvedi V, et al. *Candida auris* Isolates Resistant to Three Classes of Antifungal Medications - New York, 2019. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2020;69(1):6-9.
392. Aldejohann AM, Wiese-Posselt M, Gastmeier P, Kurzai O. Expert recommendations for prevention and management of *Candida auris* transmission. *Mycoses*. 2022;65(6):590-8.
393. Wang TZ, White KN, Scarr JV, Simon MS, Calfee DP. Preparing your healthcare facility for the new fungus among us: An infection preventionist's guide to *Candida auris*. *Am J Infect Control*. 2020;48(7):825-7.
394. Sexton DJ, Kordalewska M, Bentz ML, Welsh RM, Perlin DS, Litvintseva AP. Direct Detection of Emergent Fungal Pathogen *Candida auris* in Clinical Skin Swabs by SYBR Green-Based Quantitative PCR Assay. *J Clin Microbiol*. 2018;56(12): e01337-18.
395. de Melo CC, de Sousa BR, da Costa GL, Oliveira MME, de Lima-Neto RG. Colonized patients by *Candida auris*: Third and largest outbreak in Brazil and impact of biofilm formation. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13:1033707.
396. Heindel J, Zweigner J, Fuchs F, Hamprecht A. Usefulness of screening for *Candida auris* colonisation in international patients admitted to a large university hospital. *Mycoses*. 2022;66(2):138-143.
397. Carty J, Chowdhary A, Bernstein D, Thangamani S. Tools and techniques to identify, study, and control *Candida auris*. *PLoS Pathog*. 2023;19(10):e1011698.
398. Kumar A, Sachu A, Mohan K, Vinod V, Dinesh K, Karim S. Simple low cost differentiation of *Candida auris* from *Candida haemulonii* complex using CHROMagar *Candida* medium supplemented with Pal's medium. *Rev Iberoam Micol*. 2017;34(2):109-11.
399. White PL, Price JS, Cordey A, Backx M. Molecular Diagnosis of Yeast Infections. *Curr Fungal Infect Rep*. 2021;15(3):67-80.

400. Contreras DA, Morgan MA. Surveillance diagnostic algorithm using real-time PCR assay and strain typing method development to assist with the control of *C. auris* amid COVID-19 pandemic. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:887754.
401. Taori SK, Rhodes J, Khonyongwa K, Szendroi A, Smith M, Borman AM, et al. First experience of implementing *Candida auris* real-time PCR for surveillance in the UK: detection of multiple introductions with two international clades and improved patient outcomes. *J Hosp Infect*. 2022;127:111-20.
402. Geremia N, Brugnaro P, Solinas M, Scarparo C, Panese S. as an Emergent Public *Candida auris* as an Emergent Public Health Problem: A Current Update on European Outbreaks and Cases. *Healthcare (Basel)*. 2023;11(3).
403. Sharp A, Muller-Pebody B, Charlett A, Patel B, Gorton R, Lambourne J, et al. Screening for *Candida auris* in patients admitted to eight intensive care units in England, 2017 to 2018. *Euro Surveill*. 2021;26(8) 1900730.
404. Khairat SM, Anany MG, Ashmawy MM, Hussein AFA. Setting a Protocol for Identification and Detecting the Prevalence of *Candida auris* in Tertiary Egyptian Hospitals Using the CDC Steps. *Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2021;14(9(A)):397-402.
405. Pacilli M, Kerins JL, Clegg WJ, Walblay KA, Adil H, Kemble SK, et al. Regional Emergence of *Candida auris* in Chicago and Lessons Learned From Intensive Follow-up at 1 Ventilator-Capable Skilled Nursing Facility. *Clin Infect Dis*. 2020;71(11):e718-e25.
406. Worth LJ, Harrison SJ, Dickinson M, van Diemen A, Breen J, Harper S, et al. *Candida auris* in an Australian health care facility: importance of screening high risk patients. *Med J Aust*. 2020;212(11):510-1.e1.
407. Piatti G, Sartini M, Cusato C, Schito AM. Colonization by *Candida auris* in critically ill patients: role of cutaneous and rectal localization during an outbreak. *J Hosp Infect*. 2022;120:85-9.
408. Shastri PS, Shankarnarayan SA, Oberoi J, Rudramurthy SM, Wattal C, Chakrabarti A. *Candida auris* candidaemia in an intensive care unit - Prospective observational study to evaluate epidemiology, risk factors, and outcome. *J Crit Care*. 2020;57:42-8.
409. Das S, Tigga R, Rai G, Singh PK, Datt S, Tyagi A, et al. *Candida auris* colonization in an immunocompetent patient: A new threat in medical ICU. *Med Mycol Case Rep*. 2018;21:54-6.
410. León C, Alvarez-Lerma F, Ruiz-Santana S, León MA, Nolla J, Jordá R, et al. Fungal colonization and/or infection in non-neutropenic critically ill patients: results of the EPCAN observational study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28(3):233-42.
411. León C, Ostrosky-Zeichner L, Schuster M. What's new in the clinical and diagnostic management of invasive candidiasis in critically ill patients. *Intensive Care Med*. 2014;40(6):808-19.
412. Ferreira D, Grenouillet F, Blasco G, Samain E, Hénon T, Dussaucy A, et al. Outcomes associated with routine systemic antifungal therapy in critically ill patients with *Candida* colonization. *Intensive Care Med*. 2015;41(6):1077-88.
413. Quindós G, Marcos-Arias C, San-Millán R, Mateo E, Eraso E. The continuous changes in the aetiology and epidemiology of invasive candidiasis: from familiar *Candida albicans* to multiresistant *Candida auris*. *Int Microbiol*. 2018;21(3):107-19.
414. Caggiano G, Puntillo F, Coretti C, Giglio M, Alicino I, Manca F, et al. *Candida* colonization index in patients admitted to an ICU. *Int J Mol Sci*. 2011;12(10):7038-47.
415. Tukenmez Tigen E, Bilgin H, Perk Gurun H, Dogru A, Ozben B, Cerikcioglu N, et al. Risk factors, characteristics, and outcomes of candidemia in an adult intensive care unit in Turkey. *Am J Infect Control*. 2017;45(6):e61-e3.

416. Playford EG, Lipman J, Kabir M, McBryde ES, Nimmo GR, Lau A, et al. Assessment of clinical risk predictive rules for invasive candidiasis in a prospective multicentre cohort of ICU patients. *Intensive Care Med.* 2009;35(12):2141-5.
417. Chakraborti A, Jaiswal A, Verma PK, Singhal R. A Prospective Study of Fungal Colonization and Invasive Fungal Disease in Long-Term Mechanically Ventilated Patients in a Respiratory Intensive Care Unit. *Indian J Crit Care Med.* 2018;22(8):597-601.
418. Huang D, Qi M, Hu Y, Yu M, Liang Z. The impact of *Candida* spp airway colonization on clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia: A systematic review and meta-analysis. *Am J Infect Control.* 2020;48(6):695-701.
419. Colaneri M, Giusti EM, Genovese C, Galli L, Lombardi A, Gori A. Mortality of Patients With Candidemia and COVID-19: A Systematic Review With Meta-analysis. *Open Forum Infect Dis.* 2023;10(7):ofad358.
420. Kayaaslan B, Kaya Kalem A, Asilturk D, Kaplan B, Dönertas G, Hasanoglu I, et al. Incidence and risk factors for COVID-19 associated candidemia (CAC) in ICU patients. *Mycoses.* 2022;65(5):508-16.
421. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(2):288-305.
422. Adam KM, Osthoff M, Lamoth F, Conen A, Erard V, Boggian K, et al. Trends of the Epidemiology of Candidemia in Switzerland: A 15-Year FUNGINOS Survey. *Open Forum Infect Dis.* 2021;8(10):ofab471.
423. Sticchi C, Raso R, Ferrara L, Vecchi E, Ferrero L, Filippi D, et al. Increasing Number of Cases Due to *Candida auris* in North Italy, July 2019-December 2022. *J Clin Med.* 2023;12(5):1912.
424. Hinrichs C, Wiese-Posselt M, Graf B, Geffers C, Weikert B, Enghard P, et al. Successful control of *Candida auris* transmission in a German COVID-19 intensive care unit. *Mycoses.* 2022;65(6):643-9.
425. Hamprecht A, Barber AE, Mellinghoff SC, Thelen P, Walther G, Yu Y, et al. *Candida auris* in Germany and Previous Exposure to Foreign Healthcare. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(9):1763-5.
426. Desnos-Ollivier M, Fekkar A, Bretagne S. Earliest case of *Candida auris* infection imported in 2007 in Europe from India prior to the 2009 description in Japan. *J Mycol Med.* 2021;31(3):101139.
427. Garcia-Jeldes HF, Mitchell R, McGeer A, Rudnick W, Amaratunga K, Vallabhaneni S, et al. Prevalence of *Candida auris* in Canadian acute care hospitals among at-risk patients, 2018. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2020;9(1):82.
428. Lyman M, Forsberg K, Sexton DJ, Chow NA, Lockhart SR, Jackson BR, et al. Worsening Spread of *Candida auris* in the United States, 2019 to 2021. *Ann Intern Med.* 2023;176(4):489-95.
429. Li Z, Jiang C, Dong D, Zhang L, Tian Y, Ni Q, et al. The Correlation Between *Candida* Colonization of Distinct Body Sites and Invasive Candidiasis in Emergency Intensive Care Units: Statistical and Molecular Biological Analysis. *Mycopathologia.* 2016;181(7-8):475-84.
430. Hérivaux A, Willis JR, Mercier T, Lagrou K, Gonçalves SM, Gonçalves RA, et al. Lung microbiota predict invasive pulmonary aspergillosis and its outcome in immunocompromised patients. *Thorax.* 2022;77(3):283-91.

431. Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(3):143-55.
432. Hannigan GD, Grice EA. Microbial ecology of the skin in the era of metagenomics and molecular microbiology. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(12):a015362.
433. Kim HJ, Oh HN, Park T, Kim H, Lee HG, An S, et al. Aged related human skin microbiome and mycobiome in Korean women. *Sci Rep.* 2022;12(1):2351.
434. Szczepańska M, Blicharz L, Nowaczyk J, Makowska K, Goldust M, Waśkiel-Burnat A, et al. The Role of the Cutaneous Mycobiome in Atopic Dermatitis. *J Fungi (Basel).* 2022;8(11):1153.
435. Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(4):244-53.
436. Carrieri AP, Haiminen N, Maudsley-Barton S, Gardiner LJ, Murphy B, Mayes AE, et al. Explainable AI reveals changes in skin microbiome composition linked to phenotypic differences. *Sci Rep.* 2021;11(1):4565.
437. Halwachs B, Madhusudhan N, Krause R, Nilsson RH, Moissl-Eichinger C, Högenauer C, et al. Critical Issues in Mycobiota Analysis. *Front Microbiol.* 2017;8:180.
438. Grimshaw SG, Smith AM, Arnold DS, Xu E, Hoptroff M, Murphy B. The diversity and abundance of fungi and bacteria on the healthy and dandruff affected human scalp. *PLoS One.* 2019;14(12):e0225796.
439. Nguyen UT, Kalan LR. Forgotten fungi: the importance of the skin mycobiome. *Curr Opin Microbiol.* 2022;70:102235.
440. Han SH, Cheon HI, Hur MS, Kim MJ, Jung WH, Lee YW, et al. Analysis of the skin mycobiome in adult patients with atopic dermatitis. *Exp Dermatol.* 2018;27(4):366-73.
441. Mareković I, Pleško S, Rezo Vranješ V, Herljević Z, Kuliš T, Jandrić M. Epidemiology of Candidemia: Three-Year Results from a Croatian Tertiary Care Hospital. *J Fungi (Basel).* 2021;7(4).
442. Liu YX, Qin Y, Chen T, Lu M, Qian X, Guo X, et al. A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. *Protein Cell.* 2021;12(5):315-30.
443. Viciani E, Gaibani P, Castagnetti A, Liberatore A, Bartoletti M, Viale P, et al. Critically ill patients with COVID-19 show lung fungal dysbiosis with reduced microbial diversity in patients colonized with *Candida* spp. *Int J Infect Dis.* 2022;117:233-40.
444. Keum HL, Kim H, Kim HJ, Park T, Kim S, An S, et al. Structures of the Skin Microbiome and Mycobiome Depending on Skin Sensitivity. *Microorganisms.* 2020;8(7).
445. Huang X, Welsh RM, Deming C, Proctor DM, Thomas PJ, Gussin GM, et al. Skin Metagenomic Sequence Analysis of Early *Candida auris* Outbreaks in U.S. Nursing Homes. *mSphere.* 2021;6(4):e0028721.
446. Proctor DM, Drummond RA, Lionakis MS, Segre JA. One population, multiple lifestyles: Commensalism and pathogenesis in the human mycobiome. *Cell Host Microbe.* 2023;31(4):539-53.
447. Watkins RR, Mukherjee PK, Chandra J, Retuerto MA, Guidry C, Haller N, et al. Admission to the Intensive Care Unit is Associated With Changes in the Oral Mycobiome. *J Intensive Care Med.* 2017;32(4):278-82.
448. Song Y, Kim MS, Chung J, Na HS. Simultaneous Analysis of Bacterial and Fungal Communities in Oral Samples from Intubated Patients in Intensive Care Unit. *Diagnostics (Basel).* 2023;13(10).
449. Shajiei A, Liu L, Seinen J, Dieperink W, Hammerschmidt S, van Dijk JM, et al. Specific associations between fungi and bacteria in broncho-alveolar aspirates from mechanically ventilated intensive care unit patients. *Virulence.* 2022;13(1):2022-31.

450. WHO. Antimicrobial Resistance. 2023 [Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acedido em outubro de 2023].
451. WHO. World Health Organization. 2022 [Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>. Acedido em novembro de 2022].
452. Bal AM. European confederation of medical mycology quality of clinical candidaemia management score: A review of the points based best practice recommendations. *Mycoses*. 2021;64(2):123-31.
453. Tan J, Song Y, Liu W, Wang X, Zhang J, Chen W, et al. Molecular genotyping of *Candida albicans* isolated from different sites may trace the etiological infection routes: Observation in China. *Mycoses*. 2021;64(8):841-50.
454. Naicker SD, Shuping L, Zulu TG, Mpembe RS, Mhlanga M, Tsotetsi EM, et al. Epidemiology and susceptibility of *Nakaseomyces* (formerly *Candida*) *glabrata* bloodstream isolates from hospitalised adults in South Africa. *Med Mycol*. 2023;61(6):myad057.
455. bioMérieux. Summary of etest. Performance interpretative criteria and quality control ranges Marcy l'Étoile: bioMérieux. 2018.
456. Lass-Flörl C, Arendrup MC, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Donnelly P, Hope W, et al. EUCAST technical note on Amphotericin B. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(12):E27-9.
457. Lindberg E, Hammarström H, Ataollahy N, Kondori N. Species distribution and antifungal drug susceptibilities of yeasts isolated from the blood samples of patients with candidemia. *Sci Rep*. 2019;9(1):3838.
458. Wayne P. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard. In Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI document M27-A2.
459. Lockhart SR, Berkow EL, Chow N, Welsh RM. for the clinical microbiology laboratory: Not your grandfather's *Candida* species. *Clin Microbiol Newsl*. 2017;39(13):99-103.
460. Dabas Y, Xess I, Pandey M, Ahmed J, Sachdev J, Iram A, et al. Epidemiology and Antifungal Susceptibility Patterns of Invasive Fungal Infections (IFIs) in India: A Prospective Observational Study. *J Fungi (Basel)*. 2021;8(1):33.
461. Vannini M, Emery S, Lieutier-Colas F, Legueult K, Mondain V, Retur N, et al. Epidemiology of candidemia in NICE area, France: A five-year study of antifungal susceptibility and mortality. *J Mycol Med*. 2022;32(1):101210.
462. Espinel-Ingroff A, Turnidge J, Alastruey-Izquierdo A, Botterel F, Canton E, Castro C, et al. Method-Dependent Epidemiological Cutoff Values for Detection of Triazole Resistance in *Candida* and *Aspergillus* Species for the Sensititre YeastOne Colorimetric Broth and Etest Agar Diffusion Methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(1):e01651-18.
463. Martini C, Torelli R, de Groot T, De Carolis E, Morandotti GA, De Angelis G, et al. Prevalence and Clonal Distribution of Azole-Resistant. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:232.
464. Asmundsdottir LR, Erlendsdottir H, Gottfredsson M. Nationwide study of candidemia, antifungal use, and antifungal drug resistance in Iceland, 2000 to 2011. *J Clin Microbiol*. 2013;51(3):841-8.

465. Trouvé C, Blot S, Hayette MP, Jonckheere S, Patteet S, Rodriguez-Villalobos H, et al. Epidemiology and reporting of candidaemia in Belgium: a multi-centre study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(4):649-55.
466. Israel S, Amit S, Israel A, Livneh A, Nir-Paz R, Korem M. The Epidemiology and Susceptibility of Candidemia in Jerusalem, Israel. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:352.
467. Mete B, Zerdali EY, Aygun G, Saltoglu N, Balkan II, Karaali R, et al. Change in species distribution and antifungal susceptibility of candidemias in an intensive care unit of a university hospital (10-year experience). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2021;40(2):325-33.
468. Cornely, O. A., Sprute, R., Bassetti, M., Chen, S. C., Groll, A. H., Kurzai, O., ... & Zhu, L. P. Global guideline for the diagnosis and management of candidiasis: an initiative of the ECMM in cooperation with ISHAM and ASM. *The Lancet Infectious Diseases*. 2025.
469. Daneshnia F, Hilmioğlu-Polat S, Ilkit M, Fuentes D, Lombardi L, Binder U, et al. Whole-genome sequencing confirms a persistent candidaemia clonal outbreak due to multidrug-resistant *Candida parapsilosis*. *J Antimicrob Chemother*. 2023;78(6):1488-94.
470. Franconi I, Rizzato C, Poma N, Tavanti A, Lupetti A. Antifungal Resistance Mechanisms and Associated Epidemiology. *J Fungi (Basel)*. 2023;9(8):798.
471. Presente S, Bonnal C, Normand AC, Gaudonnet Y, Fekkar A, Timsit JF, et al. Hospital Clonal Outbreak of Fluconazole-Resistant *Candida parapsilosis* Harboring the Y132F ERG11p Substitution in a French Intensive Care Unit. *Antimicrob Agents Chemother*. 2023;67(3):e0113022.
472. Thomaz DY, Del Negro GMB, Ribeiro LB, da Silva M, Carvalho GOMH, Camargo CH, et al. A Brazilian Inter-Hospital Candidemia Outbreak Caused by Fluconazole-Resistant. *J Fungi (Basel)*. 2022;8(2):100.
473. Gil-Alonso S, Quindós G, Cantón E, Eraso E, Jauregizar N. Killing kinetics of anidulafungin, caspofungin and micafungin against *Candida parapsilosis* species complex: Evaluation of the fungicidal activity. *Rev Iberoam Micol*. 2019;36(1):24-9.
474. Wang Y, Fan X, Wang H, Kudinha T, Mei YN, Ni F, et al. Continual Decline in Azole Susceptibility Rates in *Candida tropicalis* Over a 9-Year Period in China. *Front Microbiol*. 2021;12:702839.
475. Boonsilp S, Homkaew A, Phumisantiphong U, Nutalai D, Wongsuk T. Species Distribution, Antifungal Susceptibility, and Molecular Epidemiology of *Candida* Species Causing Candidemia in a Tertiary Care Hospital in Bangkok, Thailand. *J Fungi (Basel)*. 2021;7(7):577.
476. Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD, Jiménez-Ortigosa C, Catania J, Booker R, et al. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin Infect Dis*. 2013;56(12):1724-32.
477. Vieira F, Nascimento T. *Candida* Antifungal Resistance and Therapeutic Approach. *Revista Portuguesa De Farmacoterapia*. 2017;9(3):29-36.
478. Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *J Infect Dis*. 2017;216(suppl_3):S445-S51.
479. Yamada K, Yanagihara K, Kaku N, Harada Y, Migiyama Y, Nagaoka K, et al. Azithromycin attenuates lung inflammation in a mouse model of ventilator-associated pneumonia by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(8):3883-8.

9. Anexos

9.1 Documentos

9.1.1 Anexo 1- Consentimento Informado



CONSENTIMENTO INFORMADO, LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM INVESTIGAÇÃO

de acordo com a Declaração de Helsínquia¹ e a Convenção de Oviedo²

Por favor, leia com atenção a seguinte informação. Se achar que algo está incorreto ou que não está claro, não hesite em solicitar mais informações. Se concorda com a proposta que lhe foi feita, queira rubricar e assinar este documento.

Título do estudo “Caracterização do microbioma da pele em unidades de cuidados intensivos e serviços clínicos ambulatoriais”.

Instituição Promotora: Instituto de Higiene e Medicina Tropical/Universidade Nova de Lisboa (IHMT/UNL)/Instituto Universitário Egas Moniz

Investigadores para contacto: Teresa Nascimento (tnascimento@egasmoniz.edu.pt) +351914001620

A infeção disseminada por fungos e particularmente por *Candida* é uma ameaça para a saúde pública e afeta grande parte dos doentes internados. Uma das medidas de controlo da doença é o recurso a medicamentos. No entanto, a resistência de *Candida auris* e outras espécies de *Candida* à maioria dos medicamentos em uso é um dos maiores obstáculos ao controlo eficaz da doença. Com este estudo pretendemos detetar a presença destas leveduras e identificar o perfil de resistências permitindo uma atuação atempada e eficaz. Os resultados deste projeto irão contribuir para um melhor controlo da infeção por fungos, indo ao encontro dos objetivos da Organização Mundial de Saúde.

Este estudo servirá de base para a vigilância da presença de *Candida auris* na sua unidade de tratamento e pode trazer benefícios tais como saber se as espécies de *Candida* nas mucosas (axila e virilha) são inofensivas ou potenciais responsáveis por doença, e ter ainda conhecimento sobre a sensibilidade destas leveduras aos medicamentos.

Pedimos-lhe que as suas amostras de exsudado axilar e inguinal, recolhidas na admissão ao serviço de medicina intensiva e ao quinto e oitavo dia de permanência na unidade possam vir a ser utilizadas para fins científicos e conservadas no bio banco do IHMT/UNL. Pediremos também que responda a um pequeno questionário em anexo a este documento de consentimento. Ao presente documento e ao questionário que o acompanha, será atribuído o mesmo código.

Toda a informação recolhida é confidencial e anónima. Os dados recolhidos durante o processo serão analisados e processados a nível estatístico, não identificando individualmente os participantes. Os dados a recolher estão descritos na página seguinte no Formulário Individual.

A sua participação é voluntária e não envolve qualquer tipo de compensação monetária. Se decidir não participar isso não terá consequências. Não existem riscos ou desconfortos previsíveis por participar neste estudo.

A EQUIPA DE INVESTIGAÇÃO AGRADECE A SUA PARTICIPAÇÃO E COLABORAÇÃO

¹ https://www.ordemdosmedicos.pt/up/ficheiros-bin2_ficheiro_pt_0077090001371555285-672.pdf

² <http://dre.pt/pdf1sdip/2001/01/002A00/00140036.pdf>



Caracterização do microbioma em UCI
Pesquisa de *Candida auris*
Formulário Individual

Datas de colheita:

- ☐ Admissão
☐ D5
☐ D8

Serviço: _____
Data De Admissão: _____
Nº de Processo interno: _____

Nº de Processo: _____
Data de Nascimento: _____

Género: ☐ Masculino ☐ Feminino

Profissão: _____

Etnia: _____

Histórico de viagens (últimos 3 meses):

- ☐ Espanha
☐ Reino Unido
☐ EUA
☐ Índia/Paquistão
☐ Outro

- ☐ Infecção Primária ou desconhecida
☐ Relacionada com CVC

Internamento secundário a:

- ☐ Infecção urinária
☐ Infecção respiratória
☐ Infecção gastrointestinal
☐ Infecção intra-abdominal
☐ Infecção do local cirúrgico
☐ Infecção de pele e tecidos moles
☐ Outros

Terapêutica prévia com:

- ☐ Fluconazol
☐ Amoxicilina-Ac. Clavulânico
☐ Penicilina
☐ Cefotaxima
☐ Ceftriaxone
☐ Ceftazidima
☐ Cefoxitina
☐ Meticilina/oxacilina
☐ Outro

Fatores de risco extrínsecos

- ☐ Cateter intravascular central
☐ Alimentação parentérica
☐ Hemodiálise
☐ Ventilação assistida invasiva
☐ Cateter vesical
☐ Cirurgia

Fatores de risco intrínseco:

- ☐ VIH/SIDA
☐ Linfoma
☐ Leucemia
☐ Outra neoplasia
☐ Outra imunodeficiência
☐ Neutropenia (< 500/mm³)
☐ Hemoglobina (<10 mg/dl)
☐ Diabetes
☐ SARS-CoV-2



O investigador que pede o consentimento: Teresa Maria Silva do Nascimento

Assinatura do investigador que pede consentimento:

-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-

Declaro ter lido e compreendido este documento, bem como as informações verbais que me foram fornecidas pela pessoa que acima assina. Desta forma, aceito participar neste estudo e permito a utilização dos produtos biológicos que de forma voluntária forneço, confiando em que apenas serão utilizados para investigação relacionada com pesquisa de fungos (Candida spp.) e nas garantias de confidencialidade e anonimato que me são dadas pelo investigador.

Nome:

Assinatura:

Data:...../...../.....

SE NÃO FOR O PRÓPRIO A ASSINAR POR INCAPACIDADE

NOME:

BI/CD N°: DATA OU VALIDADE/...../.....

GRAU DE PARENTESCO OU TIPO DE REPRESENTAÇÃO:

ASSINATURA

**ESTE DOCUMENTO É COMPOSTO DE 3 PÁGINAS E FEITO EM DUPLICADO:
UMA VIA PARA O/A INVESTIGADOR/A, OUTRA PARA A PESSOA QUE CONSENTE**

9.1.2 Anexo 2- Inquérito de monitorização epidemiológica e clínica



Caracterização do microbioma em UCI Pesquisa de *Candida auris* Formulário Individual

Datas de colheita:

- ☐ Admissão
☐ D5
☐ D8

Serviço: _____
Data De Admissão: _____
Nº de Processo interno: _____

Nº de Processo: _____
Data de Nascimento: _____

Género: ☐ Masculino ☐ Feminino

Profissão: _____

Etnia: _____

Histórico de viagens (últimos 3 meses):

- ☐ Espanha
☐ Reino Unido
☐ EUA
☐ Índia/Paquistão
☐ Outro

- ☐ Infecção Primária ou desconhecida
☐ Relacionada com CVC

Internamento secundário a:

- ☐ Infecção urinária
☐ Infecção respiratória
☐ Infecção gastrointestinal
☐ Infecção intra-abdominal
☐ Infecção do local cirúrgico
☐ Infecção de pele e tecidos moles
☐ Outros

Terapêutica prévia com:

- ☐ Fluconazol
☐ Amoxicilina-Ac. Clavulânico
☐ Penicilina
☐ Cefotaxima
☐ Ceftriaxone
☐ Ceftazidima
☐ Cefoxitina
☐ Metilicina/oxacilina
☐ Outro

Fatores de risco extrínsecos

- ☐ Cateter intravascular central
☐ Alimentação parentérica
☐ Hemodiálise
☐ Ventilação assistida invasiva
☐ Cateter vesical
☐ Cirurgia

Fatores de risco intrínseco:

- ☐ VIH/SIDA
☐ Linfoma
☐ Leucemia
☐ Outra neoplasia
☐ Outra imunodeficiência
☐ Neutropenia ($< 500/\text{mm}^3$)
☐ Hemoglobina ($< 10 \text{ mg/dl}$)
☐ Diabetes
☐ SARS-CoV-2

Anexo 2- Protocolo de acompanhamento pela equipa clínica



Nº de identificação: _____

Caracterização do microbioma da pele em unidades de cuidados intensivos

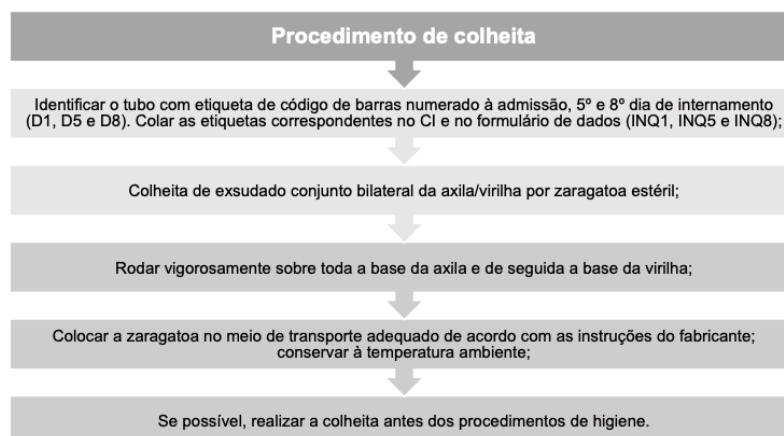
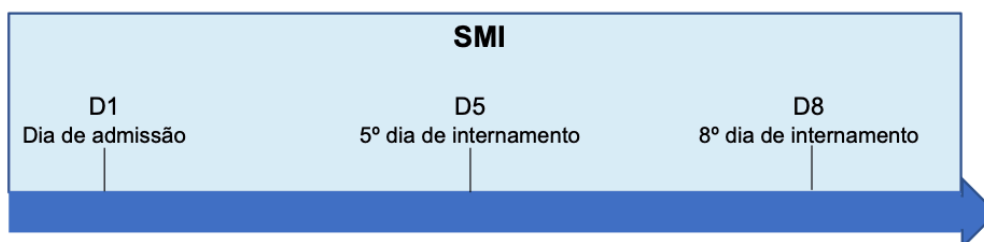
Os doentes abrangidos na investigação e grupo controlo serão recrutados na admissão, ao quinto e oitavo dia de permanência na unidade.

O **grupo de estudo** irá incluir os doentes que reúnam os fatores de inclusão seguintes: terapêutica prévia com antimicrobianos (últimas 48h), presença de dois ou mais dos seguintes fatores de risco extrínsecos (cateter intravascular central (CVC), nutrição parentérica (NP), hemodiálise, ventilação assistida invasiva (VAI), cateter vesical (CV), cirurgia (C)).

O **grupo controlo** irá incluir os doentes recrutados no processo de admissão, sendo a triagem realizada como parte do controlo de infeção de rotina no hospital. Os fatores de inclusão neste grupo compreendem: ausência de terapêutica prévia com antimicrobianos (últimas 48h), ausência de dois ou mais dos fatores de risco extrínsecos supracitados.

A todos os doentes admitidos no SMI será efetuada uma zaragatoa conjunta axila/virilha, sendo a sua atribuição ao grupo de estudo ou controlo determinada posteriormente pelos investigadores.

Em ambos os grupos serão **excluídos** do estudo os grupos vulneráveis (idade inferior a 18 anos, grávidas e indivíduos mentalmente incapacitados à admissão no SMI).

Cronograma das colheitas no Serviço de Medicina Intensiva

	Data (dd-mm-aaaa)
Admissão (1ª colheita)	
5º dia (2ª colheita)	
8º dia (3ª colheita)	

Consentimento Informado ☐

Anexo 2- Brochura de esclarecimento ao utente



INFORMAÇÃO AO UTENTE

Teste de despistagem para *Candida auris*

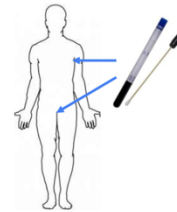
Candida auris (também chamada de *C. auris*) é um fungo que pode causar infeções graves. *C. auris* pode espalhar-se de um utente para outro em clínicas, hospitais e lares de idosos. Os utentes podem ser portadores de *C. auris* em algum lugar do corpo, mesmo que não estejam doentes. Quando isso acontece, *C. auris* pode espalhar-se e atingir outras pessoas ou objetos próximos, permitindo que o fungo se espalhe para as pessoas ao seu redor.

Porque estou a ser testado para *Candida auris*?

Pode ter entrado em contato com *C. auris* enquanto estava neste ou noutro estabelecimento de saúde. Para evitar que o fungo se espalhe, estamos a testar os utentes para ver se eles já transportam o fungo. Você pode estar com ele na pele sem ter uma infeção ou sintomas de infeção. A isto chama-se colonização. Felizmente, a maioria das pessoas que são portadoras de *C. auris* não adoecem. Fazer o teste de *C. auris* ajuda a nossa unidade de saúde a evitar que o fungo se espalhe na unidade e na comunidade.

Por que *C. auris* é preocupante?

- Pode causar infeções graves.
- Muitas vezes é resistente a medicamentos, dificultando o tratamento.
- É difícil identificar por meio de testes de laboratório de rotina.
- Pode espalhar-se em clínicas, hospitais e lares de idosos.



O que devo esperar se fizer o teste?

1. O profissional de saúde irá efetuar uma recolha conjunta da axila e da virilha fazendo rolar uma zaragatoa. O teste não é doloroso.
2. A zaragatoa será enviada ao laboratório de Microbiologia da Egas Moniz - Cooperativa de Ensino Superior, CRL e, em 1 a 2 semanas, o laboratório informará o seu médico dos resultados.
3. Se o teste mostrar que você é portador do fungo, o seu médico conversará consigo sobre os resultados e o que fazer em seguida.

Você pode escolher não ser testado. Converse com o seu médico se tiver dúvidas ou preocupações sobre o teste.

Adaptado de Centers Diseases Control Fact sheets about *Candida auris*

9.1.3 Anexo 3- Autorizações das comissões de ética



Exma. Senhora

Dr^a. Patrícia Patrício,

Médica do Serviço de Medicina Intensiva do
Hospital Beatriz Ângelo

Loures, 21 de julho de 2021

N/Ref.º 3655/2021_MJHMAB/FB

Estudo HBA n.º 579_LH n.º 337

Correio eletrónico e PMP

Assunto: "Caracterização do microbioma da pele em unidades de cuidados intensivos e serviços clínicos ambulatoriais."

Exma. Senhora Dr^a Patrícia Patrício,

No seguimento da submissão a este Hospital do estudo melhor identificado em epígrafe, no qual V. Exa. participa na qualidade de Investigador Principal, temos o prazer de informar que a Comissão de Ética para a Saúde (CES) do HBA considera asseguradas as questões éticas relacionadas com a realização do estudo, pelo que deliberou a sua aprovação em reunião ordinária do dia 02 de julho do corrente ano.

Com os nossos melhores cumprimentos,

A Presidente da Comissão de Ética para a Saúde do HBA

Maria João Heitor



PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA

Nº de identificação de registo 54/2019

TIPO DE ESTUDO: ESTUDO CLINICO
TÍTULO DO ESTUDO: "Caracterização do microbioma da pele em Unidades de Cuidados Intensivos"

Após reunião de 25 de Setembro de 2019, Tendo os pareceres favoráveis da UIC (Unidade Investigação Clínica) e do EPD (Encarregado Protecção de Dados), apresentando-se o estudo de acordo com as normas de submissão impostas por esta CES, deliberou-se emitir parecer favorável para a realização do mesmo

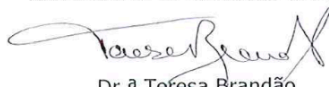
Ouvido o Relator, o processo foi votado pelos Membros da Comissão de Ética para a Saúde do Hospital Prof. Dr. Fernando Fonseca, EPE a 25 de Setembro de 2019:

Presidente	Dr.ª Teresa Brandão
Vice – presidente	Dr.ª Renata Afonso
Vogais:	Dr.ª Carla Carneiro
	Dr. Pedro Laranjeira
	Dr. José Tomé
	Enfa. Lurdes Toscano
	Pe Barros

Mais se declara que a Comissão de Ética para a Saúde do Hospital Prof. Dr. Fernando Fonseca, EPE, cumpre com as Normas da Boa Prática Clínica.

Pelo exposto, emitiu-se a 02 de Outubro de 2019, **Parecer Favorável**.

A Presidente da Comissão de Ética



Dr.ª Teresa Brandão

HOSPITAL PROFESSOR DOUTOR FERNANDO FONSECA, E.P.E.
I.C. 19 2720-276 AMADORA
TEL.: 21 434 82 00

FAX: 21 434 55 66

CAP. ESTATUTÁRIO: € 44.200.000,00
NIF: 503 035 416

HFF EPE – Mod 1501 - V3/2011



PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA

Nº de identificação de registo 65/2019

TIPO DE ESTUDO: ESTUDO CLINICO

TÍTULO DO ESTUDO:

ADENDA AO ESTUDO:

"Caracterização do microbioma da pele em Unidades de Cuidados Intensivos"

Após reunião de 13 de Novembro de 2019, apresentando-se a adenda ao estudo de acordo com as normas de submissão impostas por esta CES, deliberou-se emitir parecer favorável.

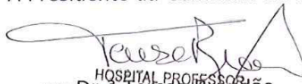
Ouvido o Relator, o processo foi votado pelos Membros da Comissão de Ética para a Saúde do Hospital Prof. Dr. Fernando Fonseca, EPE a 13 de Novembro de 2019:

Presidente	Dr.ª Teresa Brandão
Vice – presidente	Dr.ª Renata Afonso
Vogais:	Dr.ª Carla Carneiro
	Dr. Pedro Laranjeira
	Enfa. Lurdes Toscano

Mais se declara que a Comissão de Ética para a Saúde do Hospital Prof. Dr. Fernando Fonseca, EPE, cumpre com as Normas da Boa Prática Clínica.

Pelo exposto, emitiu-se a 13 de Novembro de 2019, **Parecer Favorável**.

A Presidente da Comissão de Ética


HOSPITAL PROFESSOR
DOUTOR FERNANDO FONSECA, E.P.E.
NIF: 503 035 416

9.2 Protocolos experimentais

9.2.1 Anexo 4- Meios de cultura

Meios de cultura utilizados no decorrer da investigação e mencionados nos Capítulos 2 e 3.

1. Caldo de Dulcitol (SSDB)

- Dulcitol.....20 g
- NaCl.....100 g
- Caseína.....5 g
- Digestão péptica de tecido animal5 g
- Gentamicina..... 50 mg
- Cloranfenicol50 mg

Dissolver o cloranfenicol em álcool etílico (500 mg em 10 mL)

- Misturar bem, ajustar o pH para 5,6 (5,4-5,8)
- Esterilizar através de um filtro de 0,2 µm

Distribuir 5mL em tubos de 15 mL e armazenar até 6 meses/4°C

Deixar à temperatura ambiente antes de utilizar

2. Mannitol Salt Agar Auris (MSAA)

- Manitol.....20 g
- NaCl.....100 g
- Caseína.....5 g
- Digestão péptica de tecido animal5 g
- Gentamicina..... 50 mg
- Cloranfenicol50 mg

Dissolver o cloranfenicol em álcool etílico (500mg em 10 mL)

- Solução de Vermelho de fenol
 - Vermelho de fenol.....0,5 g
 - NaOH a 0,1N.....15 mL
 - Água destilada q.b.....100 mL
- Misturar bem, ajustar o pH para 5,9
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

3. Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

- Dextrose.....40 g
- Peptona.....10 g
- Agar20 g

Aquecer a água até ebulição e dissolver o agar; acrescentar a peptona e o açúcar

Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

4. Meio de Dixon

- Extrato de malte..... 3,6 g
- Peptona..... 6,0 g
- Bilis.....20,0 g
- Tween4010,0 g
- Glicerol monostearato.....2,0 g
- Oleato de sódio.....1,0 g
- Glicerol.....10,0 g

Preparação

Dissolver o extrato de malte, a peptona, e a bilis de boi em água destilada. Adicionar o Tween 40, o glicerol monoestearato, o oleato de sódio e o glicerol, e misturar bem até que todos os componentes estejam completamente dissolvidos.

Ajustar o pH do meio para cerca de 6,0. Autocalvar a 121°C por 15 minutos.

5. Meio CHROMagar Candida®

- Pó.....47,7 g
- H₂O purificada.....1L

Ferver até dissolução completa e distribuir 25 mL/placa de Petri (90mm)

6. Caldo YPD (Yeast Peptone Dextrose)

- Dextrose..... 6,0 g
- Peptona..... 6,0 g
- Bilis.....20,0 g
- Tween4010,0 g

Preparação

Dissolver todos os componentes em água. Ajustar o volume para 1 litro. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos (1 atm). Deixar arrefecer à temperatura ambiente antes de utilizar.

Solução de Criopreservação:

- Caldo YPD (conforme descrito acima)800 µL
- Glicerol estéril (solução stock a 87%)200 µL

Preparação

Misturar 800 µL da cultura em YPD com 200 µL de glicerol estéril a 87%. Homogeneizar suavemente. Transferir para criotubos. Armazenar a -80 °C.

7. Meio RPMI 1640 com 2% de glucose

- Dextrose..... 20,0 g
- L-glutamina.....3,0 g
- MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanossulfônico)69,0 g
- Meio RPMI 1640 sintético (sem bicarbonato de sódio)20,8 g
- (HiMedia RPMI 1640 Agar com MOPS & 2% Glucose, referência M1972)
- Agar.....15,0 g

Preparar separadamente o agar:

- Dissolver 15 g de agar em cerca de 800 mL de água destilada.
- Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
- Arrefecer até cerca de 50–55 °C

Preparar o RPMI líquido:

- Dissolver os seguintes componentes em 200 mL de água destilada: 20,8 g de pó RPMI 1640, 69,06 g de MOPS, 20 g de glicose, 3 g de L-glutamina
- Ajustar o pH para 7,0 ± 0,1 com NaOH 1 M.
- Esterilizar a solução por filtração estéril (membrana de 0,22 µm).

Misturar:

- Adicionar a solução de RPMI estéril ao agar fundido (já arrefecido).
- Homogeneizar cuidadosamente em condições assépticas.

Distribuir: Verter o meio ainda líquido em placas de Petri estéreis de 150 mm, garantindo uma profundidade de 4,0 ± 0,5 mm. Deixar solidificar e conservar a 4 °C até ao uso.

9.2.2 Anexo 5- Métodos de identificação fenotípica

9.2.2.1 Caracterização macroscópica e microscópica das colónias fúngicas em SDA

- Registrar para as colónias observadas
 - Cor
 - Textura da superfície (lisa, rugosa)
 - Brilho (brilhante, bassa)
 - Consistência (cremosa, mucosa)

- Morfologia microscópica dos diferentes géneros e espécies de leveduras

Com a ajuda de uma ansa retirar uma pequena porção da cultura de cada uma das diferentes espécies de leveduras e faça uma preparação microscópica, entre lâmina e lamela, com azul de lactofenol.

Técnica:

- 1- Colocar uma gota de lactofenol sobre a lâmina;
- 2- Retirar um pequeno fragmento da cultura do fungo com ajuda do fio de platina;
- 3- Colocar o fragmento da cultura sobre a gota de lactofenol e homogeneizar;
- 4- Cobrir com lamela e observar ao microscópio nas objetivas de 10X e 40X.

Anotar as observações microscópicas:

- A forma e dimensões relativas das células (grandes, pequenas, redondas, ovais, alongadas);
- Observação de pseudomicélio ou micélio verdadeiro.

9.2.2.2 Prova da blastese (prova de filamentação)

Procedimento experimental

- 1- Pipetar 1,0 mL de soro de cavalo para tubo de ensaio;
- 2- Inocular 3 colónias provenientes de uma cultura de 24 horas;
- 3- Incubar a 37°C por um período máximo de 3 horas;
- 4- Após incubação, homogeneizar, colocar uma gota da suspensão sobre uma lâmina e cobrir com lamela;
- 5- Observar ao microscópio com a objetiva de 40x e desenhar as estruturas visualizadas.

9.2.2.3 Galerias de identificação bioquímica utilizadas

Inoculação e leitura das galerias de identificação API Candida® e API20CAUX®. Inocular e incubar as galerias segundo os esquemas ou a bula respectiva fornecida pelo fabricante. Exemplificação resumida do protocolo experimental para a galeria API Candida® (testes enzimáticos e de assimilação de açúcares).

Preparação da galeria

- Juntar fundo e tampa de uma caixa de incubação e distribuir cerca de 5 mL de água [desmineralizada, destilada, ou qualquer água sem aditivos ou substâncias químicas suscetíveis de libertarem gases (Ex: Cl₂, CO₂, ...)] nos alvéolos para criar uma atmosfera húmida.
- Inscrever a referência da estirpe na lingueta lateral da caixa.
- Retirar a galeria da embalagem.
- Colocar a galeria na caixa de incubação.
- Deitar fora a saqueta desidratante.

Preparação do inóculo

- Abrir uma ampola de API NaCl 0,85% *Medium* (2 mL)
- Utilizando uma zaragatoa, picar uma ou várias colónias idênticas bem isoladas e efetuar uma suspensão com opacidade equivalente à do padrão 3,0 de McFarland:

Inoculação da galeria

- Distribuir a suspensão das leveduras anterior unicamente nos tubos evitando a formação de bolhas (para isso, inclinar a caixa de incubação para a frente e colocar a pipeta ao lado da cúpula);
- Cobrir os cinco primeiros testes (GLU a RAF) e o último teste (URE) com óleo de parafina (testes sublinhados) logo a seguir à inoculação da galeria;

NOTA: A qualidade do enchimento é muito importante: os tubos que estejam insuficientes ou demasiadamente cheios podem causar resultados falsamente positivos ou negativos.

- Incubar 18-24 horas a 37°C em atmosfera aeróbia.

9.2.2.4 Prova da Urease

A prova da urease pode ser efetuada em meio de ureia de Christensen's. Após a inoculação do meio líquido com as leveduras, os tubos são incubados a 37°C, durante 4h ou 24h dependendo do fungo suspeito. O teste é considerado positivo quando o meio apresenta cor rosa. Se a cor inicial (amarela) se mantiver, o resultado é considerado negativo.

9.2.3 Anexo 6- Protocolos de extração e isolamento de DNA fúngico

9.2.3.1 Método enzimático e térmico adaptado do descrito por Kordalewska e colaboradores e Sexton e colaboradores (292, 394).

Materiais:

- Isolados fúngicos (colónias)
- Tampão de extração:

60 mM Bicarbonato de sódio (NaHCO₃)

250 mM Cloreto de potássio (KCl)

50 mM Tris (pH 9,5)

- Tampão anti inibição:

Albumina de soro bovino (BSA) 2%

- Tubos de microcentrifuga (1,5 mL)
- Pipetas e ponteiras
- Banho-maria ou bloco de aquecimento (capaz de atingir 95°C)
- Vortex
- NZY Tissue gDNA Isolation kit®

Procedimento Experimental (Fig. 9.1):

- Preparação da suspensão fúngica

Colocar uma colônia a partir do meio de Sabouraud (24h/30°C) num tubo de microcentrifuga contendo 100 μ L de tampão de extração.

- Incubação

Incubar o tubo a 95°C por 10 minutos para lise celular e libertação do DNA.

- Adição de Tampão Anti Inibição

Após a incubação, adicionar 100 μ L de tampão anti inibição (BSA 2%) ao tubo e vortex o tubo brevemente para garantir a mistura completa dos reagentes.

- Preparação prévia da amostra: tratamento com proteinase K (utilizado apenas para extração direta da amostra biológica)

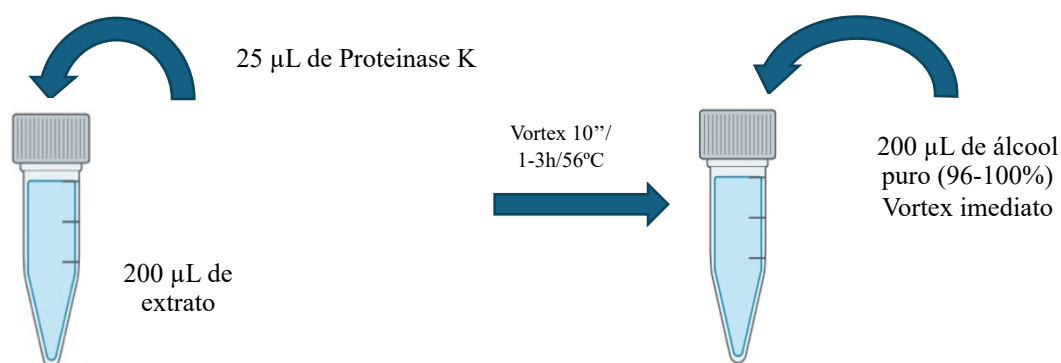


Figura 9.1 Protocolo experimental para a extração enzimática com proteinase K. Durante a incubação a cada 15min efetuar uma breve agitação. Nota: pode utilizar-se metade do volume de extrato e de álcool.

- Transferir a mistura para uma coluna NZYSpin colocada num tubo coletor de 2 mL;
- Centrifugar 1min/>11,000 g;
- Descartar o sobrenadante e colocar a coluna num tubo coletor novo;
- Adicionar 600 μ L de tampão NW1 à coluna;
- Centrifugar 1min/>11,000 g. Descartar o sobrenadante;
- Adicionar 600 μ L de tampão NW2 à coluna;
- Centrifugar 1min/>11,000 g. Descartar o sobrenadante;
- Secar a membrana de sílica;
- Centrifugar 2 min/>11,000 g. descartar o sobrenadante;
- Eluir o DNA
- Colocar a coluna num tubo de microcentrifuga limpo e adicionar 100 μ L de tampão NE à coluna (aquecer previamente o tampão na estufa 10 min)
- Incubar 1min à temperatura ambiente
- Centrifugar 2 min/>11,000 g para eluir o DNA
- Recolher o eluído (volume de eluição: 50 μ L)
- Armazenar a 4°C ou -20°C.

Nota: Os tampões de eluição, proteinase K, colunas e tubos coletores estão incluídos no NZY Tissue gDNA Isolation kit®.

9.2.3.2 NZYMicrobial gDNA Isolation Kit®

O DNA total foi extraído dos isolados utilizando um NZYMicrobial gDNA Isolation Kit® (Nzytech, Lisboa, Portugal), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, 1 mL de cultura com 24h de crescimento foram centrifugadas e ressuspensas em tampão de eluição. A lise foi realizada em tubo com esferas e Proteinase K, seguida de agitação mecânica. Após centrifugação, o DNA foi ligado a uma coluna de sílica com tampão NML e lavado com tampões NMW1 e NMW2. O DNA foi eluído com 100 µL de tampão NME pré-aquecido (70 °C). O DNA genómico foi armazenado a -20 °C.

9.2.3.3 Extração com o tampão Auctus Z- Buffer®.

O procedimento experimental consistia em hidratar o tampão com 1mL de água destilada; adicionar 100 µL do Z-buffer à amostra (1 UFC em 450 µL de tampão PBS) e agitar em sistema rotativo durante 30 minutos.

9.2.3.4 NZY Soil gDNA Isolation®

O DNA das amostras biológicas foi extraído com o reagente NZY Soil gDNA Isolation® (NZYTech) de acordo com as instruções do fabricante. De uma forma resumida, as amostras foram misturadas com um tampão de lise que contém detergentes e outros componentes para quebrar as paredes e membranas celulares, libertando o DNA para a solução. A ação do tampão foi coadjuvada pela rutura mecânica (batimento de esferas), para garantir uma lise completa. Após a lise celular, os contaminantes, tais como proteínas, polissacáridos e outros materiais orgânicos, foram removidos do lisado contendo DNA, através de uma combinação de passos de centrifugação e/ou filtração. O DNA purificado ligou-se seletivamente ao suporte sólido (NZYSpin Soil Column), permitindo a eliminação dos contaminantes. Finalmente, o DNA purificado foi eluído do suporte sólido para um pequeno volume de tampão de eluição, resultando numa solução concentrada de DNA genómico.

9.2.3.5 Fungal Lysis Solution®

O tampão Fungal Lysis Solution® (MOL9090, DiaSorin Molecular, Europa) foi utilizado de acordo com as predefinições do fabricante (Fig. 9.2).

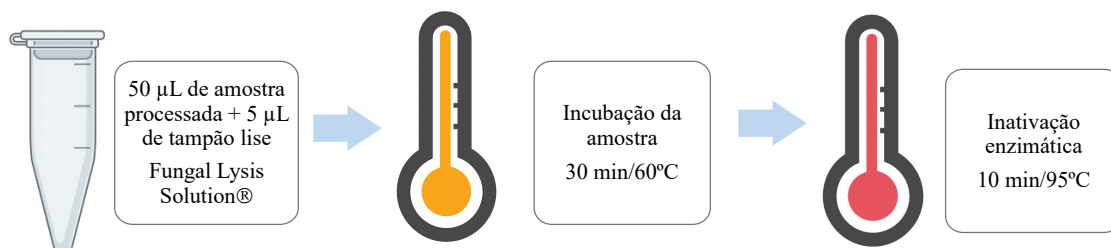


Figura 9.2. Protocolo de extração do DNA genômico com Fungal Lysis Solution®.

9.2.4 Anexo 7- Pesquisa de DNA das espécies crípticas dos complexos de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* por PCR multiplex

9.2.4.1 Sequências iniciadoras

Os *primers* utilizados neste estudo foram previamente descritos por Arastehfar e colaboradores (Tabela 9.1) (265).

Tabela 9.1. *Primers* utilizadas no protocolo de PCR multiplex.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>	<i>Anotações</i>
PCAF	GCTACCACTTCAGAATCATCATC	<i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i> e <i>C. africana</i>
PCAR	AGATCAAGAATGCAGCAATACCAA	
PCGF	TCACTTTCAACTGCTTTTCGC	
GR	TGCGAGTCATGGGCGGAA	
NR	ACCCAGAGGCATAAATAGC	
BR	GCAACTGGACGAAAGTGC	<i>C. glabrata</i> , <i>C. nivariensis</i> e <i>C. bracarensis</i>
PF	GCGGAAGGATCATTACAGAATG	
PR	CTGGCAGGCCCATATAG	
OMF	GAGAAAGCACGCCTCTTTGC	
OMR	TCAGCATTTTGGGCTCTTGC	

9.2.4.2 Amplificação

A reação de PCR foi realizada num volume final de 50 µL seguindo as condições indicadas: 12 µL MiliQ água (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos), 25 µL 2X Master Mix® (NZYTech, Lisboa, Portugal), *primers* do complexo *C.*

albicans com a concentração de 10 p-mole cada um e 5 p-mole para o resto dos *primers* (complexos *C. glabrata* e *C. parapsilosis*), e 1 µL de DNA da amostra (Tabela 9.2).

Tabela 9.2. Planificação da placa de reação do ensaio de PCR multiplex.

	Concentração final	Volume (por reação) (µL)
Primer PCAF	10 p-mole	1,0
Primer PCAR	10 p-mole	1,0
PCGF	5 p-mole	1,0
GR	5 p-mole	1,0
NR	5 p-mole	1,0
BR	5 p-mole	1,0
PF	5 p-mole	1,0
PR	5 p-mole	1,0
OMF	5 p-mole	1,0
OMR	5 p-mole	1,0
DNA fúngico	10 ng	1,0
Master mix	2x	25
ABDE*	qb para 50 µL	12

*ABDE- Água Bidestilada Estéril

A amplificação foi realizada num termociclador (T100 Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Califórnia, EUA) com as seguintes condições de programação: desnaturação do DNA a 94°C durante 5 min, 35 ciclos de 94°C durante 30s, 60°C durante 30s e extensão a 72°C durante 30s; e uma extensão final a 72°C durante 8 min.

9.2.4.3 Detecção do produto de PCR- eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR amplificados foram separados por eletroforese num gel de agarose [2% (p/v) em Tris-borato-EDTA [TBE] 0,5X corado com green safe® (Nzytech, Lisboa, Portugal)] e posteriormente analisados juntamente com um marcador de peso molecular de 50-1500 bp NZYDNA Ladder VI® (NzyTech, Lisboa, Portugal). O fracionamento eletroforético foi realizado a 90V durante 70 min.

Detecção por eletroforese em gel de agarose a 2%

- Tapar as extremidades laterais da cama do gel com fita adesiva e colocar o pente de modo que os dentes não toquem no fundo da cama.
- Preparar quantidade suficiente de tampão de eletroforese (TBE 0,5X ou TAE 1X) para encher a tina de eletroforese e fazer o gel.
- Preparar a solução de agarose em tampão de eletroforese (2% gel de agarose LE/1,8g para 90 mL).

- Dissolver no micro-ondas (30s) até obter uma solução cristalina.
- Arrefecer o Erlenmeyer em água corrente. Adicionar o *greensafe* (4,5µL) e misturar cuidadosamente.
- Verter cuidadosamente a agarose na cama do gel, evitando a formação de bolhas (usar uma agulha).
- Deixe solidificar completamente o gel e retire com cuidado o pente e a fita adesiva
- Coloque a cama na tina de eletroforese e tape completamente o gel com TBE 0,5X.
- Preparar as amostras para aplicar no gel.
- 25 µL do produto de PCR
- 5 µL de marcador de PM
- Com cuidado aplicar a mistura no poço do gel usando uma micropipeta.
- Fechar a tampa da tina e aplicar um campo elétrico 90V/60min que fará o DNA migrar do polo negativo para o positivo.

9.2.4.4 Resultados

O tamanho de amplificação esperado é de 1090 pb para *C. albicans*, 901 pb para *C. africana*, 721 pb para *C. dubliniensis*, 586 pb para *C. nivariensis*, 476 pb para *C. orthopsilosis*, 386 pb para *C. glabrata*, 308 pb para *C. metapsilosis*, 214 pb para *C. bracarensis* e 112 pb para *C. parapsilosis* de acordo com o previamente descrito por Arastehfar e colaboradores (Tabela 9.3). Após a corrida eletroforética, as bandas foram visualizadas num transiluminador de UV. *C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 15126 e *C. parapsilosis* ATCC 12345 foram utilizados como controlos positivos.

Tabela 9.3. Análise dos perfis eletroforéticos para a identificação das diferentes espécies crípticas dos principais complexos de *Candida* spp.

Espécie	Amplicação (pbs)
<i>C. albicans</i>	1090 (1200)
<i>C. africana</i>	901 (1100)
<i>C. dubliniensis</i>	721 (950)
<i>C. nivariensis</i>	586 (700)
<i>C. orthopsilosis</i>	476 (576)
<i>C. glabrata</i>	386 (486)
<i>C. metapsilosis</i>	308 (400)
<i>C. bracarensis</i>	214 (300)
<i>C. parapsilosis</i>	112 (250)

9.2.5 Anexo 8- Pesquisa de DNA de *Candida auris*

9.2.5.1 Identificação de *C. auris* por técnica de PCR convencional (Fig. 9.3)

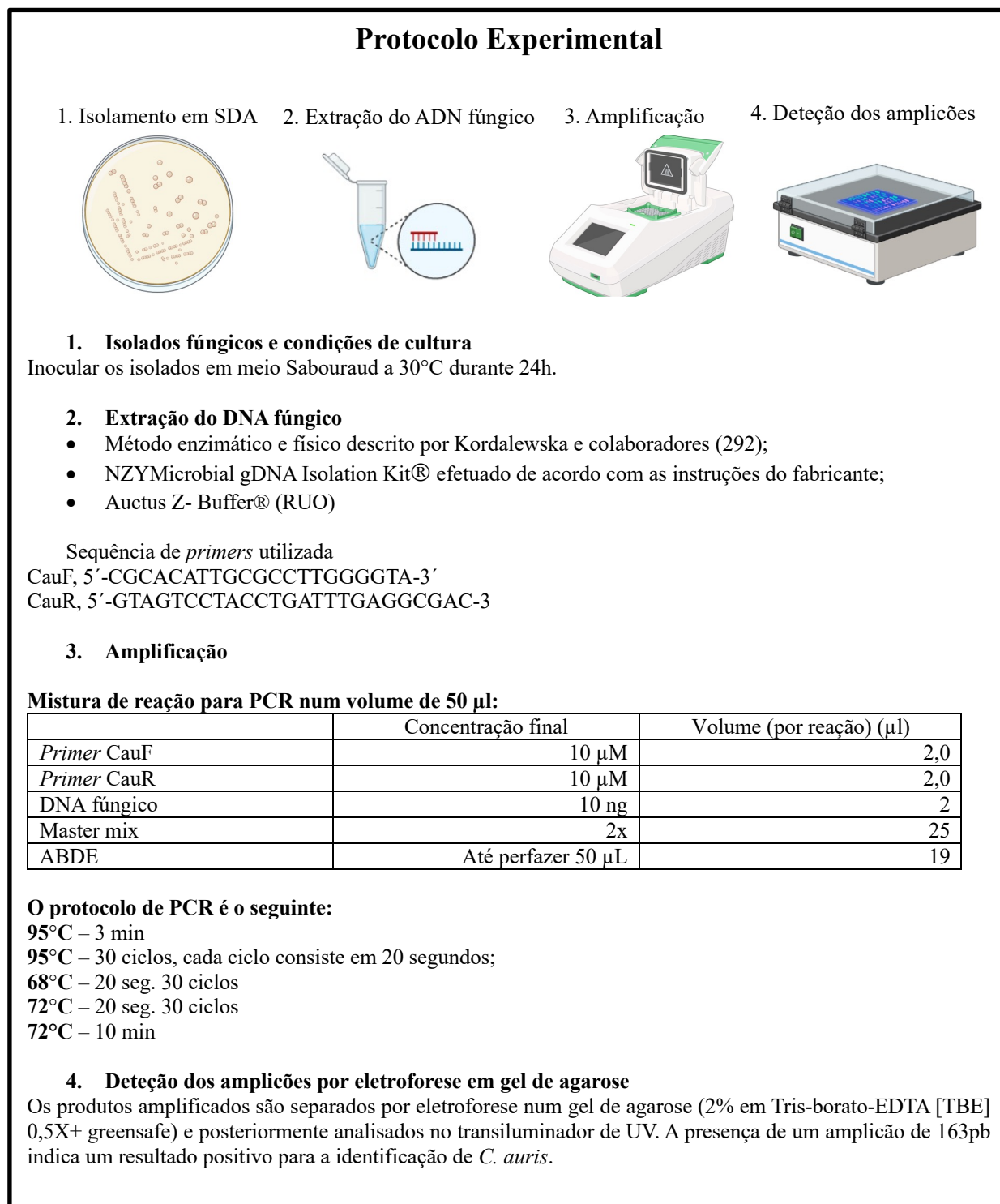


Figura 9.3. Protocolo experimental de PCR convencional para identificação de *C. auris*.

9.2.5.2 Identificação de *C. auris* por técnica de PCR em tempo real

A técnica de PCR em tempo real (qPCR) utilizada para identificação de *C. auris* tem por base a técnica descrita por Leach e colaboradores (293).

9.2.5.2.1 Preparação do Controlo interno (Fig. 9.4)

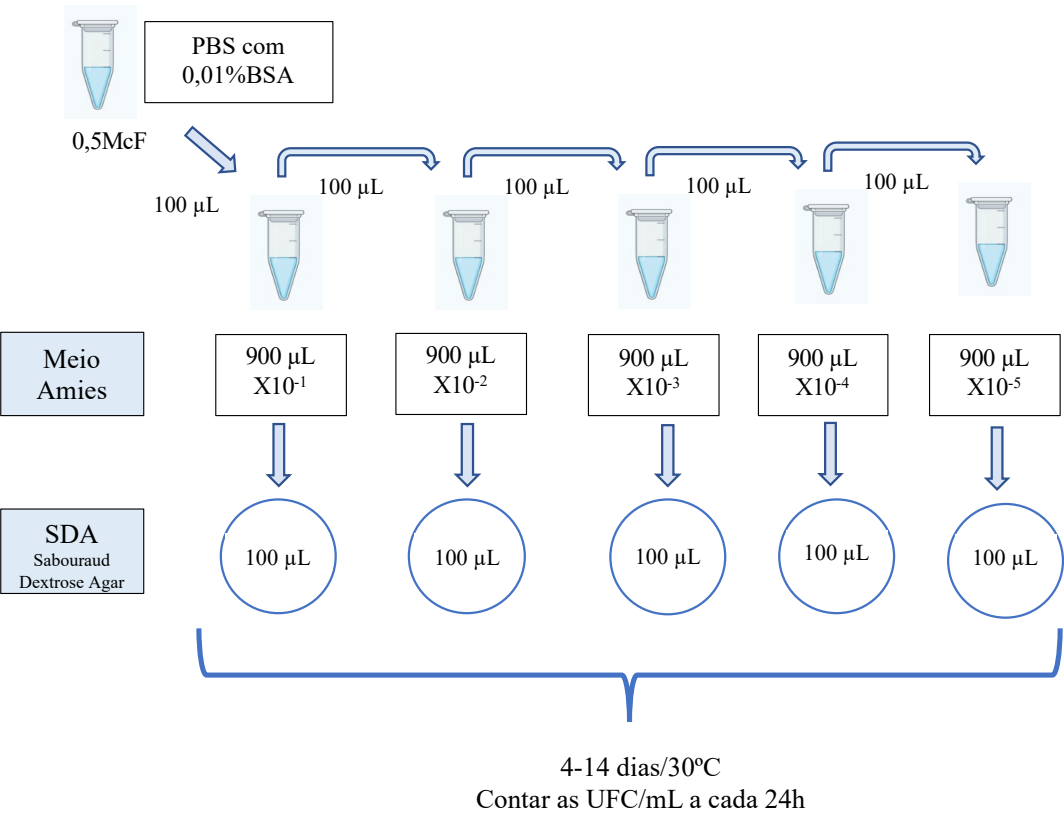


Figura 9.4. Diluições seriadas de células de *C. auris* para preparação dos controlos positivos do ensaio de qPCR.

9.2.5.2.2 Reagentes (*primers* e sonda) (Tabela 9.4)

Tabela 9.4. *Primers* e sondas utilizadas no ensaio de qPCR.

<i>Primer</i> /sonda	Abreviação	Sequência Nucleotídica (5'-3')
<i>Forward primer</i> V2424F	CAURF	5'-CAG ACG TGA ATC ATC GAA TCT-3'
<i>Reverse primer</i> V2426	CAURR	5'-TTT CGT GCA AGC TGT AAT TT-3'
Sonda marcada com fluoresceína V2425P	CAURP	5'-/56-carboxyfluorescein (FAM)/AAT CTT CGC /ZEN /GGT GGC GTT GCA TTC A/3IABkFQ/-3'

9.2.5.2.3 Preparação da mistura de reação

- Preparar um recipiente com gelo para a colocação dos reagentes. Efetuar a mistura de reação segundo a Tabela 9.5 para o número de amostras a estudar, controlo positivo (CP) e controlo negativo (CN);
- Colocação do DNA (2,0 µL) das amostras e dos controlos;
- Colocação dos tubos no rotor do termociclador Qiagen Rotor-Gene Q®, segundo a ordem numérica. Preencher todos os espaços do rotor;
- Condições de amplificação: ciclo inicial a 95°C durante 5 min, seguidos de 45 ciclos de 95°C durante 10 s e 60°C durante 15 s;
- Resultados: a reação de amplificação é visualizada em tempo real no computador acoplado ao termociclador Qiagen Rotor-Gene Q® e os resultados visualizados num gráfico, correspondendo ao sinal da sonda (FAM).
 - A partir dos controlos negativos obtém-se o limite (*threshold*) de um resultado negativo e do controlo positivo uma curva de amplificação. Uma amostra clínica é considerada positiva para a pesquisa de *C. auris* se for observada uma curva de amplificação superior ao limite (*threshold*) no canal (FAM) e CT < 37. Uma amostra é considerada negativa para pesquisa de *C. auris* quando não se observar sinal de amplificação no canal FAM.

Tabela 9.5 Planificação da placa de reação do ensaio de qPCR.

	Concentração	Volume (µL)
Multiplex qPCR ToughMix® (vortex 3x/5'' para homogeneizar)	5x	8,0
Primer V2424F (CAURF)	10 µM	2,0
Primer V2426 (CAURR)	10 µM	2,0
Sonda V2425P (CAURP)	2,5 µM	1,6
DNA <i>C. auris</i> / C+/C-		2
DNA amostras		2
H ₂ O ultrapura (ABDE)		4,4
Volume Total		20

9.2.6 Anexo 9- Protocolo experimental para extração, isolamento e purificação do DNA para sequenciação (Fig. 9.5)

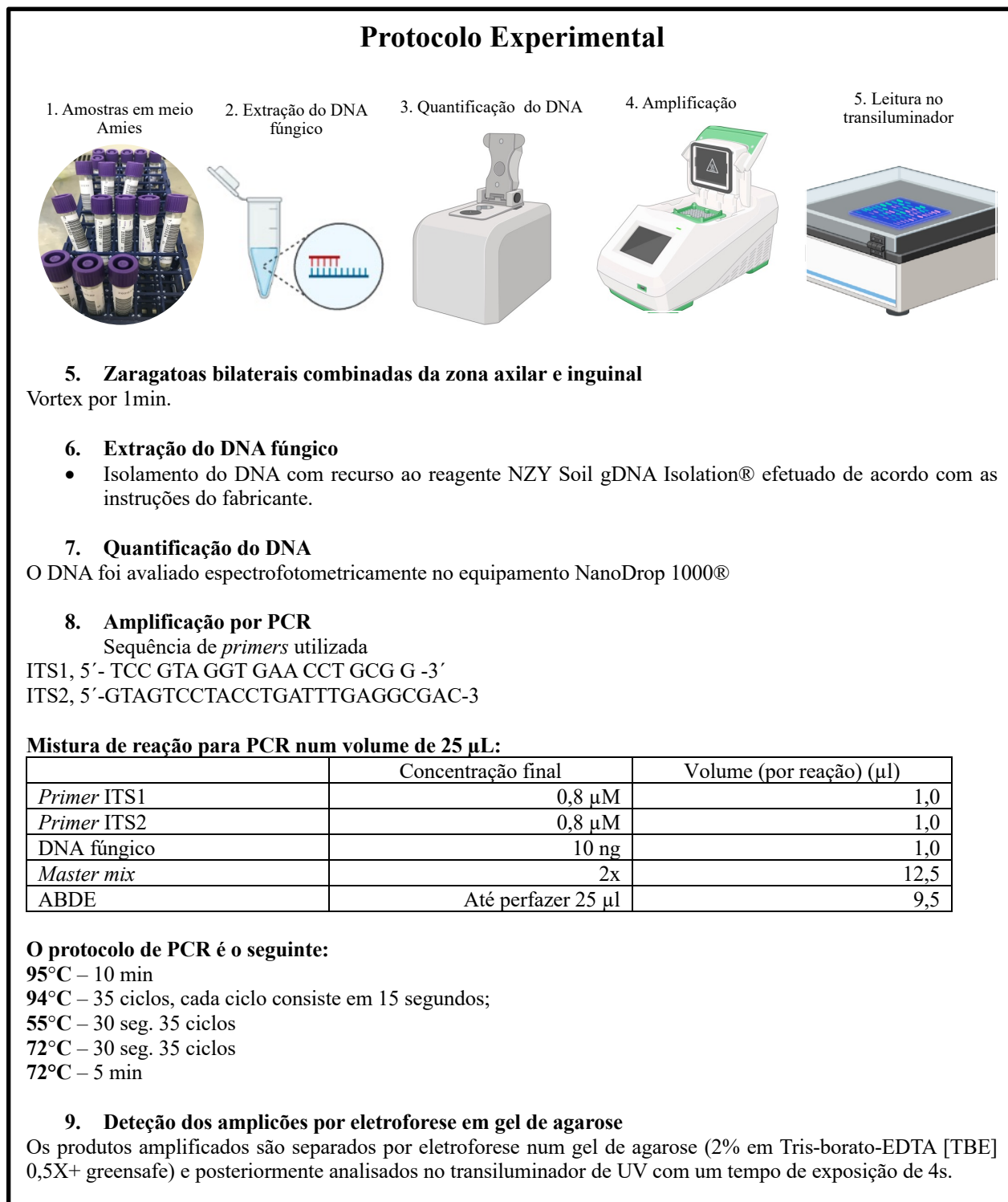


Figura 9.5. Protocolo experimental do PCR panfúngico.

9.2.7 Anexo 10- Protocolo experimental de sequenciação da região ITS2 e análise bioinformática (Procedimento efetuado pela empresa Novogene®)

Geração de amplicões

A região *ITS* de regiões distintas (ITS1/ITS2) foram amplificadas utilizando *primers* específicos. Todas as reações de PCR foram realizadas com 15 µL de Phusion® High - Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs); 0,2 µM de *primers forward* e *reverse*, e cerca de 10 ng de DNA. O protocolo de amplificação consistiu na desnaturação inicial a 98°C durante 1 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 98°C durante 10 s, reaquecimento a 50°C durante 30 s e alongamento a 72°C durante 30 s e 72°C durante 5 min.

Quantificação e qualificação dos produtos PCR

Misturaram-se volumes iguais de tampão concentrados 1X (contendo SYBR Green) com os produtos de PCR. Em seguida, realizou-se a eletroforese em gel de agarose a 2% para a detecção. Os produtos PCR foram misturados em raios de equidensidade. Em seguida, os produtos de PCR da mistura foram purificados com o Universal DNA Purification Kit (TianGen, China, Catálogo n.º: DP214).

Preparação da biblioteca e sequenciação

As bibliotecas de sequenciação foram geradas utilizando o NEB Next® Ultra™ II FS DNA PCR- free Library Prep Kit (New England Biolabs, EUA, Catálogo n.º: E7430L), seguindo as recomendações do fabricante, tendo sido adicionados índices. A biblioteca foi verificada com Qubit e PCR em tempo real para quantificação e bio analisador para detecção da distribuição do tamanho. As bibliotecas quantificadas foram agrupadas e sequenciadas em plataformas Illumina, de acordo com a concentração efetiva da biblioteca e a quantidade de dados necessária.

Análise bioinformática

A análise bioinformática teve início com a montagem e verificação da qualidade das leituras de extremidades emparelhadas.

Divisão de dados

As leituras de extremidades emparelhadas foram atribuídas a amostras com base nos seus códigos de barras únicos e truncadas cortando os códigos de barras e as sequências de *primers*. Todo o processo foi efetuado através de Python (V3.6.13) e os adaptadores foram removidos através do programa cutadapt (V3.3).

Montagem de sequências

As leituras de extremidade emparelhada foram fundidas usando FLASH (V1.2.11, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>), uma ferramenta de análise muito rápida e precisa, que foi projetada para fundir leituras de extremidade emparelhada quando pelo menos algumas das leituras se sobrepõem à leitura gerada a partir da extremidade oposta do mesmo fragmento de DNA, e as sequências de correção foram denominadas de etiquetas brutas (*Raw Tags*).

Filtração de dados

A filtração da qualidade das etiquetas em bruto foi efetuada utilizando o *software* fastp (Versão 0.23.1) para obter *Clean Tags* de alta qualidade.

Remoção de quimeras

As etiquetas foram comparadas com a base de dados de referência UNITE (ITS, <https://unite.ut.ee/>) utilizando o algoritmo UCHIME para detetar sequências de quimeras (http://www.drive5.com/usearch/manual/uchime_algo.html). As etiquetas efetivas foram obtidas removendo as sequências de quimeras com o pacote vsearch (V2.16.0). Para cada sequência representativa, a base de dados UNITE (<https://unite.ut.ee/>) foi utilizada com base no algoritmo *blast* para anotar informações taxonómicas.

Construção de relações filogenéticas

Para estudar a relação filogenética de diferentes OTU, e a diferença das espécies dominantes em diferentes amostras (grupos), foi efetuado um alinhamento múltiplo de sequências utilizando o *software* MUSCLE (Versão 3.8.31) (<http://www.drive5.com/muscle/>).

Normalização de dados

A informação sobre a abundância de OTU foi normalizada utilizando um padrão de número de sequência correspondente à amostra com menos sequências. As análises subsequentes da diversidade alfa e da diversidade beta foram efetuadas com base nestes dados normalizados.

Diversidade alfa

A diversidade alfa é aplicada na análise da complexidade da diversidade de espécies para uma amostra através dos índices: nº de espécies observadas, Chao1, Shannon e Simpson. Todos estes índices foram calculados com o QIIME (Versão 1.9.1) e apresentados com o *software* R (Versão 4.0.3).

Diversidade beta

A análise da diversidade beta foi utilizada para avaliar as diferenças entre as amostras em termos de complexidade das espécies. A diversidade beta com base na distância unifrac ponderada e não ponderada foi calculada pelo *software* QIIME (Versão 1.9.1). A análise de coordenadas principais (PCoA) foi efetuada para obter as coordenadas principais e visualizar dados complexos e multidimensionais. Uma matriz de distância de unifrac ponderada ou não ponderada entre amostras obtida anteriormente foi transformada num novo conjunto de eixos ortogonais, através do qual o factor de variação máximo é demonstrado pela primeira coordenada principal, e o segundo factor máximo pela segunda coordenada principal, e assim sucessivamente. A análise PCoA foi apresentada pelo pacote *ade4* e pelo pacote *ggplot2* no *software* R (versão 4.0.3). Foi construída uma árvore de *clusters* com base no método *Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA), que se baseia na matriz de distância unifrac ponderada. O diagrama UPGMA foi desenhado através da função *upgma.tre* do QIIME.

Para revelar a diferenciação da estrutura da comunidade foi efetuada uma série de análises estatísticas que incluem ANOSIM e T-test. Todos os testes estatísticos foram efetuados com o pacote *vegan* e o pacote *ggplot2* versão 3.4.0 do R.

9.2.8 Anexo 11- Determinação dos perfis de susceptibilidade pelo método epsilométrico (Fig. 9.6)

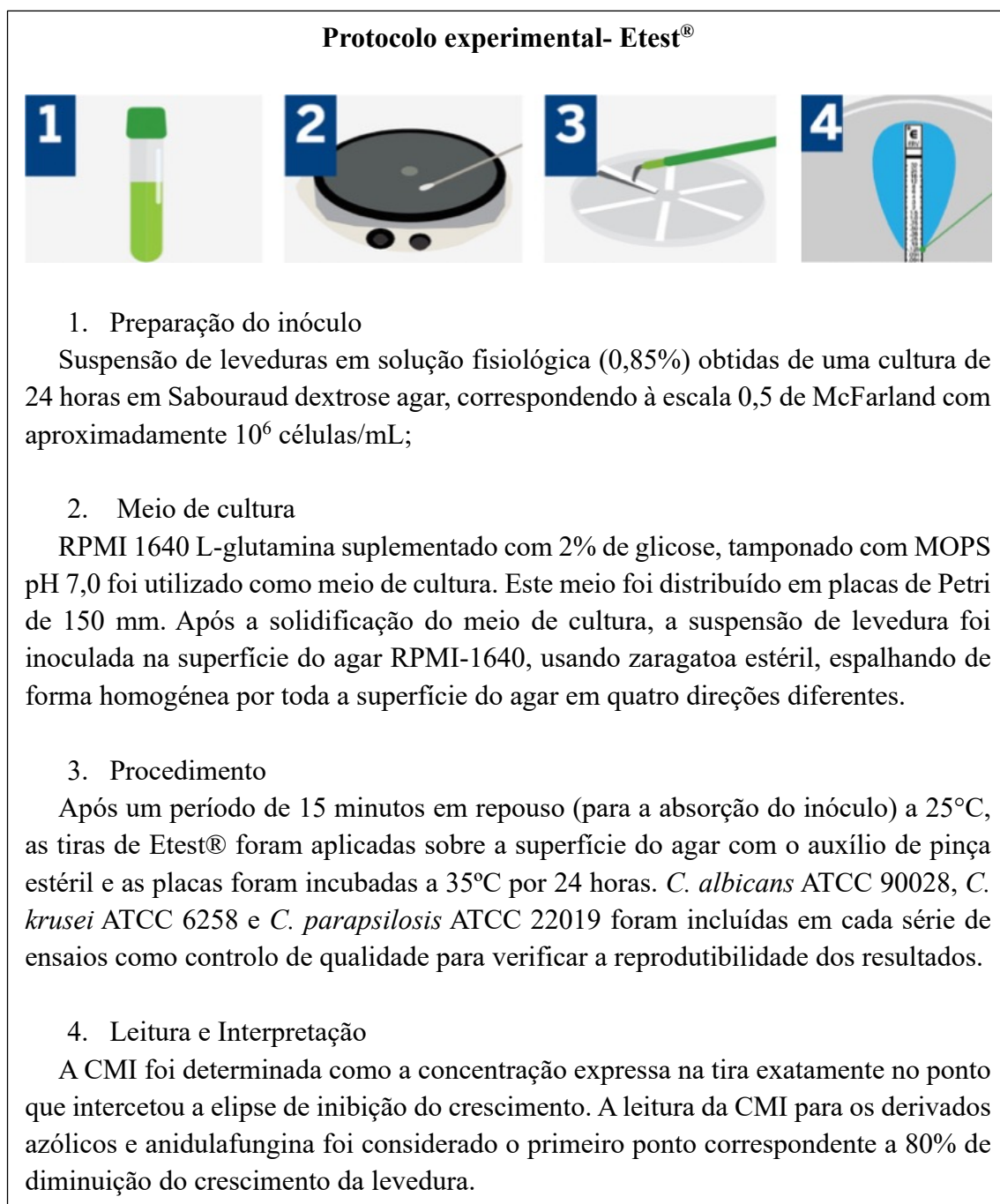


Figura 9.6. Protocolo experimental do E-test®.

