

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ANDRE FRANCISCO DOS REIS

**ANÁLISE DIFERENCIAL DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES E
SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE *Candida albicans* E ESPÉCIES NÃO- *albicans*
DE *Candida* ISOLADAS DE PACIENTES CRITICAMENTE ENFERMOS SUJEITOS
A EVENTOS ADVERSOS RELACIONADOS À ASSISTÊNCIA.**

ALFENAS/MG

2022

ANDRE FRANCISCO DOS REIS

**ANÁLISE DIFERENCIAL DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES E
SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE *Candida albicans* E ESPÉCIES NÃO-*albicans*
DE *Candida* ISOLADAS DE PACIENTES CRITICAMENTE ENFERMOS SUJEITOS
A EVENTOS ADVERSOS RELACIONADOS À ASSISTÊNCIA.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Profª Drª Amanda Latercia Tranches Dias

ALFENAS/MG

2022

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Reis, André Francisco dos.

Análise diferencial da capacidade de formação de biofilmes e sensibilidade antifúngica de *Candida albicans* e espécies não-*albicans* de *Candida* isoladas de pacientes criticamente enfermos sujeitos a eventos adversos relacionados à assistência / André Francisco dos Reis. - Alfenas, MG, 2022.

75 f. : il. –

Orientador(a): Amanda Latercia Tranches Dias.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. *Candida albicans*. 2. Cuidados Críticos. 3. Hospitais. 4. Antifúngicos. 5. Biofilmes. I. Latercia Tranches Dias, Amanda , orient. II. Título.

ANDRÉ FRANCISCO DOS REIS

ANÁLISE DIFERENCIAL DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES E SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE *Candida albicans* E *Candida ssp. NÃO- albicans* ISOLADAS DE PACIENTES CRITICAMENTE ENFERMOS, SUJEITOS A EVENTOS ADVERSOS RELACIONADOS À ASSISTÊNCIA.

A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno Hospedeiro

Aprovada em: 23 de setembro de 2022

Profª Drª Amanda Latercia Tranches Dias
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG

Profª Drª Rosymar Coutinho de Lucas
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG

Profª Drª Josidel Conceição Oliver
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG



Documento assinado eletronicamente por Amanda Latércia Tranches Dias, Professor do Magistério Superior, em 23/09/2022, às 16:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº8.539, de8deoutubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Rosymar Coutinho de Lucas, Professor do Magistério Superior, em 23/09/2022, às 16:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº8.539, de8deoutubro de2015.0](#)



Documento assinado eletronicamente por Josidel Conceição Oliver, Usuário Externo, em 23/09/2022, às 16:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº8.539, de8deoutubro de2015](#).



[A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 0823035 e o código CRC F10B74CD.

Ao meu estimado e saudoso pai -Laécio
Francisco dos Reis, pessoa que sem dúvida
alguma moldou meu caráter.

AGRADECIMENTOS

À valiosa e imprescindível ajuda de minha orientadora, sem a qual dificilmente iria conseguir êxito na elaboração deste trabalho.

Toda gratidão também a nossa enfermeira Damiana do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar da Santa Casa de Poços de Caldas pela precisão no repasse das informações clínicas dos pacientes integrantes deste trabalho.

Aos colegas Alessandro e Dra.Tânia, ambos do laboratório de Apoio do Hospital da Unimed Poços de Caldas, por viabilizarem o material coletado para realização da identificação por MALDI-TOF.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES). O presente trabalho foi realizado com apoio da CAPES – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Objetivo. Este estudo objetiva a análise diferencial da capacidade de formação de biofilmes e da sensibilidade antifúngica de células planctônicas e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida* spp. não-*albicans* isoladas de pacientes criticamente enfermos, sujeitos a eventos adversos relacionados à assistência. **Metodologia.** Foram avaliadas amostras de *Candida* spp. isoladas de secreção traqueal, urina, corrente sanguínea e outros sítios de pacientes, maiores de 18 anos, dos setores de Terapia Intensiva e Emergências da Irmandade do Hospital da Santa Casa de Poços de Caldas, sujeitos a incidentes que possam estar relacionados ao estabelecimento de infecção fúngica. Os isolados foram identificados por espectrometria de massa MALDI-TOF e avaliados quanto à sensibilidade das células planctônicas e dos biofilmes aos antifúngicos: anfotericina B, fluconazol e itraconazol. Os prontuários destes pacientes foram examinados a partir da data da 1ª internação até o momento de desfecho clínico, com alta ou óbito do paciente. A identidade dos pacientes e as informações contidas nos prontuários foram preservadas conforme Resolução CNS nº 466/2012. Os critérios de rastreamento adotados para a análise dos prontuários fizeram referência à assistência à saúde, à terapia intensiva e à prescrição de medicamentos. **Resultados:** Foram analisados os prontuários e as amostras de 43 pacientes. O tempo de internação variou de 1 a 127 dias e todos os pacientes foram submetidos, durante o período de sua internação, a um ou mais eventos adversos relacionados à assistência, tais como utilização de ventilação mecânica, cateter venoso central, cateter venoso periférico, sonda vesical de demora, utilização de substâncias vasoativas, dentre outros. Os 43 pacientes apresentaram positividade para cultura fúngica, sendo este um dos principais critérios para a seleção do paciente integrante desta pesquisa. Ressalta-se que do total de 43 amostras, 23 foram fenotipicamente identificadas como pertencentes à espécie *C. albicans*, e 20 como *Candida* ssp. não-*albicans*. Deste total, 33 amostras puderam ser identificadas por MALDI-TOF (51,5% *C. albicans* e 48,5% *Candida* spp. não-*albicans*) e apresentaram a capacidade de formação de biofilmes, sendo que 30% dos isolados apresentaram biofilmes com elevado potencial metabólico. Quanto à sensibilidade antifúngica, observou-se uma relação direta com a sensibilidade à Anfotericina B e situações de baixa sensibilidade aos fármacos Itraconazol e

Fluconazol, inclusive com situações de resistência. **Conclusão:** A relevância desta pesquisa assenta-se solidamente na necessidade cada vez maior de centros de saúde, tais como os hospitais, que lidam com pacientes criticamente enfermos, conhecerem obrigatoriamente sua comunidade fúngica e seus perfis de sensibilidade aos antifúngicos; bem como o percentual de formação de biofilmes que podem influenciar negativamente na capacidade de resolução dos processos infecciosos, na ação dos antifúngicos então utilizados, e sua correlação com o eventual e inevitável evento adverso relacionado à assistência.

Palavras-chave (*DeCS/ Mesh terms*): atenção à saúde; hospitais; cuidados críticos; *Candida albicans*; infecções; biofilmes; antifúngicos.

ABSTRACT

Objective. This study aims the differential analysis of biofilm formation capability and antifungal susceptibility of planktonic cells and *Candida albicans* biofilms and non-*albicans Candida* spp. isolated from critically ill patients subject to care-related adverse events. **Methodology.** Samples of *Candida* spp. isolated from tracheal secretions, urine, bloodstream, and other sites from patients, over 18 years of age, from the Intensive Care and Emergency sectors of the Irmandade do Hospital Santa Casa de Poços de Caldas, who are subjected to incidents that may be related to the establishment of fungal infection. The isolates were identified by MALDI-TOF mass spectrometry and evaluated for the susceptibility of planktonic cells and biofilms to the antifungal agent's amphotericin B, fluconazole and itraconazole. The medical records of these patients were examined from the date of the 1st hospitalization until the moment of clinical outcome, with discharge or death of the patient. The identity of the patients and the information contained in the medical records were preserved in accordance with CNS Resolution No. 466/2012. The screening criteria adopted for the analysis of medical records made reference to health care, intensive care and medication prescription. **Results.** The medical records and samples from 43 patients were analyzed. The length of hospital stay ranged from 1 to 127 days and all patients underwent, during the period of their hospitalization, one or more adverse events related to care, such as the use of mechanical ventilation, central venous catheter peripheral venous catheter (PVC), indwelling urinary catheter (SVD), use of vasoactive substances, among others. The 43 patients were positive for fungal culture, which is one of the main criteria for patient selection in this research. From the 43 samples, 23 were identified phenotypically as belonging to the species *C. albicans* and 20 as *Candida* ssp. non-*albicans* species from the genus. From this total, 33 could be identified by MALDI-TOF (51.5% *C. albicans* and 48.5% non-*albicans Candida* spp) and showed the ability to form biofilms, with 30% of the isolates showing biofilms with high metabolic potential. Related to antifungal susceptibility, a direct relationship was observed with susceptibility to Amphotericin B and situations of low susceptibility to Itraconazole and Fluconazole drugs, including situations of resistance. **Conclusion.** The relevance of this research is solidly based on the increasing need for health centers, such as hospitals, which deal with critically ill patients, knowing their fungal community and their antifungal susceptibility

profiles; as well as the percentage of biofilm formation that can negatively influence the ability to resolve infectious processes, the action of the antifungal agents then used and their correlation with the eventual and inevitable adverse event related to care.

Keywords: health care; hospitals; critical care; *Candida albicans*; infections; biofilms; antifungals.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CA	Candida albicans
CCIH	Comissão de controle de infecção hospitalar
CIM	Concentração inibitória mínima
CISP-OMS	Classificação Internacional de Segurança do Paciente da Organização Mundial da Saúde
CNA	Espécie não- <i>albicans</i> de <i>Candida spp</i>
CVC	Cateter Venoso Central
CVP	Cateter venoso periférico
DVA	Droga vasoativa
EA	Eventos adversos
EO	Enfermaria de Oncologia
HMD	Hemodiálise
HMPS	Havard Medical Practice Study
ICsS	Infecções de corrente sanguínea
IH	Infecção hospitalar
IHSCPC	Irmandade do Hospital da Santa Casa de Poços de Caldas
ILAS	Instituto Latino-Americano de Sepses
INF	Incidente do tipo infecção associada a assistência
IRA	Infecções relacionadas a assistência
ITUs	Infecção do Trato Urinário
NE	Nutrição Enteral
NPT	Nutrição Parenteral Total
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAI	Pressão Arterial Invasiva
PAM	Pressão arterial média
PCR	Parada cárdio respiratória
PM	Prescrição Médica
SAPS II	Simplified acute physiology score II
SE	Setor de Emergência
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
SUS	Sistema Único de Saúde

SVD	Sonda Vesical de demora
TOT	Tubo oro traqueal
UNIFAL-MG	Universidade Federal de Alfenas
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VM	Ventilação Mecânica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	SEPSIS-CHOQUE SÉPTICO.....	15
2.2	SEGURANÇA DO PACIENTE.....	19
2.3	<i>Candida</i> spp.	20
2.4	COLONIZAÇÃO X INFECÇÃO POR <i>Candida</i> spp.	22
2.5	FATORES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA.....	24
2.5.1	Formação de biofilmes.....	25
2.5.2	Antifúngicos de uso convencional em esquemas terapêuticos: sensibilidade X resistência.....	27
	POTENCIAL DE VIRULÊNCIA DE <i>Candida albicans</i> E DE <i>Candida</i> spp. NÃO- <i>albicans</i> ISOLADAS DE PACIENTES CRITICAMENTE ENFERMOS, INTERNADOS NO HOSPITAL DA SANTA CASA DE POÇOS DE CALDAS / MG	30
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS GERAIS.....	71
	REFERÊNCIAS.....	72

1 INTRODUÇÃO GERAL

Infecções sistêmicas relacionadas à assistência (IRA) decorrentes de eventos adversos (EA) ligados à infecção são consideradas prevalentes em âmbito hospitalar (ROQUE; MELO, 2010). Dentre os agentes biológicos causadores destas infecções destacam-se, de forma notória, os fungos. Estes são considerados grande problema em saúde no mundo todo. Os fungos podem atuar como agentes patogênicos e ou oportunistas, principalmente em pacientes portadores de doenças graves, os quais, muitas vezes, têm suas vidas prolongadas em função dos avanços da medicina. Os fungos podem agir de maneira agressiva nos pacientes com características clínicas de imunocomprometimento, transplantados, neutropênicos e pacientes criticamente enfermos, todos sujeitos a EA, no contexto, por exemplo, de pacientes em centros de terapia intensiva (CTI), setor de emergência (SE), setor de hemodiálise (HMD), enfermaria de oncologia (EO). As principais micoses oportunistas estão relacionadas aos fungos pertencentes aos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus*. Dentre estes, o gênero *Candida* destaca-se em função da sua prevalência e importância clínica. As leveduras *Candida* spp. apresentam considerável importância clínica devido à alta frequência com que podem colonizar e infectar os seres humanos e disseminar a infecção através da corrente sanguínea (KRETZER, 2015). *Candida albicans* é considerada a principal espécie do gênero isolada em ambientes hospitalares. No entanto, tem sido observado o aumento no número de casos de infecção por *Candida* spp. não-*albicans*, o qual deve-se igualmente aos mecanismos de resistência intrínsecos ou adquiridos, aos antifúngicos convencionalmente utilizados, aos mecanismos de adaptação e sobrevivência na célula hospedeira e aos eventos adversos aos quais os pacientes criticamente enfermos são submetidos, em situações em que ocorrem danos aos mesmos. Mendes e colaboradores (2009), ao descreverem a alta proporção de pacientes brasileiros com EAs evitáveis (67%) expressam a relevância do problema e a necessidade de ações que atuem sobre a ocorrência de danos que são desnecessários e ou evitáveis.

A relevância desta pesquisa assenta-se solidamente na necessidade cada vez maior de centros de saúde, tais como os hospitais, que lidam com pacientes criticamente enfermos, sujeitos a eventos adversos relacionados à assistência, conhecerem sua comunidade fúngica e seus perfis de sensibilidade a antifúngicos;

bem como o percentual de formação de biofilmes, os quais podem influenciar negativamente na resposta à terapêutica antifúngica e na resolução dos processos infecciosos. Espera-se, com estes resultados, contribuir com a Irmandade do Hospital da Santa Casa de Poços de Caldas (IHSCPC) na identificação dos possíveis fatores geradores destas infecções decorrentes dos eventos adversos relacionados à assistência, bem como sugerir mudanças nos protocolos institucionais da IHSCPC que possam estar a contribuir para a perpetuação destas infecções bem como identificação precoce nos processos assistenciais de modo a permitir melhoria na condução destes processos e o desfecho clínico favorável ao paciente.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Neste referencial teórico serão abordados o tripé: Sepses, Fungos do gênero *Candida* spp. e sua capacidade de formação de biofilmes, e as IRAs advindas dos EAs associados a infecções.

2.1 SEPSSES-CHOQUE SÉPTICO

O termo sepse origina-se do grego *sépsis*, que significa putrefação. Citado nos poemas de Homero (700 a.C.), foi descrito por Hipócrates de Kós (400 a.C.) como perigoso, odorífero comprometimento biológico que poderia ocorrer no organismo. Depois de Hipócrates, Galeno (129-199 d.C.) respeitado médico e filósofo romano, teorizou sobre a sepse. Já os romanos acreditavam que a sepses resultava de “criaturas invisíveis” que emitiam fumaça. Essas “criaturas” criaram a base do sistema público de saúde romano, enfatizando as práticas de higiene. De certa forma, os romanos estavam corretos, no entanto, eles nunca consideraram a transmissão por contato pessoa a pessoa e, portanto, perderam a teoria geral das doenças infecciosas.

Caminhando um pouco mais na história não poderia deixar de citar que em 1840 Ignaz Semmelweiss, médico Húngaro, observou que em sua enfermaria, as mulheres que obtinham assistência de parteiras durante o parto desenvolviam sepse puerperal em apenas 2% de todos os casos, enquanto as que receberam ajuda de estudantes de medicina as desenvolviam em 16% das vezes. Semmelweiss reconheceu que a razão pela qual os estudantes de medicina poderiam influenciar as chances de desenvolvimento da sepse puerperal era porque eles realizavam autópsias e assistiam aos partos e entregavam bebês sem lavar as roupas e mãos. Ele instituiu uma política que obrigava os estudantes de medicina a lavar as mãos antes de ver um paciente e viu as taxas de sepse puerperal reduzidas para menos de 3%.

Logo após Semmelweiss, Joseph Lister, Louis Pasteur e Robert Koch fizeram seus trabalhos de grande importância histórica para promover nossa compreensão da Microbiologia e das doenças infecciosas. Como resultado das experiências de Pasteur que refutavam a teoria de que as doenças se desenvolviam espontaneamente, Lister formalizou suas teorias sobre sepse de feridas. Ao

perceber que a sepse da ferida ocorria devido a agentes patogênicos que entraram nas quebras de barreiras da pele, ele desenvolveu curativos com ácido carbólico, o que levou a um declínio significativo na sepse como consequência das feridas e à morte associada em seu hospital.

Em 1914, Hugo Schottmüller, médico alemão (1867-1936) postulou que “a sepse está presente se um foco se desenvolver a partir do qual bactérias patogênicas invadem a corrente sanguínea de maneira a causar sintomas subjetivos e objetivos”, e ele teorizou que “uma terapia deveria não ser direcionada contra bactérias no sangue, mas contra as toxinas bacterianas liberadas.

Em 1972, Dr. Lewis Thomas, poeta-filósofo da Medicina, presidente do Centro de Câncer Memorial Sloan-Kettering e reitor das escolas de Medicina da Universidade de Nova York e Yale, postulou que sepses “é nossa resposta à presença do microrganismo que faz a doença”. Em 1992 o médico norte americano Roger Bone e colaboradores definiu Sepse como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) que ocorre durante a infecção. A SIRS é definida pela presença de no mínimo dois dos sinais abaixo:

- a) temperatura central $> 38,3^{\circ}\text{C}$, ou $< 36^{\circ}\text{C}$, ou equivalente em termos de temperatura axilar;
- b) frequência cardíaca > 90 bpm;
- c) frequência respiratória > 20 rpm, ou $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg
- d) leucócitos totais $> 12.000/\text{mm}^3$; ou $< 4.000/\text{mm}^3$, ou presença de $> 10\%$ de formas jovens (desvio à esquerda).

Surge então a primeira campanha *Surviving Sepsis* (Primeira diretriz que propõe o termo Sepses Grave) (BONE *et al.*, 1992).

Posteriormente o trabalho de Rivers *et al.*(2001) instituiu a terapia guiada por metas de atendimentos protocolados que eram instituídos dentre das chamadas “Golden Hours”. Em 2001, também foi proposto o sistema PIRO, sigla derivada da língua inglesa na qual “P” significa predisposição, “I” infecção, “R” resposta e “O” disfunção orgânica, no sentido de permitir a graduação da gravidade da sepse à semelhança das doenças oncológicas.

O ano de 2012 marcou a consolidação dos “bundles”, ou seja, de agrupamentos de 3 a 6 horas referentes aos tratamentos de Sepses, Sepses grave e Choque Séptico. Consolida-se o projeto “Sepses 2.0”. Em 2016, a instituição do

“Sepses 3.0” sugeriu mudança na definição da Sepse, suprimindo dentro do antigo conceito o quadro de Sepses Grave. Neste documento foram atualizadas as nomenclaturas utilizadas, conforme as novas definições do Sepsis 3.0, sendo agora os termos utilizados: infecção, sepse e choque séptico (definidos a seguir) (SINGER *et al.*, 2016).

Definições:

- a) Sepse: Disfunção orgânica com perigo a vida causada por uma resposta desregulada a infecção;
- b) Choque séptico: Sepse com importantes anormalidades circulatórias e metabólicas/celulares, suficientes para aumentar substancialmente a mortalidade.

Crítérios Clínicos:

- a) Sepse: Infecção suspeita ou documentada, acompanhada de um aumento agudo de 2 ou mais pontos no escore “*Sequential Organ Failure Assessment*” (SOFA).
- b) Choque séptico: Sepse com necessidade de tratamento vasopressor para manutenção de pressão arterial média maior ou igual a 65 mmHg e lactato maior que 2 mmol/L, mesmo após adequada ressuscitação volêmica.

A SIRS deixou de fazer parte dos critérios para definição da presença de sepse, mas continuou tendo valor como instrumento de triagem para a identificação de pacientes com infecção e, potencialmente, sob risco de apresentar sepse ou choque séptico (ILAS; CFM, 2015).

Do ponto de vista clínico as principais manifestações encontradas no paciente séptico podem assim ser resumidas:

- a) Cardiovascular: Taquicardia, hipotensão, hiperlactatemia, edema periférico, diminuição da perfusão periférica, livedo, elevação de enzimas cardíacas e arritmias;
- b) Respiratória: Dispneia, taquipneia, cianose e hipoxemia;
- Neurológica: Confusão, redução do nível de consciência, delírio, agitação e polineuromiopatias.
- c) Renal: Oligúria e elevação de escórias.

- d) Hematológica: Plaquetopenia, alterações do coagulograma, anemia, leucocitose, leucopenia e desvio à esquerda.
- e) Gastroenterológicas: Gastroparesia, íleo adinâmico, úlceras de stress, hemorragias digestivas, diarreia e distensão abdominal.
- f) Hepáticas: Colestase, aumento de enzimas canaliculares e elevação discreta de transaminases.
- g) Endócrinas e metabólicas: Hiperglicemia, hipertrigliceridemia, catabolismo protéico, hipoalbuminemia, hipotensão por comprometimento suprarrenal e redução dos hormônios tireoidianos (ILAS; CFM, 2015).

Face ao problema representado pela elevada incidência, altos custos e mortalidade, o principal desafio dos prestadores de serviço à saúde é implementar, de forma institucionalmente gerenciada, programas que levem à beira do leito as melhores evidências científicas disponíveis, visando garantir a melhor prática assistencial (Instituto Latino-Americano para Estudos da Sepse (ILAS; CFM, 2015).

Os dados nacionais disponíveis apontam para uma elevada letalidade, mormente em hospitais públicos vinculados ao Sistema Único de Saúde. Infelizmente, o número de casos de sepse no Brasil não é conhecido. Um estudo de prevalência de um só dia em cerca de 230 Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) brasileiras, aleatoriamente selecionadas de forma a representar de maneira adequada o conjunto de UTIs do país, aponta que 30% dos leitos de UTI do Brasil estão ocupados por pacientes com sepse grave ou choque séptico. Esse estudo conduzido pelo Instituto Latino-Americano para estudo de Sepses (ILAS), demonstrou em seus resultados iniciais números alarmantes, com letalidade próxima dos 50% superlativo custo financeiro e alta mortalidade (ILAS; CFM, 2015; LOBO *et al.*, 2019).

Sob a óptica dos agentes etiológicos destaca-se no maior estudo brasileiro já publicado, contando com 75 UTIs, os bacilos Gram negativos representaram a maior parte dos casos em que o agente foi identificado, seguidos dos cocos Gram positivos, especificamente *Staphylococcus aureus*. Os fungos contribuíram com 5% dos casos (ILAS; CFM, 2015). Já em outra casuística, foram analisados pacientes com infecção, nem todos com sepse grave, internados em 90 UTIs brasileiras. Nela, o isolamento do agente foi possível em metade dos casos e os agentes encontrados

em maior percentual foram bactérias Gram-negativas (72%), seguidos de bactérias Gram-positivas (33,9%) e fungos (14,5%) (ILAS; CFM, 2015). De acordo com os valores apresentados, a sepse ocasionada por fungos da espécie *Candida* spp. é considerável e devido a este fato é que objetivamos o desenvolvimento deste trabalho científico.

2.2 SEGURANÇA DO PACIENTE

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define segurança do paciente como uma estrutura de atividades organizadas que cria culturas, processos, procedimentos, comportamentos, tecnologias e ambientes na área da saúde que reduz riscos de forma consistente e sustentável, diminui a ocorrência de dano evitável, torna os erros menos prováveis e reduz o impacto do dano quando este ocorrer (OMS, 2021; 2002).

Os EAs relacionados aos processos de cuidar comprometem a segurança do paciente e, muitas vezes, podem colocar sua vida em risco, afetando a qualidade do cuidado. Estes eventos estão, muitas vezes, associados a utilização de novas tecnologias terapêuticas e diagnósticas. As condições clínicas do paciente também influem diretamente na ocorrência de EA, principalmente em pacientes em estado grave, dada sua instabilidade e necessidade de intervenções. Os pacientes em UTI são particularmente os mais vulneráveis a essas complicações. A segurança do paciente tornou-se uma preocupação mundial em função dos efeitos decorrentes de possíveis danos derivados da assistência prestada. Tais conseqüências afetam não somente o paciente, como sua família, os profissionais de saúde envolvidos na assistência, a instituição e a sociedade. A qualidade do cuidado e a segurança dos pacientes, nesse contexto, assumem papel de relevância, sendo reconhecida como a Era da Segurança (CASSIANI; GIMENES; MONZANI, 2009; ROQUE; MELO, 2010; SOUSA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2019).

O tema segurança do paciente tem sido destacado por várias organizações internacionais e nacionais tais como a OMS, a Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organizations (JCAHO), o Institute of Medicine (IOM), o Institute for Healthcare Improvement (IHI), a National Coordinating Council for Medication Error Reporting and Prevention (NCC MERP) e a American Society of Healthy-System

Pharmacists e o Ministério da Saúde no Brasil (ROQUE; MELO, 2010; SILVA *et al.*, 2016).

Desde 1988, o Brasil tem implementado um sistema de saúde dinâmico e complexo – o Sistema Único de Saúde (SUS) –, baseado no princípio da saúde como direito do cidadão e dever do Estado. O sistema de saúde no Brasil deve assegurar a continuidade de cuidados à população no nível primário por meio da atenção básica à saúde; no nível secundário, via ambulatório; e, no nível terciário, por meio do hospital (PAIM *et al.*, 2011 *apud* SILVA *et al.*, 2016).

2.3 *Candida* spp.

São organismos eucarióticos, heterotróficos, que apresentam pleomorfismo, ou seja, a capacidade de se reestruturar de acordo com as condições ambientais ou com seu ciclo reprodutivo (KLEIN; TEBBETS, 2007). O gênero *Candida* pertence ao reino Fungi, grupo Ascomycota, filo Saccharomycotina, classe Saccharomycetes, família Saccharomycetidae e pode ser dividido em cerca de 200 espécies já catalogadas. Esse fungo faz parte da microbiota normal de diversas regiões do corpo, tais como cavidade oral, trato genitourinário e gastrointestinal. Além da possibilidade de reprodução assexuada, há espécies que são reconhecidas como capazes de se reproduzirem de forma sexuada ou parassexuada (REEDY; FLOYD; HEITMAN, 2009).

As espécies de maior importância clínica são *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. lusitanae*, *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. auris* (CAGGIANO *et al.*, 2015; TODD, 2017; DE MELO *et al.*, 2022).

Candida albicans ainda é a espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas, mas espécies não-*albicans* têm aumentado em frequência, muitas vezes são refratárias às terapias convencionais. Esta característica oportunista da *C. albicans* ancora-se em seu polimorfismo celular, com sua alternância entre morfologias distintas, fenômeno denominado *switching* (alterações fenotípicas). A capacidade de *C. albicans* poder apresentar morfologias distintas entre levedura, hifa e pseudohifa é considerada fator crítico associado à virulência e essencial para patogenicidade do fungo tanto a nível superficial quanto sistêmico (DE MELO *et al.*, 2022).

Paralelamente ao aumento geral das candidemias, observou-se aumento das infecções de corrente sanguínea por espécies não-*albicans* de *Candida* como: *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilhermondii*, *C. lusitaniae* e mais recentemente, *C. auris*. As razões para essa inversão no padrão de distribuição das espécies ainda não foram completamente elucidadas, podendo estar fortemente relacionadas com o potencial de virulência destes microrganismos (CALVO *et al.*, 2016). *C. albicans* é naturalmente sensível aos fármacos antifúngicos de uso sistêmico, mas já foram relatados casos de resistência adquirida a azólicos em pacientes que foram expostos prolongadamente a estes medicamentos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). *C. dubliniensis* apresenta características morfológicas e bioquímicas semelhantes às de *C. albicans*, no entanto, apresenta maior facilidade em desenvolver resistência a azólicos (KRCMERY; BARNES, 2002). *C. tropicalis* possui considerável potencial biológico como agente oportunista quando o hospedeiro se encontra neutropênico, quando há supressão da microbiota bacteriana pelo uso de antimicrobianos e danos na mucosa gastrointestinal. Em países da América Latina, em especial no Brasil, esta espécie é muito frequente e constitui-se na segunda ou terceira principal causa de candidemia (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). *Candida glabrata* destaca-se pela capacidade de produzir biofilme e baixa sensibilidade ao fluconazol e anfotericina B (TAMURA *et al.*, 2007). Destaca-se o aumento nos índices de colonização/infecção por esta espécie em pacientes expostos prolongadamente ao fluconazol (COLOMBO *et al.*, 2007; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). *C. bracarensis* e *C. nivariensis*, descritas como espécies relacionadas à *C. tropicalis* têm sido consideradas mais resistentes aos agentes antifúngicos de que *C. tropicalis* (ROMEIO; CRISEO, 2009). *Candida* do complexo “*psilosis*” (*C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*) assim classificadas desde 2011 por de Toro e colaboradores (2011) desde os anos 80, a então denominada *C. parapsilosis*, apresenta-se como um importante patógeno hospitalar de fungemias, sendo reconhecida como a segunda principal causa de infecção invasiva na América Latina, sendo que sua ocorrência é maior em crianças e recém-nascidos prematuros internados em unidades de terapia intensiva (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). *C. krusei* tem se mostrado como um patógeno hospitalar ocasional, particularmente, em pacientes portadores de doenças patológicas malignas e/ou submetidos a transplante de medula óssea. Esta espécie

é naturalmente resistente ao fluconazol, e, assim, tem sido verificado seu aumento em pacientes neutropênicos expostos a este antifúngico (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). *Candida lusitaniae* é uma levedura pouco freqüente como agente causador de doença invasiva, mas tem sido relatada como agente de candidemia em pacientes imunocomprometidos. Frequentemente, isolados clínicos de *C. lusitaniae* apresentam resistência natural a anfotericina B ou desenvolvem-se rapidamente, mas são sensíveis a derivados azólicos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). *Candida guilliermondii* ainda não é frequentemente encontrada como causadora de infecções invasivas, mas esta espécie vem sendo reconhecida por diferentes autores como agente emergente. O complexo *Candida guilliermondii* é um complexo geneticamente heterogêneo composto por diversas espécies fenotipicamente indistinguíveis, incluindo *C. guilliermondii sensu stricto*, *Candida fermentati*, *Candida carpophila*, e *Candida xestobii* (LAN; XU, 2006). Em estudo de Marcos-Zambrano e colaboradores (2017), os isolados deste complexo apresentaram-se com sensibilidade diminuída ao fluconazol e equinocandinas, as baixas capacidade de formação de biofilmes e virulência foram associadas com prognósticos favoráveis. A proporção de episódios de candidemia causados por espécies do complexo *C. guilliermondii* tem sido pouco estudada, entretanto, acredita-se, que estas espécies estejam envolvidas em aproximadamente 2% de todos os casos (PFALLER; DIEKEMA; SHEEHAN, 2006). A maioria dos casos descritos relaciona-se a pacientes com câncer. Em relação a seu tratamento, há relatos de resistência *in vitro* de amostras clínicas à anfotericina B, porém há dúvidas sobre a real eficácia deste medicamento na terapêutica de infecções sistêmicas por *C. guilliermondii* (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

2.4 COLONIZAÇÃO X INFECÇÃO POR *Candida* spp.

O termo colonização é definido como a presença de um microrganismo em um ambiente ou um hospedeiro, havendo crescimento e multiplicação, mas sem qualquer expressão clínica e sem detecção de resposta imune quando é isolado. A colonização é definida como o primeiro passo na patogênese das infecções invasivas associadas a *Candida* spp. Embora *C. albicans* seja considerada a levedura colonizante predominante, nas últimas décadas, as infecções e

colonizações por outras espécies do gênero *Candida* têm aumentado consideravelmente. Muitos, se não a maioria, dos casos de infecções hospitalares resultam, direta ou indiretamente da colonização dos pacientes. Estudos têm mostrado que os pacientes internados podem rapidamente ser colonizados pela microbiota característica do ambiente hospitalar em questão (MENDIRATTA *et al.*, 2006). Embora a maioria das infecções por *Candida* spp. sejam de origem endógena, decorrentes da translocação de sítios da levedura existe a possibilidade de infecção exógena. O desequilíbrio na microbiota residente, lesões na mucosa intestinal, casos graves de desnutrição induzidos por algum fator predisponente do hospedeiro ou do fungo favorece a translocação da levedura aos capilares mesentéricos, permitindo o acesso à corrente sanguínea (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

As infecções hospitalares (IH) denominadas “infecções relacionadas a serviço de saúde” são consideradas uma das mais freqüentes complicações nos pacientes submetidos à hospitalização. A natureza dos microrganismos encontrados nestas IHS tem variado nas últimas cinco décadas, devido a fatores ambientais e pressão seletiva do uso de antimicrobianos. A incidência de infecções hospitalares por fungos tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas acarretando altos índices de mortalidade que ficam em torno de 60%. É importante que cada instituição conheça o seu perfil epidemiológico de IHS e os desafios e obstáculos a serem vencidos para posterior prevenção e controle das mesmas. A relevância das infecções por *Candida* spp. e ambiente hospitalar passaram a ganhar importância a partir da década de 1980, interligada ao avanço da tecnologia científica médica e do melhor conhecimento dos mecanismos desencadeadores de doenças, propiciando sobrevivência maior do ser humano. Este fato fez com que as intervenções de procedimentos clínico-laboratoriais expusessem os pacientes a uma seletividade de microrganismos mais resistentes, favorecidos pelo uso indiscriminado, ao longo do tempo, dos fármacos disponíveis no mercado (COLOMBO *et al.*, 2013, 2007). Entre as infecções invasivas causadas pelo gênero *Candida*, salienta-se a relevância clínica dos casos de infecção de corrente sanguínea, conhecida como candidíase hematogênica ou candidemia. Um problema particular associado a este grupo de pacientes é que, no momento inicial da infecção, faz-se dificultada a distinção clínica de pacientes com fungemia daqueles com infecção hematogênica bacteriana.

Esta dificuldade acarreta um atraso inicial da terapia antifúngica e a escolha da terapêutica empírica inicial pode ser inadequada (MATSUMOTO *et al.*, 2002). Diversos processos patológicos, fisiológicos ou traumáticos podem facilitar a colonização e posterior infecção do hospedeiro por *Candida* spp.. Os fatores mais comumente encontrados são: imunossupressão, neutropenia, desnutrição e quimioterapia antineoplásica. Outros facilitam a entrada do microrganismo no hospedeiro, como o uso prolongado de cateteres, queimaduras, cirurgias extensas, diálise peritoneal dentre outros. Outras condições tais como a utilização prolongada de cateteres associados à antibioticoterapia, nos quais as leveduras podem multiplicar-se no trato gastrointestinal ou pele, podem ocasionar a disseminação do fungo e, conseqüentemente, casos de candidemia (MALUCHE; SANTOS, 2008).

Nos últimos anos tem ocorrido alteração na etiologia das infecções causadas por *Candida* spp., embora haja predominância de *C. albicans*, as espécies não-*albicans* de *Candida* spp. têm respondido por mais de 50% dos casos de candidíase invasiva. (PAPPAS *et al.*, 2004). A alteração na etiologia das infecções pode estar associada a alguns fatores de risco específicos das espécies não-*albicans* de *Candida* spp. tais como: colonização simultânea em mais de um sítio anatômico, neutropenia, uso profilático de antifúngicos, principalmente fluconazol, acesso vascular central, índice APACHE II; leucemia em fase aguda, transplante de medula óssea, interrupção do uso de anfotericina B durante o tratamento, doenças hematológicas malignas, processos cirúrgicos e falência renal (PAPPAS *et al.*, 2016).

2.5 FATORES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA

A participação ativa de *Candida* na fisiopatologia do início e avanço da infecção, existe marcadamente devido aos seus fatores associados à virulência. Estes fatores estão relacionados tanto à ocorrência de colonização quanto infecção.

O polimorfismo impulsiona a transição de *C. albicans* de uma forma comensal para uma forma oportunista patogênica dependente de mudanças no ambiente em que está localizada. Caracteriza-se pela transição morfológica dos blastosporos em hifa, e a forma transitória entre eles, a pseudohifa (TALAPKO *et al.*, 2021).

A capacidade da levedura em aderir, infectar e causar doença, é definida, em conjunto, como potencial de virulência ou patogenicidade. Os fatores associados à

virulência são determinados geneticamente, porém expressos pelos microrganismos quando submetidos a certas condições de estresse, tais como alteração de teor nutricional, atmosfera de oxigênio e temperatura (TAMURA *et al.*, 2007).

Candida albicans e *Candida* spp. não-*albicans* dispõem de uma ampla variedade de fatores associados à sua capacidade em causar infecções e apresentam capacidade adaptativa superior à de outros microrganismos. Dentre os principais fatores associados à virulência destacam-se habilidade em produzir enzimas hidrolíticas, variabilidade genotípica, alterações fenotípicas, aderência e formação de biofilmes (RÖRIG; COLACITE; ABEGG, 2009; TAMURA *et al.*, 2007).

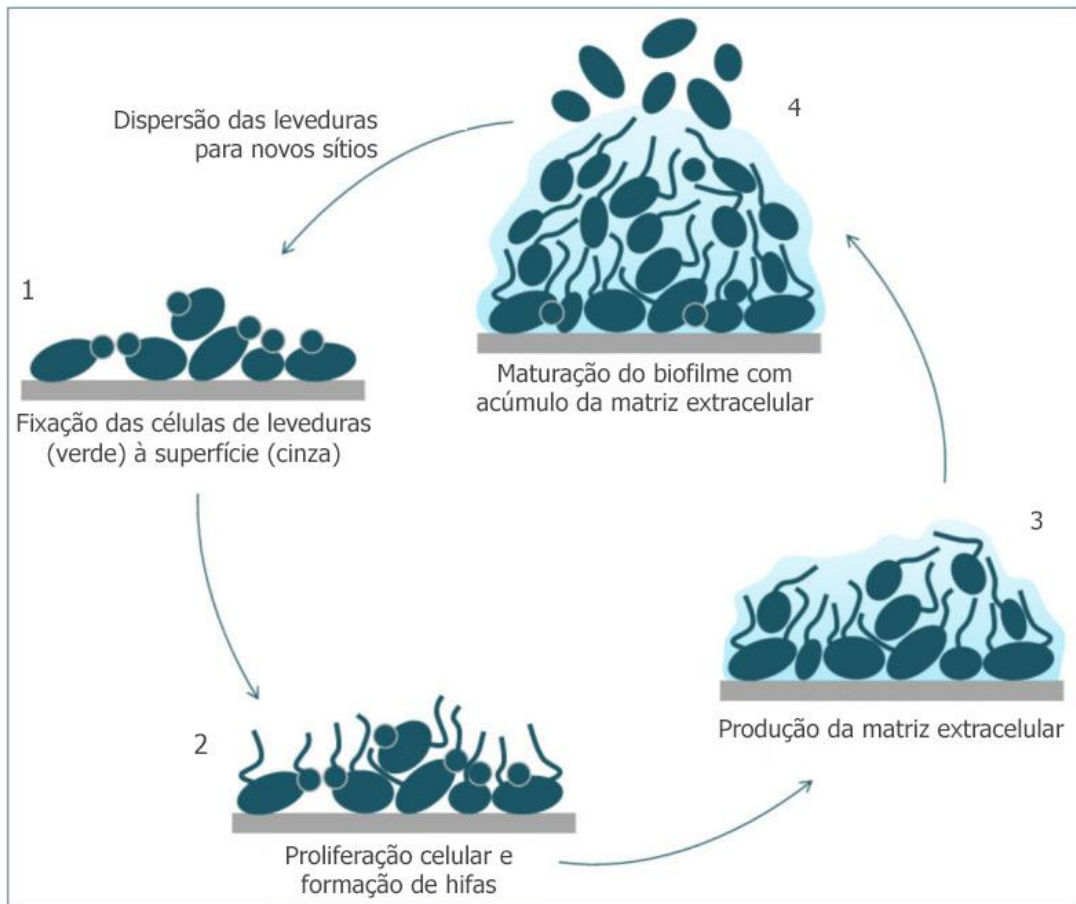
2.5.1 Formação de biofilmes

A formação de biofilme é uma propriedade da patogênese de *C. albicans*. A maioria das infecções causadas por *C. albicans* estão relacionadas à criação de um biofilme na superfície do hospedeiro ou em superfícies abióticas (implantes), o que leva à alta morbidade e mortalidade (TALAPKO *et al.*, 2021).

Conforme pode ser observado na Figura A, a formação do biofilme começa com a fixação de células de levedura (verde) à superfície (cinza). Na fase inicial do biofilme ocorre a proliferação de *C. albicans* e formação de células hifas. Segue-se a produção da matriz extracelular. A fase de maturação inclui o acúmulo de uma matriz extracelular. Finalmente, as células de levedura se dispersam para um novo local e podem formar novos biofilmes (TALAPKO *et al.*, 2021).

Os biofilmes são estruturas formadas a partir de células de leveduras que foram depositadas em superfícies bióticas ou abióticas e que se aderiram às mesmas, iniciando a formação de microcolônias. A partir destas células surgem hifas, pseudohifas e é secretada uma matriz extracelular polimérica densa e rígida, composta principalmente por polissacarídeos semelhantes aos da parede celular, proporcionando uma estrutura tridimensional altamente heterogênea. A formação do biofilme está relacionada ao aumento da resistência aos fármacos utilizados em tratamentos contra infecções por *Candida* spp. (CHANDRA *et al.*, 2001; TOBUDIC *et al.*, 2012).

Figura A - Estágios da formação e desenvolvimento de biofilmes por *Candida* spp.



Fonte: Traduzido e adaptado de TALAPKO *et al.* (2021).

A matriz de polissacarídeo extracelular compreende polímeros extracelulares e DNA extracelular envolvido na manutenção da estrutura de biofilme. Uma parte essencial da matriz extracelular são β -1,3-glucanos, contribuindo significativamente para a resistência do biofilme aos fármacos antifúngicos. *C. albicans*, em biofilme, libera mais β -1,3-glucanos na matriz extracelular do que células planctônicas. Os canais de biofilme favorecem a manutenção celular e facilitam a entrada de nutrientes, ar e água, dando-lhe novas propriedades "multicelulares". A comunicação "quorum sensing" é considerada fator essencial na formação do biofilme e baseia-se no comportamento dos microrganismos e na síntese de moléculas sinalizadoras que modulam o processo que mantém o tamanho ideal do biofilme. A rede de transcrição que regula a formação de biofilmes é composta por seis grandes reguladores de transcrição (os genes *EFG1*, *TEC1*, *BCR1*, *NDT80*, *ROB1* e *BRG1*) que regulam a expressão de cerca de 1000 genes. O fator de transcrição *BCR1* (*Biofilm and Cell wall Regulator 1*), cujo principal alvo é *HWP1* (*Hyphal Wall Protein*), é necessário

para formação de biofilme em superfícies mucosas (TALAPKO *et al.*, 2021).

A proteína Hwp1 se liga a transglutaminases em células hospedeiras de biofilmes em superfícies mucosas. Enquanto em superfícies abióticas, é expressa como uma enzima independente do hospedeiro e tem uma função de adesão. Vários produtos genéticos diferentes controlam o desenvolvimento de biofilmes em fatores de transcrição de superfícies abióticas. Os dois reguladores essenciais do biofilme em superfícies abióticas são *EFG1* e *BCR1*. Esses fatores de transcrição são necessários para a expressão de diferentes genes para adesão celular e filamentação em biofilmes em superfícies abióticas (TALAPKO *et al.*, 2021).

Juntamente com as células de *C. albicans* outras diversas linhagens microbianas também fazem uso da estrutura fornecida pelo biofilme para se estabelecerem, formando um complexo polimicrobiano (CHANDRA *et al.*, 2001; FRANCOLINI; DONELLI, 2010). Como demonstrado em estudo conduzido por Adam, Baillie e Douglas (2002), biofilmes mistos também podem estar associados a fracassos terapêuticos como exemplo a relação mutualística em biofilmes de *C. albicans* e *Staphylococcus epidermidis*. Segundo os autores, o polímero secretado por *S. epidermidis* impede a penetração de fluconazol no biofilme, protegendo *C. albicans*, e a matriz secretada pelo fungo protege a bactéria, impedindo a ação da vancomicina.

Além desta interação celular outros tipos de mecanismos promotores de resistência são encontrados em biofilmes. Entre estes podemos destacar as bombas de efluxo, que atuam em células planctônicas e fases iniciais da maturação de biofilmes; a redução da síntese do ergosterol; o *quorum sensing*; alterações na expressão gênica; a formação e distribuição coordenada da matriz secretada e a presença e persistência de células após a apresentação a medicamentos, entre outros (TAFF *et al.*, 2013; DONLAN; COSTERTON, 2002).

2.5.2 Antifúngicos de uso convencional em esquemas terapêuticos: sensibilidade X resistência

Os principais grupos de antifúngicos usados no Brasil com ação em *Candida* spp. são: os poliênicos (anfotericina B e nistatina), os azólicos imidazólicos

(cetoconazol, miconazol) e os triazólicos (itraconazol, fluconazol, voriconazol). A anfotericina B é considerada um dos antifúngicos mais efetivos, com ampla atividade fungicida *in vivo* e *in vitro*, embora sua formulação endovenosa possua limitação de uso devido à elevada toxicidade renal. Formulações lipídicas podem atenuar o dano renal, porém, o alto custo prejudica sua utilização em largo espectro. A maioria das espécies do gênero *Candida* tem apresentado sensibilidade à anfotericina B, embora alguns estudos recentes tenham apresentado isolados de *C. glabrata* e *C. krusei* para os quais deve-se aplicar dose máxima deste antifúngico. Mesmo diante destas considerações, a anfotericina B é considerada droga de primeira escolha para o tratamento de candidíase sistêmica em crianças (PAPPAS *et al.*, 2004). Matsumoto e colaboradores (2002) descrevem que em relação aos azóis, *C. parapsilosis* mostrou ser bastante sensível ao itraconazol (92,8%), cetoconazol (85,7%) e fluconazol (64,3%), no entanto, uma elevada porcentagem de isolados *C. albicans* e *C. tropicalis* se mostraram resistentes a essas drogas. Segundo Flórez e colaboradores (2009) *C. tropicalis* é a espécie com maior porcentagem de resistência aos imidazólicos e as espécies não-*albicans* apresentam altos índices de resistência ao fluconazol. *Candida glabrata* e *C. krusei* são espécies com alta resistência para os triazóis e sua importância tem aumentado devido a associações com sérias infecções. Em relação aos isolados de *C. glabrata* provenientes de crianças, 16% destes e 13% dos isolados a partir de adultos apresentaram resistência a este fármaco. Já *C. krusei* é espécie intrinsecamente resistente ao fluconazol. A resistência de isolados de *Candida* aos azóis é bem descrita entre indivíduos infectados por HIV apresentando quadro de candidíase orofaríngea recidivante e entre adultos com estágios avançados de candidíase invasiva (PFALLER; DIEKEMA, 2010).

Desta maneira, os testes de avaliação de sensibilidade aos azóis têm uso crescente na orientação do tratamento de candidíase, especialmente em situações em que há falha no tratamento empírico inicial (PAPPAS *et al.*, 2004). O desenvolvimento de novas formulações de anfotericina B, usando lipossomas ou complexos lipídicos como sistemas de distribuição, bem como a introdução dos compostos azólicos no final de 1980 e início de 1990 representaram um avanço importante no tratamento de infecções fúngicas, devido à sua segurança e farmacocinética favorável. A introdução destes novos agentes antifúngicos facilitou

uma abordagem mais agressiva na profilaxia e tratamento de infecções fúngicas levando à preocupação com o surgimento de microrganismos resistentes (CANUTO; RODERO, 2002). No início de 1990, houve um aumento da candidíase e aparecimento da resistência ao fluconazol. Os mecanismos criados por *Candida* spp. para desenvolver resistência aos azóis consistem em falhas no acúmulo do fármaco por utilização da bomba de efluxo, regulação da expressão do gene *ERG 11* (gene envolvido na biosíntese do ergosterol), alteração no alvo de ação Erg 11p (enzima chave na síntese do ergosterol) e alteração na composição do esterol de parede (NOLTE *et al.*, 1997). A resistência à anfotericina B surgiu em paralelo com o aumento do número de infecções invasivas, devido aos fungos chamados emergentes. Na classificação dos fungos relacionados como emergentes estão as leveduras, como *Trichosporon beigeli*, *Candida lusitanae* e *Candida guilliermondii*; fungos filamentosos, como *Fusarium* spp., *Scopulariopsis* spp. e Isolados de *C. albicans* podem expressar resistência à anfotericina B e ou azóis em pacientes que recebem tratamento com estes antifúngicos. O desenvolvimento de resistência a poliênicos em espécies como *C. lusitanae* e *C. guilliermondii* tem sido descrito durante o tratamento com anfotericina B (KRCMERY; BARNES, 2002).

Potencial de virulência de *Candida albicans* e *Candida* spp. não-*albicans* isoladas de pacientes criticamente enfermos, internados no Hospital da Santa Casa de Poços de Caldas/MG

André Francisco dos Reis¹

Amanda Latercia Tranches Dias²

Resumo

Este estudo analisou o potencial associado à virulência de *Candida* spp. isoladas de pacientes criticamente enfermos, sujeitos a eventos adversos relacionados à assistência. O prontuário de 43 pacientes maiores de 18 anos, infectados por *Candida* spp. (um dos principais critérios de inclusão ao estudo) e que estiveram internados nos setores de alta complexidade de um hospital terciário no Sul do estado de Minas Gerais foi avaliado. Outros critérios adotados na análise dos prontuários (avaliados desde a 1ª internação até o desfecho clínico) fizeram referência à: assistência à saúde, terapia intensiva e prescrição de medicamentos. Os pacientes foram acometidos principalmente por sepse de foco indeterminado; e como focos primários destacaram-se as pneumonias associadas à ventilação mecânica, pacientes com COVID 19, sepses de origem renal e abdominal. Os pacientes foram predominantemente do sexo feminino e a mediana de idade na faixa de 41 e 80 anos. Durante o processo de internação foram submetidos a dispositivos invasivos associados às terapias de suporte, com destaque às sondas vesicais de demora. Do total de pacientes, aproximadamente 65% apresentaram infecção relacionada à assistência e 79% estavam sedados. A identificação fenotípica das 43 amostras fúngicas coletadas apontou 53,5% como *C. albicans* e 46,5% como *C. não-albicans*. Na análise por MALDI-TOF de 33 amostras, 51,5% foram identificadas como *C. albicans* e 48,5% como *C. não-albicans*. Todas foram capazes de formar biofilmes, sendo 30% de elevado potencial metabólico. Houve

¹<http://lattes.cnpq.br/3754054285229330>, Universidade Federal de Alfenas, dr.andrereis@hotmail.com

² <http://lattes.cnpq.br/3952202974431360>, Universidade Federal de Alfenas, amanda.dias@unifal-mg.edu.br

relação direta da sensibilidade antifúngica à Anfotericina B e baixa sensibilidade ao Itraconazol e Fluconazol, inclusive com situações de resistência.

Palavras-chave: pacientes criticamente enfermos; *Candida* spp.; biofilmes fúngicos.

Abstract

This study analyzed the potential associated with the virulence of *Candida* spp. isolated from critically ill patients liable to assistance-related adverse events. Medical records of 43 patients over 18 years old, positive for infection by *Candida* spp. (one of the main study inclusion criteria), who were hospitalized on the high complexity sectors of a tertiary hospital located in the south of Minas Gerais state were evaluated. Other criteria adopted at the analysis of the medical records (evaluated since the first hospitalization until the clinical outcome) referred to: health assistance, intensive care and medication prescription. The patients were mainly affected by undetermined focus sepsis, and as primary foci stood out pneumonia associated with mechanical ventilation, patients with COVID 19, sepsis of renal and abdominal origin. The patients were predominantly female and the median age was in the range of 41 to 80 years old. During the hospitalization process, the patients were submitted to invasive dispositives associated to supportive therapies, especially indwelling urinary catheters. Approximately 65% of patients had care-related infection and 79% were under sedation. The phenotypic identification of 43 fungal samples collected showed 53.5% as *C. albicans* and 46.5% as *C. non-albicans*. MALDI-TOF analysis of 33 samples identified 51.5% as *C. albicans* and 48.5% as *C. non-albicans*. All of them were capable to form biofilms, being 30% with high metabolic potential. There were direct relationship of the antifungal susceptibility to Amphotericin B and situations of low susceptibility to Itraconazole and Fluconazole, including resistance situations.

Keywords: critically ill patients; *Candida* spp.; fungal biofilms.

1 INTRODUÇÃO

Infecções sistêmicas relacionadas à assistência (IRA) decorrentes de eventos

adversos (EA) ligados à infecção são consideradas prevalentes em âmbito hospitalar (ROQUE; MELO, 2010). Dentre os agentes biológicos causadores destas infecções destacam-se, de forma notória, os fungos. As infecções fúngicas hospitalares causadas por microrganismos do gênero *Candida* spp. destacam-se como sendo uma das mais preocupantes e de maior incidência (BRAGA-SILVA *et al.*, 2009). São organismos eucarióticos, heterotróficos, apresentam pleomorfismo, ou seja, a capacidade de se reestruturar de acordo com as condições ambientais ou com seu ciclo reprodutivo (KLEIN; TEBBETS, 2007). Espécies desse gênero pertencem à microbiota normal da cavidade oral, trato gastrointestinal e vaginal, e são classificadas como organismos oportunistas, que vivem em harmonia com o hospedeiro, mas, em alguns casos, como em indivíduos imunodeprimidos, procedimentos invasivos, uso de antimicrobianos de amplo espectro podem se tornar patogênicos causando infecções (BARBEDO; SCARBI, 2010; SARDI *et al.*, 2013).

Candida albicans ainda é a espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas, como as candidemias, mas espécies não-*albicans* têm aumentado em frequência e muitas vezes são refratárias às terapias convencionais. As razões para essa inversão no padrão de distribuição das espécies ainda não foram completamente elucidadas, podendo estar fortemente relacionadas ao potencial de virulência destes microrganismos e a alguns fatores de risco específicos das espécies não-*albicans* de *Candida* spp. tais como: colonização simultânea em mais de um sítio anatômico, neutropenia, uso profilático de antifúngicos, principalmente fluconazol, acesso vascular central, índice APACHE II (conjunto de fatores que fornece um índice de previsibilidade de morte de um paciente criticamente enfermo); leucemia em fase aguda, transplante de medula óssea, interrupção do uso de anfotericina B durante o tratamento, doenças hematológicas malignas, processos cirúrgicos e falência renal (CALVO *et al.*, 2016; PAPPAS *et al.*, 2016). As espécies de maior importância clínica são *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. auris* (CAGGIANO *et al.*, 2015; TODD, 2017; CERNÁKOVÁ *et al.*, 2021).

As infecções hospitalares denominadas “infecções relacionadas a serviço de saúde” são consideradas uma das mais frequentes complicações nos pacientes submetidos à hospitalização. A natureza dos microrganismos encontrados nestas

IHs tem variado nas últimas cinco décadas, devido a fatores ambientais e pressão seletiva do uso de antimicrobianos. A incidência de infecções hospitalares por fungos tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas. Entre as infecções invasivas causadas pelo gênero *Candida*, salienta-se a relevância clínica dos casos de infecção de corrente sanguínea, conhecida como candidíase hematogênica ou candidemia. Um problema particular associado a este grupo de pacientes é que, no momento inicial da infecção, faz-se dificultada a distinção clínica de pacientes com fungemia daqueles com infecção hematogênica bacteriana (bacteremia). Esta dificuldade acarreta um atraso inicial da terapia antifúngica e a escolha da terapêutica empírica inicial pode ser inadequada (MATSUMOTO *et al.*, 2002).

Candida albicans e espécies não-*albicans* de *Candida* spp. dispõem de uma ampla variedade de fatores associados à sua capacidade em causar infecções e apresentam capacidade adaptativa superior à de outros microrganismos. Dentre os principais fatores associados à virulência destacam-se habilidade em produzir enzimas hidrolíticas, variabilidade genotípica, alterações fenotípicas, aderência e formação de biofilmes (RÖRIG; COLACITE; ABEGG, 2009; TAMURA *et al.*, 2007). A formação do biofilme está relacionada ao aumento da resistência aos fármacos utilizados em tratamentos contra infecções por *Candida* spp. (TOBUDIC *et al.*, 2012). Além desta interação celular outros tipos de mecanismos promotores de resistência são encontrados em biofilmes (DONLAN; COSTERTON, 2002). Entre estes podemos destacar as bombas de efluxo, que atuam em células planctônicas e fases iniciais da maturação de biofilmes; a redução da síntese do ergosterol; o *quorum sensing*; alterações na expressão gênica; a formação e distribuição coordenada da matriz secretada e a presença e persistência de células após a apresentação a medicamentos, entre outros (TAFF *et al.*, 2013).

Os principais grupos de antifúngicos, de uso no Brasil, com ação em *Candida* spp. são os poliênicos (anfotericina B e nistatina) e os azólicos imidazólicos (cetoconazol, miconazol) e triazólicos (itraconazol, fluconazol, voriconazol). A anfotericina B é considerada um dos fármacos mais efetivos, com ampla atividade fungicida “in vivo” e “in vitro”, embora possua limitação de uso de sua formulação endovenosa devido à elevada toxicidade renal, embora as formulações lipídicas possam atenuar um pouco mais o dano renal, porém de alto custo e utilização em largo espectro ficando prejudicada. A maioria das espécies do gênero *Candida* tem

apresentado sensibilidade à anfotericina B, embora alguns estudos apresentem isolados de *C. glabrata* e *C. krusei* para os quais deve-se aplicar dose máxima deste antifúngico. Os mecanismos criados por *Candida* spp para desenvolver resistência aos azóis são falhas no acúmulo do fármaco por utilização da bomba de efluxo, regulação da expressão do gene *ERG 11* (gene envolvido na biosíntese do ergosterol), alteração no alvo de ação Erg 11p (enzima chave na síntese do ergosterol) e alteração na composição do esterol de parede (NOLTE *et al.*, 1997). A resistência à anfotericina B surgiu em paralelo com o aumento do número de infecções invasivas, devido aos fungos chamados emergentes. Na classificação dos fungos relacionados como emergentes estão as leveduras, como *Trichosporon beigeli*, *Candida lusitanae* e *Candida guilliermondii*; fungos filamentosos, como *Fusarium* spp, *Scopulariopsis* spp e *Scedosporium* spp. e alguns fungos demáceos. Muitos destes fungos apresentam resistência intrínseca à anfotericina B e podem causar infecções invasivas, geralmente associadas a elevada taxa de mortalidade. Felizmente, a resistência adquirida à anfotericina B continua a ser uma ocorrência limitada (PAPPAS *et al.*, 2016).

Este estudo objetivou a análise do potencial associado à virulência de *Candida albicans* e espécies não- *albicans* de *Candida* spp. isoladas de pacientes criticamente enfermos sujeitos a eventos adversos relacionados à assistência.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Esta pesquisa tem aprovação do Comitê de Ética da Irmandade do Hospital da Santa Casa de Poços de Caldas (IHSCPC) e da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal de Alfenas (CEP/UNIFAL- MG) sob o número de protocolo 077685/2020 (ANEXOS A e B). Seguem anexados o documento que comprova a “Dispensa do Termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE” (ANEXO C) e, em decorrência do período de pandemia da Covid-19 o documento de cumprimento de todas as exigências sanitárias da ANVISA quanto ao manuseio das amostras clínicas e procedimentos (ANEXO D).

2.2 AMOSTRAGEM

Em um primeiro momento, foram investigados os prontuários de 43 pacientes agudamente enfermos, maiores de 18 anos, que estiveram internados nos setores hospitalares de alta complexidade de um hospital terciário localizado na região sul do estado de Minas Gerais. Todos estes pacientes tiveram identificação positiva para a presença de infecção por *Candida* spp., sendo este um dos principais critérios para a seleção do paciente integrante desta pesquisa. As 43 amostras de *Candida* spp., correspondentes a cada um dos 43 pacientes cujos prontuários foram avaliados, foram coletadas nos setores de Urgência/Emergência e Centro de Terapia Intensiva.

2.3 ANÁLISE DOS PRONTUÁRIOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE EVENTOS ADVERSOS RELACIONADOS À SEGURANÇA

Os prontuários dos 43 pacientes foram examinados, conforme ficha elaborada especificamente para este estudo, a partir da data da 1ª internação do paciente nos setores em avaliação e no período sob estudo (ANEXO E). O seguimento dos casos através das informações sobre o tratamento e a evolução dos pacientes foi realizado até o momento da alta ou óbito do paciente. A identidade dos pacientes e as informações contidas nos prontuários foram preservadas conforme Resolução CNS nº 466/2012. Os critérios de rastreamento adotados para a análise dos prontuários fizeram referência à assistência à saúde, à terapia intensiva e à prescrição de medicamentos, conforme a ficha de avaliação. Os dados obtidos foram tabelados e analisados em conjunto ao perfil associado à virulência apresentado pelas leveduras isoladas de cada paciente cujo prontuário esteve sob análise.

2.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Foram avaliadas amostras de *Candida* spp. isoladas de secreção traqueal, urina, corrente sanguínea, úlceras de pressão, feridas operatórias e outros sítios específicos por profissionais da IHSCP. As amostras foram semeadas em Meio de cultura cromogênico Chromagar® *Candida* (Difco, EUA) para confirmação de pureza e triagem das espécies pertencentes ao gênero *Candida* (Figura 1). A seguir, as

amostras foram submetidas à análise por espectrometria de massa MALDI-TOF para identificação de gênero e espécie. As amostras identificadas foram avaliadas quanto à sensibilidade das células planctônicas aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e itraconazol e quanto à capacidade de formação de biofilme.

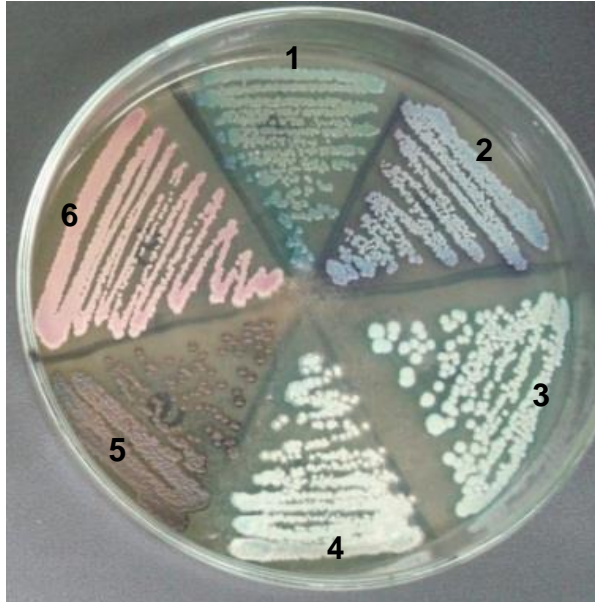


Figura 1 - Coloração apresentada por diferentes espécies do gênero *Candida* semeadas em meio cromogênico Chromagar® *Candida*.

Legenda: 1. *Candida albicans* (verde); 2. *Candida glabrata* (rosa, roxo); 3. *Candida tropicalis* (azul-acinzentado); 4. *Candida* spp. (branco para rosa); 5. *Candida krusei* (rosa claro com bordas cotonosas); 6. *Candida parapsilosis* (rosa claro).

Fonte: Dados do Autor (2022)

2.5 IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF

As 43 amostras de *Candida* spp. foram analisadas quanto ao seus perfis proteômicos por espectrometria de massa por ionização e dessorção a “laser” assistida por matriz acoplada a um analisador de massas por tempo de voo (MALDI-TOF MS), como descrito por Foschi *et al.* (2017). Aproximadamente, 10^8 células de *Candida* spp. foram lavadas com 300 μ L de água estéril e 900 μ L de etanol absoluto, posteriormente foram suspensas em 25 μ L de ácido fórmico a 70% e 25 μ L de acetonitrila. As soluções são cuidadosamente submetidas a vórtex e centrifugadas a 18000xg durante 10 minutos. Posteriormente, 1 μ L dos sobrenadantes foi transferido para uma placa de MALDI (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) em dez repetições, após secagem, à temperatura ambiente, e adição de 1 μ L de solução de matriz de MALDI HCCA (10 mg/mL de α -ciano-4-hidroxicinâmico em 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoroacético; Bruker Daltonics). A medição de MALDI-TOF MS foi realizada conforme instruções do fabricante e para a identificação de espécies, os espectros coletados foram analisados com o software específico e comparados com

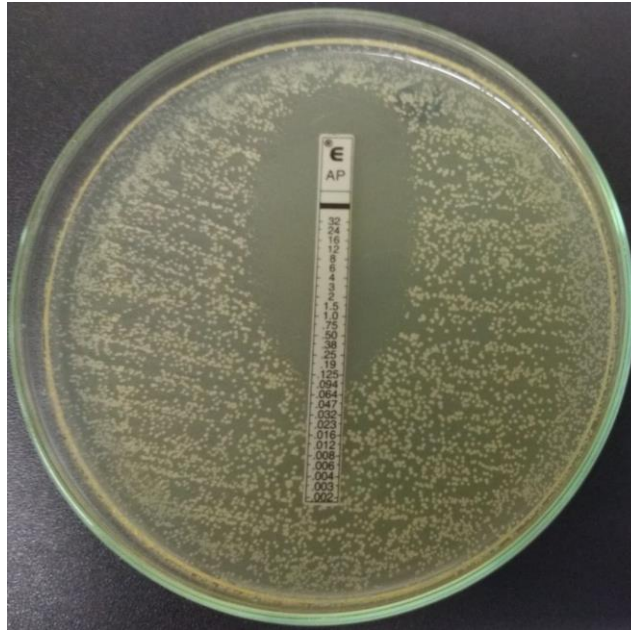
os da base de dados de referência. Esta avaliação foi realizada através de uma parceria com o Centro de Medicina Diagnóstica Hermes Pardini, em Belo Horizonte, MG.

2.6 PESQUISA DE FATORES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA DE *Candida* spp.

2.6.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos por difusão em fita (Etest®- Ab Biodisk, Solna, Suécia)

Os testes foram executados e interpretados conforme proposto no documento M44-A2 (CLSI, 2009), M27A3 (CLSI, 2008) e critérios do fabricante (AB BIODISK Solna, Suécia). Os isolados foram repicados e mantidos a 37°C em meio Agar Sabouraud dextrose, durante 24h. A partir do cultivo das amostras em Agar Sabouraud dextrose, preparou-se inóculo com turbidez de 0,5 na escala Mac Farland. O inóculo foi semeado no meio de cultura agar Mueller Hinton, suplementado com 0,5 µg/mL de azul de metileno. Após 15 minutos, as fitas plásticas, com gradiente definido e contínuo de antifúngicos, foram colocadas na superfície do meio de cultura e as placas incubadas a 37° C por 24 horas. Foram utilizadas fitas de Fluconazol, as quais apresentam gradiente de concentração correspondente a 0,016 a 256 µg/mL, de Anfotericina B e Caspofungina, com gradiente de concentração de 0,002 a 32 µg/mL. A CIM foi estabelecida no ponto de intercepção do halo de inibição de crescimento com a fita graduada (FIGURA 2). O método Etest baseia-se no estabelecimento de um gradiente de concentração estável de um agente antimicrobiano após a difusão de uma tira de plástico em um meio de ágar. Quando uma tira Etest é colocada sobre uma placa de ágar que foi inoculada com um organismo de teste e incubada por 24 a 48 horas, ocorre uma elipse de inibição de crescimento, e a intersecção da elipse com a escala numérica na tira fornece uma indicação da concentração inibitória mínima (MIC). As amostras padrões de *C. krusei* (ATCC 6258) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019) foram empregadas como controle. Os perfis de sensibilidade x resistência aos antifúngicos analisados foram interpretados conforme proposto no documento M27 A3 (CLSI, 2008) (TABELA 1).

Figura 2 - Esquema metodológico de interpretação da fita “Etest” com gradiente de droga antifúngica dado em µg/mL.



Fonte: Dados do Autor (2022)

Os perfis de sensibilidade e resistência aos fármacos foram interpretados conforme proposto no documento M27-S4 (CLSI, 2012) (TABELA 1).

Tabela 1 - Interpretação do perfil de sensibilidade antifúngica de amostras de *Candida* spp conforme valores apresentados de CIM frente a fluconazol, anfotericina B e itraconazol

Antifúngico (µg/mL)	Sensibilidade	Sensibilidade dependente da dose (SDD)	Resistência
Fluconazol	≤ 2	4-32	≥ 64 (<i>C. glabrata</i>) ≥8(demais espécies)
Itraconazol	≤0,125	0,25-0,5	≥1
Anfotericina B	≤ 1	-	≥ 2

Fonte: CLSI (2012)

2.6.2 Avaliação da capacidade de formação de biofilme

Os biofilmes foram formados de acordo como descrito inicialmente por Ramage *et al.* (2001), com algumas modificações sugeridas por Melo *et al.* (2011). Realizou-se subcultivo das linhagens de *Candida* spp. em caldo RPMI 1640 e estes

foram incubados por 18 horas em estufa de agitação orbital com programação de 180rpm, a 35°C. As células foram colhidas e lavadas duas vezes com tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,2 e ajustadas a uma densidade óptica de 0,4 a 530nm, equivalente a $1-5 \times 10^7$ células/mL em caldo RPMI 1640, para utilização logo após o preparo. Foram utilizadas placas de poliestireno não tratado e, as cargas, foram estabilizadas pela umidificação de sua base externa, facilitando o processo de adesão. Em cada poço preestabelecido da microplaca de 96 poços foram adicionados 100µL da ressuspensão celular e esta foi incubada em estufa de agitação orbital por 1,5h, a 37°C e 75rpm.

2.6.2.1 Avaliação do teor de biomassa dos biofilmes

Para avaliar a capacidade de formação dos biofilmes, no que se refere ao teor de biomassa, foi realizada coloração com solução aquosa de Cristal Violeta 0.4%, onde, após a lavagem com água MiliQ estéril, foi adicionado álcool 95%. O álcool 95% retiram o cristal da célula, permitindo a quantificação em espectrofotômetro a 595 nm. Os valores de absorbância obtidos para os poços controle foram então subtraídos dos valores dos poços teste, para eliminar resultados incorretos devido à interferência de fundo. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.6.2.2 Avaliação da atividade metabólica dos biofilmes

Em seguida, foi feita a avaliação da atividade metabólica do biofilme, realizada através do ensaio de redução do XTT [2,3-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide)] conforme método descrito anteriormente por Ramage e colaboradores (2001), com algumas modificações. O XTT foi solubilizado a 1mg/mL em PBS e reservado. Uma solução 0,4 mM de Menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) foi preparada em acetona e misturada à solução de XTT, a proporção de 1:5 (V/V), respectivamente. Em seguida a mistura foi ressuspensa em 20 mL de PBS e filtrada. Em cada poço, pré-lavado três vezes com PBS, foram adicionados 200µL da solução XTT-Menadiona e a placa incubada ao abrigo da luz, durante 2h a 37°C. A mudança na coloração é proporcional ao número de células vivas e pode ser quantificada, portanto, quanto

maior a absorvância, maior o número de células metabolicamente ativas, uma vez que o ensaio de redução de XTT quantifica a capacidade da enzima desidrogenase presente na mitocôndria de converter o sal tetrazólio hidrossolúvel (XTT) (cor amarela) em compostos de formazana (cor laranja). Após a incubação, 100 µL de solução foram transferidos para uma nova placa e avaliados em leitor de microplacas a 490 nm. Todas as densidades ópticas tiveram a leitura descontada da leitura do branco e a absorvância do controle positivo (biofilme formado sem adição de nenhuma substância). Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.6.3 Análise estatística

De acordo com as informações obtidas a partir dos prontuários e a partir de ensaios realizados com as amostras fúngicas isoladas dos pacientes, vários subgrupos foram criados. No entanto, devido à divisão das amostras em muitos subgrupos e ao pequeno número de amostras em muitos destes subgrupos, foi utilizada, quando possível, a análise estatística descritiva.

3 RESULTADOS

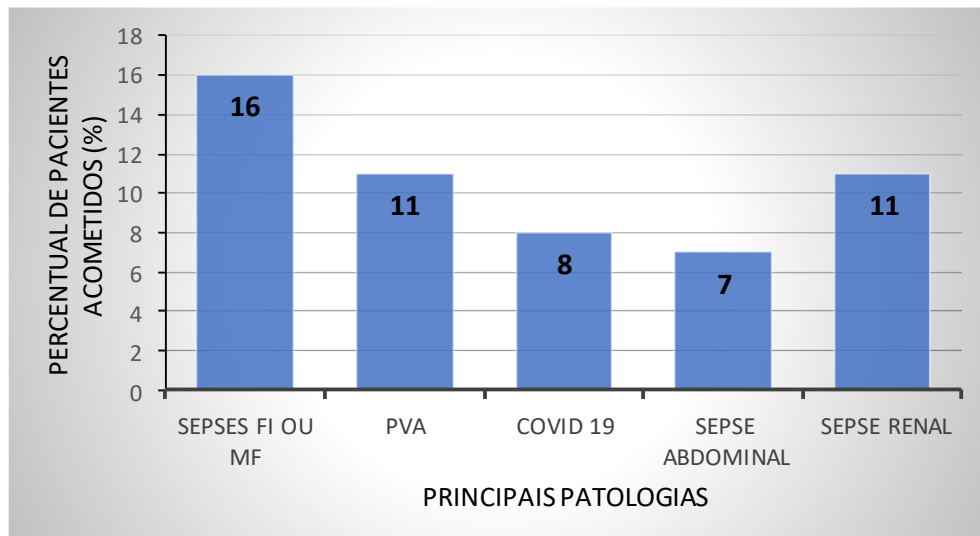
As amostras coletadas de sangue, urina, secreção traqueal, secreção de sítios cirúrgicos e fluidos orgânicos foram submetidas à cultura, aqueles que positivaram para presença de fungos foram separados para o estudo. Ao todo foram selecionados 43 pacientes nas condições descritas acima nas quais o isolado fúngico das espécies de *Candida albicans* e espécies não-*albicans* de *Candida* se fizeram presentes e intimamente relacionados com dispositivos instalados tais como: Cateter Venoso Central, Sonda Vesical de demora, Tubo orotraqueal, Tubo de Traqueostomia, Cateteres, em geral tais como para aferição de pressão arterial Invasiva, Hemodiálise, Portocath's, drenos nos diversos sítios nos quais se fizeram necessários. Estes dispositivos estão intimamente relacionados a possíveis erros de assistência bem como ao desenvolvimento de biofilmes.

3.1 ANÁLISE DOS PRONTUÁRIOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE EVENTOS ADVERSOS RELACIONADOS À SEGURANÇA E CONSTRUÇÃO DE FICHA DE AVALIAÇÃO

Foram analisados os prontuários e as amostras de 43 pacientes, maiores de 18 anos, e que estiveram internados na IHSCPC. Para a sistematização das análises dos prontuários foi elaborada a ficha de avaliação, conforme apresentado na seção Metodologia. As informações obtidas foram reunidas e tabeladas (APÊNDICES A, B,C). Estabeleceram-se os critérios de rastreamento para análise das informações em três eixos principais, sendo os mesmos: quanto à assistência à saúde, à terapia intensiva e à prescrição de medicamentos. De acordo com as informações necessárias para o prosseguimento da pesquisa, foi construída uma ficha de avaliação, conforme apresentado na seção Metodologia. As informações contidas nos prontuários de cada paciente foram utilizadas para o preenchimento da ficha de avaliação de dados. Os riscos relacionados às análises de prontuários foram considerados riscos de níveis mínimos. Estes riscos poderiam envolver divulgação de dados confidenciais e foram minimizados pois houve limitação do acesso aos prontuários apenas pelos pesquisadores responsáveis e pelo tempo, quantidade e qualidade das informações específicas para a pesquisa. Quanto aos riscos de perdas e danos físicos aos prontuários, estes também foram de nível mínimo, uma vez que as informações coletadas foram digitalizadas e mantidas sob a tutela do mestrando que desenvolve este estudo.

O tempo de internação variou de 1 a 127 dias e todos os pacientes foram submetidos, durante o período de sua internação, a um ou mais eventos adversos relacionados à assistência, tais como utilização de ventilação mecânica (VM), cateter venoso central (CVC), cateter venoso periférico (CVP), sonda vesical de demora (SVD), utilização de substâncias vasoativas dentre outros. Os 43 pacientes apresentaram positividade para cultura fúngica, sendo este um dos principais critérios para a seleção do paciente integrante desta pesquisa. Após a análise das informações coletadas dos prontuários, a partir da ficha de avaliação, obtivemos os seguintes resultados: A sepses de foco indeterminado ou múltiplos focos foi a principal patologia que acometeu os pacientes de nossa amostragem. Os focos primários identificados foram compostos principalmente por Pneumonias associadas à Ventilação Mecânica, pacientes portadores de COVID 19, seguidos por sepses de origem Renal e focos abdominais conforme podemos observar na Figura 3.

Figura 3 – Percentual das principais patologias apresentadas pelos pacientes sob estudo

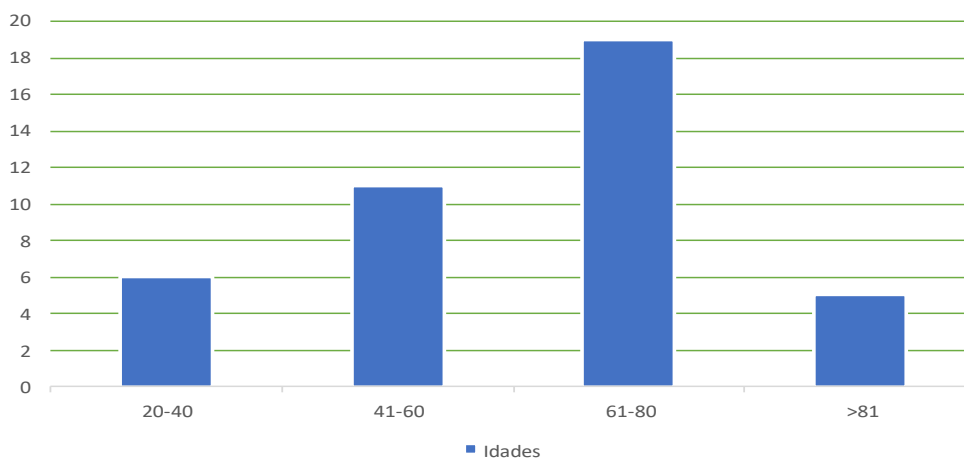


Legenda: FI: foco indeterminado; MF: múltiplos focos; PVA: pneumonia associada à ventilação mecânica.

Fonte: Análise dos prontuários que contemplaram os critérios de inclusão no estudo

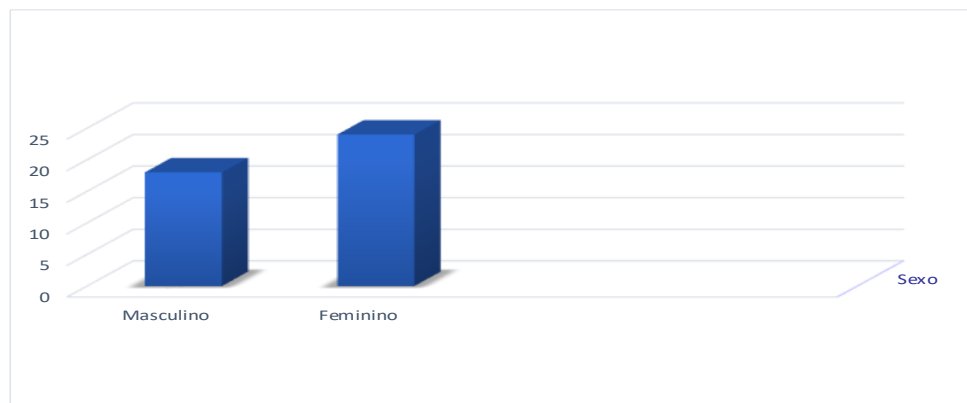
Os pacientes mais acometidos pelas patologias acima descritas encontravam-se com idades entre 41 e 80 anos, e a distribuição por sexo mostrou uma leve predominância do sexo feminino, conforme observado nas Figuras 4 e 5.

Figura 4 - Idade dos Pacientes sob estudo.



Fonte: Prontuários que contemplaram os critérios de inclusão no estudo

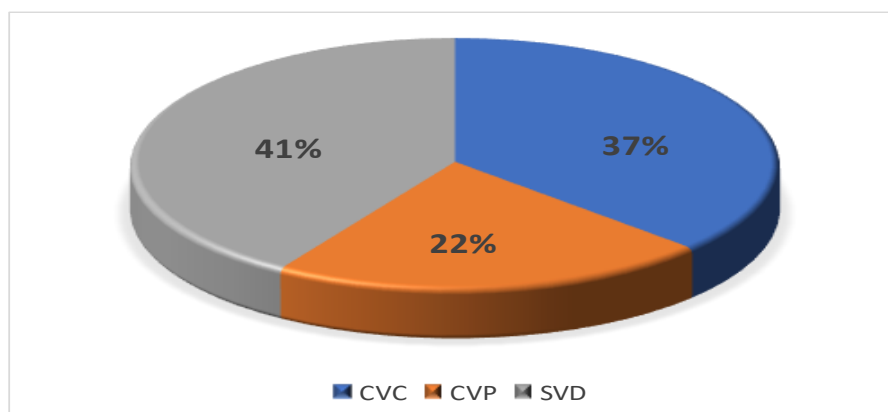
Figura 5 - Predominância das patologias conforme sexo do paciente



Fonte: Prontuários que contemplaram os critérios de inclusão no estudo

De acordo com as análises obtidas a partir das fichas de avaliação, os pacientes estiveram submetidos, em algum momento, no decurso do processo de internação, a dispositivos invasivos associados às terapias de suporte; situações comuns na assistência do paciente criticamente enfermo. Situações como esta corroboram no desenvolvimento de biofilmes bem como no aparecimento de Eventos Adversos relacionados à assistência. Os principais dispositivos observados nos pacientes sob avaliação foram CVC, CVP, SVD, como pode ser observado na Figura 6.

Figura 6 - Distribuição percentual dos principais dispositivos invasivos aos quais os pacientes, sob estudo, foram submetidos durante a internação hospitalar.

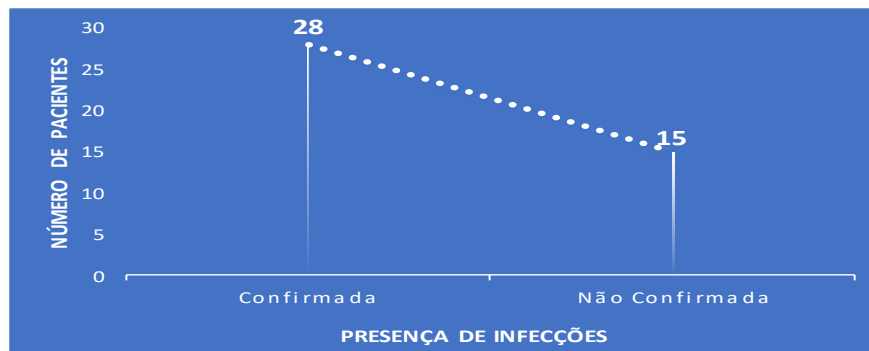


Legenda: CVC - cateter venoso central; CVP - cateter venoso periférico; SVD - sonda vesical de demora.

Fonte: Prontuários que contemplaram os critérios de inclusão no estudo

Em relação às infecções relacionadas à assistência, estas foram documentadas nos pacientes do estudo que se encontravam em tratamento de regime intensivo. Confirmou-se através dos dados obtidos pela análise dos prontuários e resultados das respostas ao questionário, que do total de 43 pacientes avaliados, 28 destes, ou seja, aproximadamente 65% os pacientes adquiriram as referidas infecções, conforme Figura 7.

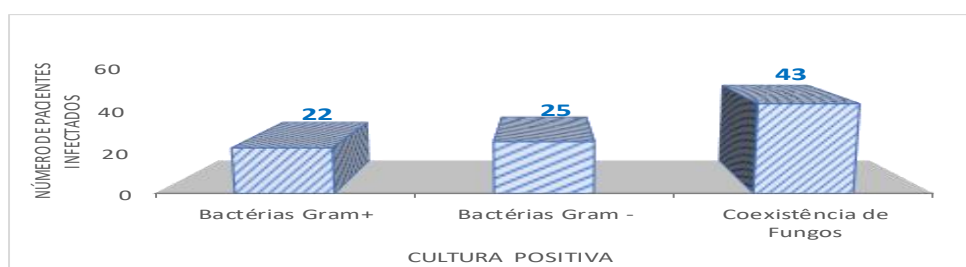
Figura 7 – Presença de infecções nos pacientes sob estudo relacionadas à assistência.



Fonte: Prontuários que contemplaram os critérios de inclusão no estudo

Conforme literatura e evidências no cotidiano da assistência médica a pacientes criticamente enfermos em ambientes de Terapia Intensiva, a presença de coinfeções fúngicas associadas a quadros de também infecção bacteriana foram evidentes. A proporcionalidade entre bactérias Gram positivas e Gram negativas mostrou-se equivalente conforme observa-se através da Figura 8.

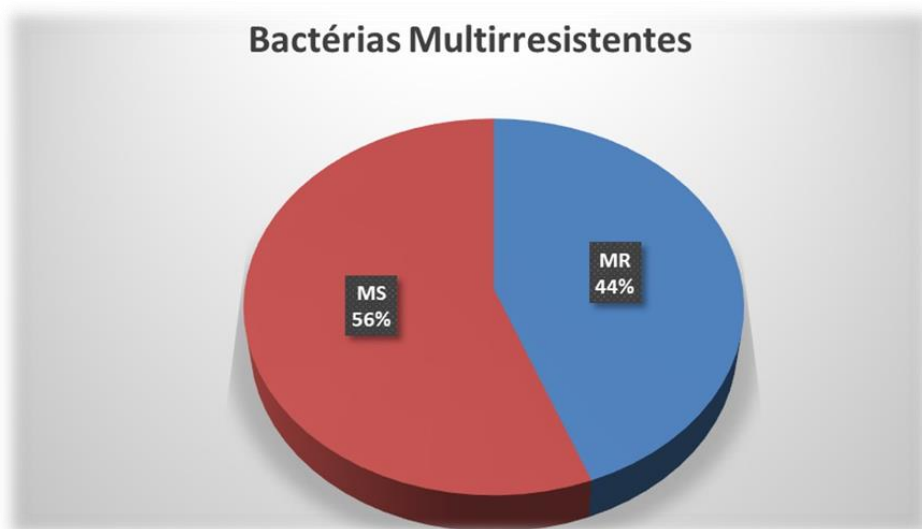
Figura 8 – Culturas positivas dos pacientes do estudo para bactérias Gram positivas, Gram negativas e coexistência de infecções fúngicas



Fonte: Prontuários que contemplaram os critérios de inclusão no estudo

Dos pacientes identificados com coinfeção bacteriana em conjunto com a infecção fúngica documentada, uma parte destes, em torno de 44%, apresentaram, em algum momento no decurso do processo de internação, infecções por bactérias multirresistentes, conforme observado na Figura 9.

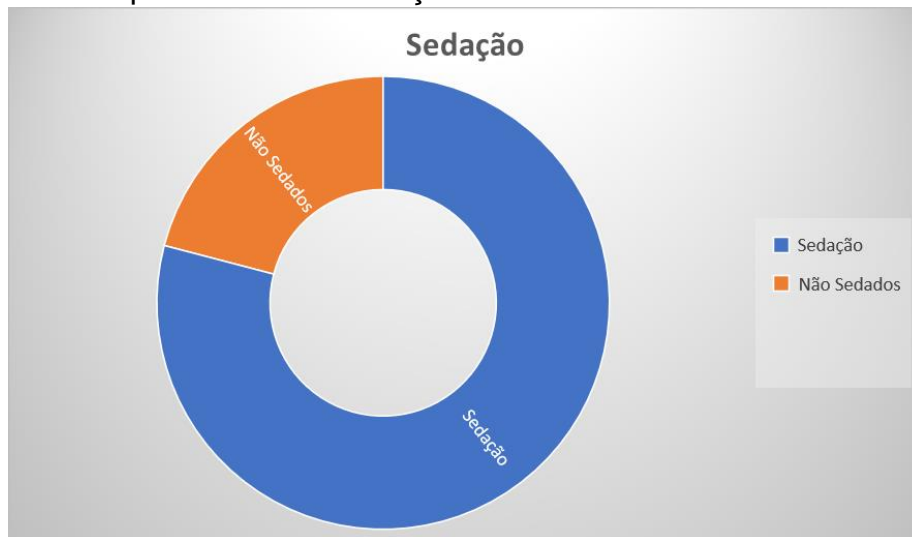
Figura 9 - Pacientes que apresentaram infecções por bactérias multirresistentes durante o processo de internação



Legenda: MS: microrganismo sensível; MR: microrganismo resistente
Fonte: Prontuários que contemplaram os critérios de inclusão no estudo

A maioria dos pacientes sob estudo, 79%, encontravam-se sob sedação, conforme observado na Figura 10. Encontravam-se em uso de hipnóticos e analgésicos em escalas medianas de um RASS -3/-4, escala empregada para avaliar o grau de sedação e agitação de um paciente, usado por profissionais que atuam em Unidades de Terapia Intensiva. Neste sentido, os pacientes são avaliados com base em parâmetros claros para determinar o nível, que varia de +4 a -5 na escala. Na escala, + 4 significa combativo e -5 não desperta. É sabido que pacientes submetidos à sedação prolongada perdem grande capacidade de *endurance* diafragmática, reflexo de tosse e atividade de musculatura intercostal, favorecendo o desenvolvimento de infecções secundárias.

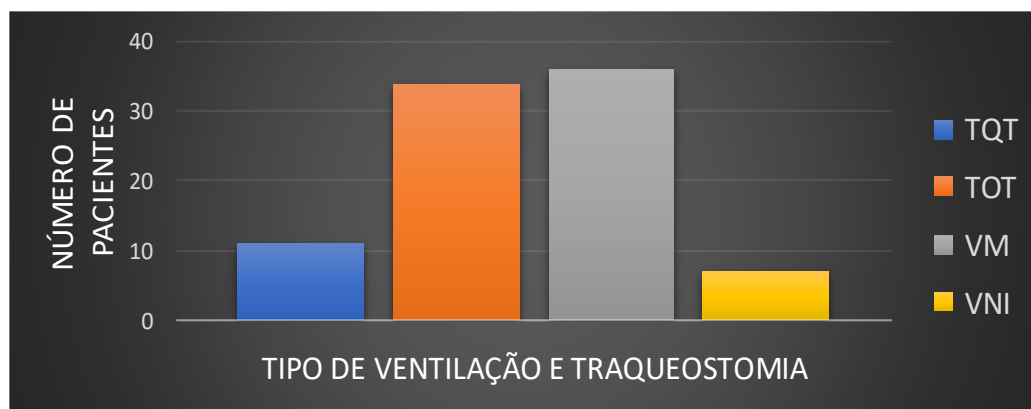
Figura 10 - Relação entre pacientes despertos e sedados durante processo de internação



Fonte: Prontuários que contemplaram os critérios de inclusão no estudo

Em decorrência do estado de sedoanalgesia, a maioria destes pacientes encontravam-se em regime de ventilação mecânica com uso de dispositivos infraglóticos situações na qual o uso de um tubo endotraqueal foi marcante (FIGURA 11). Em situações como esta, há favorecimento da perda de atividade mucociliar alta bem como os mecanismos de tosse eficazes. O acúmulo de secreção torna-se então um fator preponderante como meio de cultura para o aparecimento de pneumonias associadas à ventilação mecânica.

Figura 11 - Proporção em números absolutos de pacientes submetidos ou não à ventilação mecânica e a proporção daqueles traqueostomizados ou não, em uso de dispositivos infraglóticos.

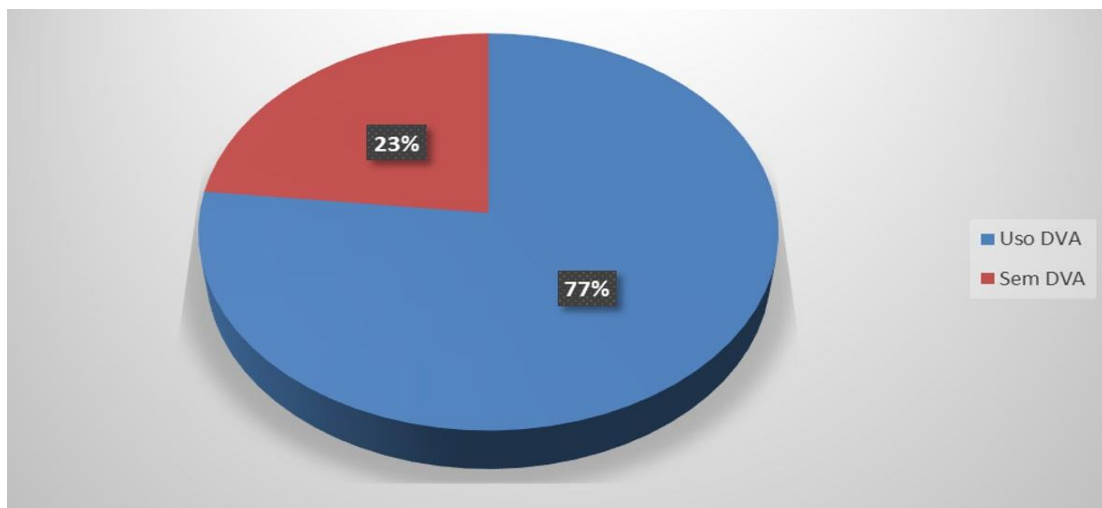


Legenda: TQT: traqueostomizados; TOT: tubo orotraqueal; VM: ventilação mecânica; VNI: ventilação mecânica não invasiva.

Fonte: Prontuários que contemplaram os critérios de inclusão no estudo

Outro aspecto importante e que apresenta impacto no desfecho dos pacientes que foram submetidos ao estudo foi o acentuado número de pacientes em uso de Drogas vasoativas (DVA) no decurso de suas internações, conforme identificado na Figura 12. Vasopressores são uma classe poderosa de drogas que induzem a vasoconstrição e, assim, elevam a pressão arterial média (PAM). Vasopressores têm o potencial de causar uma série de complicações significativas, incluindo hipoperfusão, disritmias, isquemia do miocárdio, efeitos locais e hiperglicemia. Além disso, existem várias interações entre os diferentes fármacos.

Figura 12 - Percentual de pacientes em uso de Drogas vasoativas (DVA)



Fonte: Prontuários que contemplaram os critérios de inclusão no estudo

A grande maioria dos 43 isolados de *Candida* spp., sendo um isolado de cada paciente, foi proveniente do sistema gênito-urinário (Figura 13).

Do total de pacientes com infecções fúngicas, 32 destes, ou seja, 74% apresentaram infecção bacteriana anterior ou concomitante à infecção fúngica e foram submetidos à antibioticoterapia prévia. Quanto ao manejo antifúngico, dos 43 pacientes sob investigação, 35 pacientes receberam tratamento (FIGURA 14).

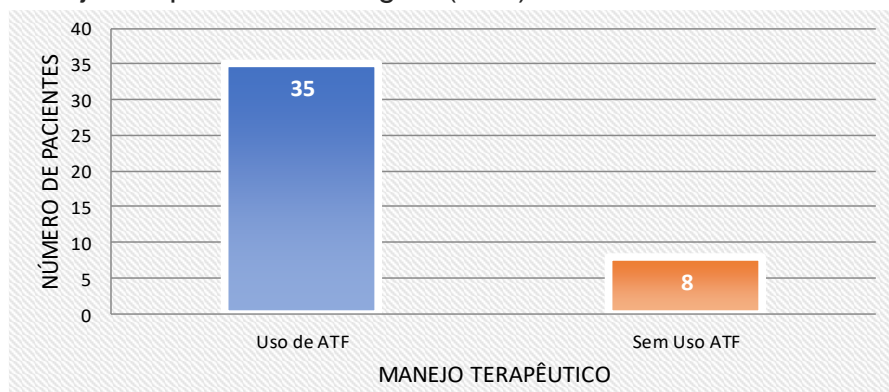
Figura 13 - Principais focos infectados por linhagens de *Candida* spp.



Legenda: LBA – lavado broncoalveolar

Fonte: Prontuários que contemplaram os critérios de inclusão no estudo

Figura 14 - Número absoluto de pacientes submetidos ao manejo terapêutico antifúngico (ATF).



Fonte: Prontuários que contemplaram os critérios de inclusão no estudo

A grande maioria dos pacientes sob regime de tratamento recebeu terapia antifúngica durante parte de sua internação. Destaca-se um número elevado na utilização de Fluconazol. Lembrando que a instituição somente dispunha de Anfotericina B e Anidulafungina, além do Fluconazol.

Os antifúngicos da classe dos azóis trabalham principalmente inibindo a enzima citocromática P450 dependente lanosterol 14-alfa-desmetilase. Esta enzima é necessária para a conversão do lanosterol ao ergosterol, um componente vital da membrana celular dos fungos. Interrupções na biossíntese do ergosterol causam danos significativos à membrana celular aumentando sua permeabilidade,

resultando em lise celular e morte. Apesar desse mecanismo de ação, os triazoles são geralmente considerados fungistáticos contra espécies de *Candida* (ZONIOS; BENNETT, 2008). Anfotericina B é um agente antifúngico de polieno com atividade in vitro contra uma grande variedade de patógenos fúngicos. A anfotericina B exerce seu efeito antifúngico pela interrupção da síntese da parede celular fúngica devido à sua capacidade de se ligar a esteróis, principalmente ergosterol, o que leva à formação de poros que permitem o vazamento de componentes celulares. Essa afinidade também pode explicar seus efeitos tóxicos contra células de mamíferos selecionadas. A anfotericina B é geralmente considerada eficaz contra fungos suscetíveis em concentrações clinicamente relevantes (WILSON *et al.*, 2016). Por último em relação a Anidulafungina, ressalta-se que é uma droga pertencente a primeira classe de antifúngicos para atingir a parede celular fúngica, foi um marco na quimioterapia antifúngica. As equinocandinas foram descobertas como metabólitos de fermentação com atividade antifúngica durante programas de triagem para novos antibióticos. São amplamente utilizados para o tratamento de candidíase invasiva, especialmente em pacientes gravemente doentes e neutropênicos. As equinocandinas são inibidores não competitivos da síntese de beta-D-glucana, polissacarídeos ramificados que são componentes essenciais na parede celular de muitos fungos patogênicos.

Dos 43 pacientes, observou-se a apresentação de índices APACHEs elevados e do total, 27 foram a óbito e 16 tiveram alta, sendo estes índices considerados insatisfatórios no que se refere à evolução do paciente (FIGURA 15).

Figura 15 - Percentual do desfecho clínico dos pacientes cujas amostras estiveram sob avaliação neste estudo



Fonte: Prontuários que contemplaram os critérios de inclusão no estudo

Diante disto, duas perguntas foram lançadas:

1- Qual foi o real impacto na evolução destes pacientes que além das infecções fúngicas cursaram também com COVID 19?

2- Qual foi a real influência destes fungos identificados e causadores de infecção, na contribuição do desenvolvimento concomitante de infecções por bactérias multirresistentes, ou vice-versa?

3.2 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Candida* spp. POR ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF

Dentre os 43 isolados, em relação à triagem realizada em meio cromogênico, 23 (53,5%) apresentaram-se como pertencentes à espécie *C. albicans* e 20 (46,5%) como espécies não-*albicans* do gênero *Candida*. A identificação por MALDI-TOF foi possível para 33 amostras (as demais não tinham quantidades e/ou qualidades aceitáveis para a técnica), sendo 51,5% identificadas como *C. albicans* e 48,5% como espécies não-*albicans* de *Candida* (QUADRO 1), dentre as quais, 50% corresponderam a isolados de *C. glabrata*. Este resultado corrobora a emergência que tem ocorrido de *C. glabrata*, principalmente em casos de candidemia em hospitais brasileiros, conforme descrito por Rodrigues *et al.* (2021).

Quadro 1 - Isolados de *Candida* spp. obtidos de pacientes criticamente enfermos internados em diferentes setores da IHSCPC, identificação das espécies, sítio de coleta e perfil de sensibilidade a antifúngicos da classe de azóis, poliênicos e equinocandinas

(continua)

Paciente*	Fenótipo	Sítio de coleta	Análise por MALDI-TOF
FCSS/paciente 1	<i>C. albicans</i>	Hemocultura	<i>Candida albicans</i>
ADAR/ paciente 2	<i>C. não-albicans</i>	Urina (SVD)	<i>Candida glabrata</i>
ECF/ paciente 3	<i>C. não-albicans</i>	Urina (SVD)	<i>Candida tropicalis</i>
GBD/ paciente 4	<i>C. não-albicans</i>	Hemocultura	<i>Candida parapsilosis</i>
CCOS/ paciente 5	<i>C. não-albicans</i>	Urina (SVD)	<i>Candida glabrata</i>
CFM/ paciente 6	<i>C. não-albicans</i>	Urina (SVD)	<i>Candida glabrata</i>
BCF/ paciente 8	<i>C. não-albicans</i>	Lesão UPP (Borda/Centro)	<i>Candida tropicalis</i>
LFS/ paciente 9	<i>C. albicans</i>	Urina	<i>Candida albicans</i>
JCP/ paciente 13	<i>C. albicans</i>	LBA	<i>Candida albicans</i>
ACC/paciente 15	<i>C. albicans</i>	AEQ	<i>Candida albicans</i>

Quadro 1 - Isolados de *Candida* spp. obtidos de pacientes criticamente enfermos internados em diferentes setores da IHSCPC, identificação das espécies, sítio de coleta e perfil de sensibilidade a antifúngicos da classe de azóis, poliênicos e equinocandinas

(continuação)

Paciente*	Fenótipo	Sítio de coleta	Análise por MALDI-TOF
VLC/ paciente 16	<i>C. albicans</i>	AEQ	<i>Candida albicans</i>
SS/ paciente 17	<i>C. não-albicans</i>	Urocultura (SVD)	<i>Candida parapsilosis</i>
MLF/ paciente 18	<i>C. não-albicans</i>	Urina	<i>Candida glabrata</i>
MAO/ paciente 19	<i>C. albicans</i>	URO (SVD)	<i>Candida albicans</i>
JDM/ paciente 20	<i>C. não-albicans</i>	HEMO (CVC Distal)	<i>Candida glabrata</i>
NFL/ paciente 21	<i>C. não-albicans</i>	URO (SVD)	<i>Candida albicans</i>
JP/ paciente 22	<i>C. albicans</i>	URO	<i>Candida albicans</i>
BGF/ paciente 23	<i>C. albicans</i>	URO (SVD)	<i>Candida albicans</i>
CMR/ paciente 24	<i>C. albicans</i>	URO (SVD)	<i>Candida albicans</i>
MMA/ paciente 25	<i>C. albicans</i>	AEQ	<i>Candida albicans</i>
ESJ/ paciente 26	<i>C. não-albicans</i>	URO (SVD)	<i>Candida tropicalis</i>
MAS/ paciente 27	<i>C. não-albicans</i>	URO (SVD)	<i>Candida glabrata</i>
AM/ paciente 28	<i>C. não-albicans</i>	AEQ	<i>Candida albicans</i>
NF/ paciente 29	<i>C. albicans</i>	URO (SVD)	<i>Candida albicans</i>
GBL/ paciente 30	<i>C. albicans</i>	URO (SVD)	<i>Candida glabrata</i>
OR/paciente 31	<i>C. albicans</i>	URO (SVD)	<i>Candida glabrata</i>
BSA/paciente 32	<i>C. albicans</i>	URO (SVD)	<i>Candida albicans</i>
RRS/ paciente 33	<i>C. albicans</i>	URO (SVD)	<i>Candida tropicalis</i>
NAL/ paciente 34	<i>C. albicans</i>	AEQ	<i>Candida albicans</i>
ARS/ paciente 43	<i>C. albicans</i>	URO (SVD)	<i>Candida albicans</i>
MAF/ paciente 35	<i>C. albicans</i>	URO (SVD)	<i>Candida tropicalis</i>
IIC/ paciente 36	<i>C. albicans</i>	URO (SVD)	<i>Candida albicans</i>
LRS/paciente 37	<i>C. albicans</i>	Hemocultura	<i>Candida metapsilosis</i>

*Codificação dos pacientes descrita nos apêndices A, B e C.

Legenda: SVD – sonda vesical de demora, UPP – úlcera de pressão; LBA – lavado broncoalveolar; AEQ – sistema fechado de aspiração traqueal; CVC – cateter venoso central; HEMO – hemocultura; URO - urocultura

Fonte: Dados do autor (2022)

De acordo com Barbosa *et al.* (2021) em estudo sobre MALDI-TOF como ferramenta diagnóstica nos protocolos de sepse em comparação com a cultura, o MALDI-TOF possui um importante papel na redução no tempo para identificação do patógeno em comparação com os métodos convencionais, preconizados pelo protocolo de sepse. Essa redução tem permitido diminuição do intervalo para a adoção da terapia efetiva e redução dos casos de mortalidade. Essas reduções têm impacto considerável nos custos hospitalares, tanto no que se refere aos gastos com terapia antibiótica quanto aos gastos com o tempo de internação dos pacientes.

3.3 PESQUISA DE FATORES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA DE *Candida* spp.

3.3.1 Resultados obtidos com o teste de sensibilidade a antifúngicos através da metodologia de difusão em fita (Etest®)

Através deste ensaio, puderam ser observadas a resistência e/ou a sensibilidade das amostras de *Candida* spp. aos antifúngicos sob avaliação. Observou-se maior sensibilidade à anfotericina B e maior resistência ao fluconazol, como apresentado na Tabela 2.

A necessidade de testes de sensibilidade aos antifúngicos que sejam reprodutíveis e clinicamente relevantes, tem sido motivada pelo crescente número de infecções fúngicas invasivas, pela expansão do uso de novos e estabelecidos agentes antifúngicos e pelo reconhecimento da resistência antifúngica como um importante problema clínico. O Subcomitê de Suscetibilidade do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI) estabelece pontos de interrupção clínicos específicos das espécies para os agentes antifúngicos sistemáticos ativos. Os pontos de interrupção clínicos servem como critérios que não só predizem o resultado clínico, mas também melhoram a sensibilidade dos métodos CLSI para detectar resistência emergente associada a mecanismos de resistência adquirida ou mutacional. Os pontos de interrupção clínicos se isolam em categorias de suscetíveis (S), dependentes de dose suscetível (SDD), intermediário (I) e resistente (R) (PFALLER *et al.*, 2012).

Em relação à análise do perfil de sensibilidade antifúngica dos 33 isolados, observou-se uma relação direta com a sensibilidade à Anfotericina B e situações de baixa sensibilidade aos fármacos Itraconazol seguido de Fluconazol, inclusive com situações de resistência. Quanto à sensibilidade antifúngica, observou-se uma relação direta com a sensibilidade à Anfotericina B e situações de baixa sensibilidade aos fármacos Itraconazol seguido de Fluconazol, inclusive com situações de resistência, conforme pode ser observado na Tabela 2.

Quanto à sensibilidade antifúngica, observou-se uma relação direta com a sensibilidade à Anfotericina B, assim como também observado por Faridi *et al.* (2022) e situações de baixa sensibilidade aos fármacos Itraconazol (30% as amostras), seguido inclusive por situações de resistência (30%). Costa *et al.* (2004) obteve 36% de resistência ao itraconazol contra 9,4% de resistência ao fluconazol.

Faridi *et al.* (2022) obteve os valores de 6,7% e 8,9% para resistência ao itraconazol e fluconazol, respectivamente. Em nossa avaliação, para o fluconazol, a maioria das amostras apresentou-se como sensível, com 3% das amostras com perfil de resistência a este fármaco. Em nosso estudo, a amostra que apresentou resistência ao fluconazol é a espécie *C. parapsilosis* (amostra 12). Na atualidade, a emergência de isolados de *C. parapsilosis* resistentes ao fluconazol tem sido descrita em vários locais do mundo (FEKKAR *et al.*, 2021).

Tabela 2 - Isolados de *Candida* spp. submetidos ao teste de sensibilidade a antifúngicos através da metodologia de difusão em fita (Etest®).

(continua)

Amostra	FL		IT		AP	
	IC ₅₀	C	IC ₅₀	C	IC ₅₀	C
1 FCSS	0,25	S	2,0	R	0,012	S
2 ADAR	0,25	S	1,0	R	0,064	S
3 ECF	0,75	S	1,0	R	0,002	S
4 GBD	0,38	S	2,0	R	<0,002	S
5 CCOS	<0,016	S	<0,002	S	0,002	S
6 CFS	0,75	S	4	R	0,016	S
7 BCF	0,5	S	0,125	S	0,09	S
8 LF	0,19	S	0,5	SDD	0,064	S
9 JC	3	S	0,032	SDD	0,125	S
10 AC	0,094	S	1	R	0,19	S
11 VLC	0,25	S	0,19	SDD	0,047	S
12 SS	96	R	1,5	R	0,094	S
13 MLF	0,064	S	0,016	S	0,125	S
14 MAO	0,064	S	0,25	SDD	0,047	S
15 JDM	8	S	4	R	0,16	S
16 NFL	1	S	0,38	SDD	0,125	S

Tabela 2 - Isolados de *Candida* spp. submetidos ao teste de sensibilidade a antifúngicos através da metodologia de difusão em fita (Etest®).

(continuação)

Amostra	FL		IT		AP	
	IC ₅₀	C	IC ₅₀	C	IC ₅₀	C
17JP	0,064	S	0,016	S	0,125	S
18BGF	0,064	S	0,094	S	0,002	S
19CMR	0,064	S	0,023	S	0,002	S
20MMA	0,032	S	0,012	S	0,38	S
21EDSJ	0,125	S	0,002	S	0,004	S
22MAS	<0,016	S	<0,002	S	<0,002	S
23AM	0,125	S	0,012	S	0,125	S
24NF	0,5	S	1,5	R	0,094	S
25GBL	1	S	0,25	SDD	0,25	S
26OR	8	S	0,25	SDD	0,125	S
27BDSA	0,064	S	0,25	SDD	0,19	S
28RRDS	0,5	0,064	0,38	SDD	0,094	S
29NAL	0,25	S	1	R	0,094	S
30ARS	0,25	S	0,25	SDD	0,023	S
31MAF	0,25	S	0,25	SDD	0,094	S
32IIDC	0,19	S	0,25	SDD	0,125	S
33LRS	0,25	S	0,064	S	0,023	S

Legenda: FL: Fluconazol; IT: Itraconazol; AP: Anfotericina; S: Sensível; R: Resistente; SDD: Sensibilidade dependente da dose.

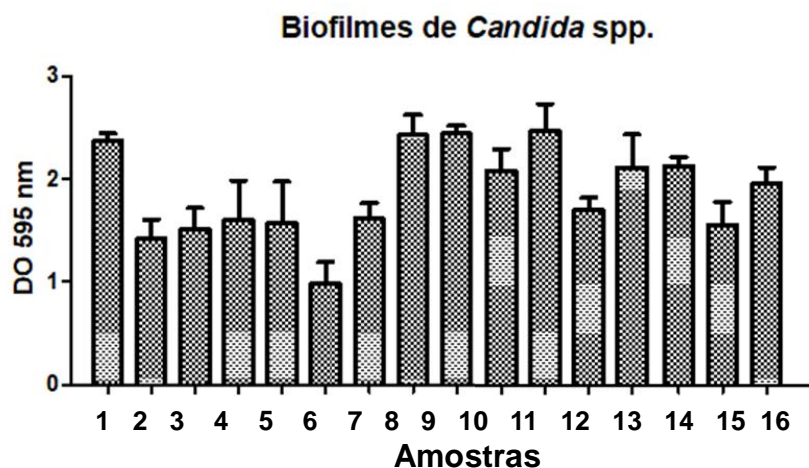
Fonte: Dados do Autor (2022)

Segundo Pfaller *et al.* (2003), o Etest realizado mostrou que a resistência de amostras clínicas de *Candida spp.*, ao Fluconazol, foi rara, sendo a maioria das amostras (90,5%) das amostras, sensíveis, assim como observamos em nosso estudo. Os dados obtidos por Vandebossche *et al.* (2002) também corroboram com os dados apresentados anteriormente, sendo a grande maioria das amostras clínicas sensíveis ao Fluconazol.

3.3.2 Avaliação da capacidade de formação de biofilme

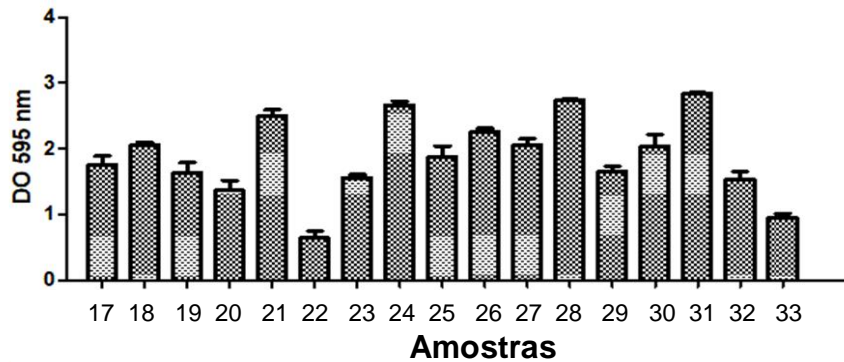
Todos os 33 isolados avaliados foram capazes de formar biofilme, no entanto, observaram-se diferenças entre os teores de biomassa apresentados pelas amostras hospitalares. 17 amostras apresentaram resultados, de densidade óptica a 595nm, maiores ou igual a 2 (amostras 1, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 18, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31). As demais, apresentam resultados abaixo de 2. Isto significa que, em valores absolutos, a maior parte das amostras apresentou um teor elevado na formação de biomassa através da análise realizada com a utilização do Cristal Violeta (FIGURAS 16 e 17). Entre os pacientes dos quais estas 17 amostras foram isoladas, apenas 5 pacientes (29,4%) tiveram alta, enquanto 12 foram a óbito (70,6%).

Figura 16 - Avaliação do teor de biomassa dos biofilmes formados pelas amostras 1 a 16



Fonte: Dados do Autor (2022)

Figura 17 - Avaliação do teor de biomassa dos biofilmes formados pelas amostras 17 a 33

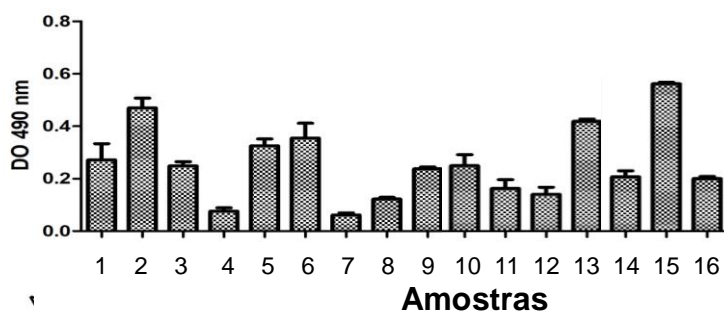


Fonte: Dados do Autor (2022)

3.3.3 Resultados obtidos com o teste de XTT

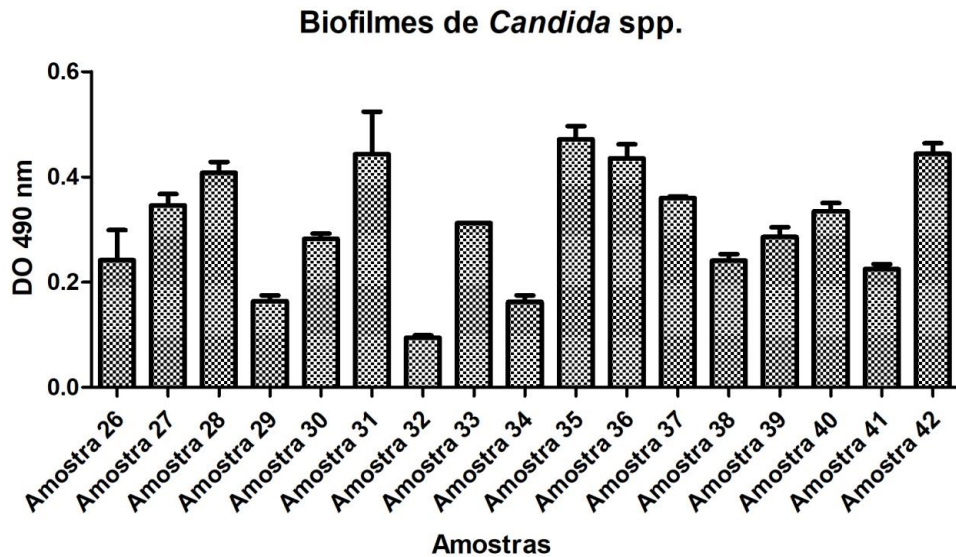
Esta análise revelou a quantidade de células metabolicamente ativas existentes nos biofilmes formados. Das 33 amostras analisadas, 8 (amostras 2, 13, 15, 19, 22, 26, 27, 33) apresentaram maior número de células metabolicamente ativas (densidade óptica maior que 0,4). Dentre estas 8 amostras, 75% são linhagens não-*albicans* de *Candida* spp., com destaque para a presença de *C. glabrata* e apenas 25% são linhagens de *C. albicans*. Entre os pacientes dos quais estas 8 amostras foram isoladas, 87,5% destes pacientes foram a óbito. Os resultados de avaliação da atividade metabólica podem ser observados nas Figuras 18 e 19.

Figura 18 - Avaliação do teor de células metabolicamente ativas nos biofilmes formados pelas amostras 1 a 16



Fonte: Dados do Autor (2022)

Figura 19 - Avaliação do teor de células metabolicamente ativas nos biofilmes formados pelas amostras 17 a 33.



Fonte: Dados do Autor (2022)

Dentre as amostras que apresentaram maiores índices de biomassa, apenas três destas também apresentaram índices elevados de atividade metabólica (amostras 13, 26 e 27). Neste sentido, ressalta-se que há amostras com índices menores de formação de biomassa, como é o caso da amostra 22, que formam biofilmes com baixo número de células, porém estas células apresentam elevada atividade metabólica, fato que pode de maneira direta ou indireta, interferir no desfecho final alcançado.

Candida albicans apresenta um impacto médico dependente de sua capacidade de formação de biofilmes. Estes são observados devido ao fato de que se instalam em dispositivos como cateteres e marcapassos, locais que fornecem condições para o crescimento do biofilme. Os biofilmes de *C. albicans*, em particular, são significativamente resistentes a terapias antifúngicas comuns, o que faz com que as infecções por biofilmes se transformem em um desafio clínico (NOBILE; JOHNSON, 2015).

De acordo com Thein; Samaranayake; Samaranayake (2007), existe uma diferença significativa entre a formação de biofilmes de *Candida* não-*albicans*, entre

os estados dinâmico e estático quando o cultivo é feito em ambiente aeróbico. Os dados obtidos revelam que a formação do biofilme é modulada por condições hidrodinâmicas e gradientes de oxigênio presentes no ambiente.

Conforme descrito por Atienza-Carrera *et al.* (2022), a capacidade de estabelecer biofilme é um fator de virulência por si só e deve ser avaliada como fator de risco no tratamento de pacientes com infecções sanguíneas por *Candida* spp.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo objetivou a análise do potencial associado à virulência de *Candida albicans* e espécies não-*albicans* de *Candida* spp. isoladas de pacientes criticamente enfermos sujeitos a eventos adversos relacionados à assistência.

Os 43 pacientes apresentaram positividade para cultura fúngica, sendo este um dos principais critérios para a seleção do paciente integrante desta pesquisa. Estes pacientes, durante o período de sua internação, foram submetidos a um ou mais eventos adversos relacionados à assistência, tais como utilização de ventilação mecânica (VM), cateter venoso central (CVC), cateter venoso periférico (CVP), sonda vesical de demora (SVD), utilização de substâncias vasoativas dentre outros.

Ressalta-se que do total de 43 amostras, 23 foram identificadas, fenotipicamente, como pertencentes à espécie *C. albicans* e 20 destas, como espécies não-*albicans* do gênero *Candida*. Deste total, 33 puderam ser identificadas por MALDI-TOF, sendo que 51,5% são *C. albicans* e 48,5% são espécies não-*albicans* de *Candida* spp.

As 33 amostras foram avaliadas quanto à sensibilidade antifúngica e observou-se uma relação direta com a sensibilidade à Anfotericina B e situações de baixa sensibilidade aos fármacos Itraconazol seguido de Fluconazol, inclusive com situações de resistência. Todas estas amostras apresentaram a capacidade de formação de biofilmes sendo que 24% dos isolados formaram biofilmes com elevado potencial metabólico. Elevada formação de biofilme foi observada em 17 destas 33 amostras (51,5%) e, em 8 de 33, elevada atividade metabólica. Ambas características mostraram uma tendência de relação com alta mortalidade.

A relevância desta pesquisa assenta-se solidamente na necessidade cada vez maior de centros de saúde, tais como os hospitais, que lidam com pacientes criticamente enfermos, conhecerem obrigatoriamente sua comunidade fúngica e

seus perfis de sensibilidade a antifúngicos; bem como o percentual de formação de biofilmes, os quais podem influenciar negativamente na capacidade de resolução dos processos infecciosos, na ação dos antifúngicos então utilizados e em sua correlação com o eventual e inevitável evento adverso relacionado à assistência.

REFERÊNCIAS

ATIENCIA-CARRERA, María Belén *et al.* Prevalence of biofilms in *Candida* spp. bloodstream infections: A meta-analysis. **PLoS One**, v.17, n. 2, e0263522, 2022.

BARBEDO, Leonardo S.; SGARBI, Diana. B. G. Candidíase. **DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010

BARBOSA, Kevin Haley *et al.* Impacto do MALDI-TOF no diagnóstico da Sepse: uma revisão integrativa. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.6, p. 58556-58574, 2021.

BRAGA-SILVA, Lys Adriana *et al.* Trailing end-point phenotype antibiotic-sensitive strains of *Candida albicans* produce different amounts of aspartyl peptidases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 8, p. 765-770, 2009.

CAGGIANO, Giuseppina *et al.* *Candida* bloodstream infections in Italy: changing epidemiology during 16 years of surveillance. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 256580, 2015.

CERNÁKOVÁ, Lucia *et al.* *Candida auris*: a quick review on identification, current treatments, and challenges. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4470, 2021.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M27-S4 reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Wayne, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline - second edition. CLSI document M44-A2**. Wayne, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M27-A3 reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Wayne, 2008.

COLOMBO, Arnaldo Lopes *et al.* Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, 2013.

COSTA, Milce *et al.* Correlation of in vitro itraconazole and fluconazole susceptibility with clinical outcome for patients with vulvovaginal candidiasis. **Mycopathologia**, v. 157, n. 1, p. 43-47, 2004.

DONLAN, Rodney M.; COSTERTON, J. William. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167–193, 2002.

FARIDI, Ashkan *et al.* Molecular discrimination and antifungal susceptibility profile of cryptic *Candida albicans* complex species isolated from patients in Iran. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 423-429, 2022.

FEKKAR, Arnaud *et al.* Hospital outbreak of fluconazole-resistant *Candida parapsilosis*: arguments for clonal transmission and long-term persistence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v., 65, n. 5, p. e02036-20, 2021.

FOSCHI, Claudio *et al.* Novel approaches for the taxonomic and metabolic characterization of lactobacilli: Integration of 16s rRNA gene sequencing with MALDI-TOF MS and 1h- NMR. **Plos One**, v. 12, n. 2, p. e0172483, 2017.

MATSUMOTO, Masaru *et al.* Strong antifungal activity of SS750, a new triazole derivative, is based on its selective binding affinity to cytochrome P450 of fungi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 308-314, 2002.

MENDES, Walter *et al.* The assessment of adverse events in hospitals in Brazil. **International Journal for Quality Health Care**, v. 21, n. 4, p.279-284, 2009.

NOBILE, Clarissa J.; JOHNSON, Alexander D. *Candida albicans* biofilms and human disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, p. 71-92, 2015.

NOLTE, Frederick S. *et al.* Isolation and characterization of fluconazole-and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 1, p.196-199, 1997.

PAPPAS, Peter G. *et al.* Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. 409-417, 2016.

PFALLER, Michael A. *et al.* Activities of fluconazole and voriconazole against 1,586 recent clinical isolates of *Candida* species determined by broth microdilution, disk diffusion, and Etest methods: report from the ARTEMIS Global Antifungal Susceptibility Program, 2001. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1440-1446, 2003.

PFALLER, Michael *et al.* Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004–2008. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 74, n. 4, p. 323-331, 2012.

RAMAGE, Gordon *et al.* Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2475–2479, 2001.

RODRIGUES, Dálity Keffelen de Barros *et al.* Antifungal susceptibility profile of *Candida* clinical isolates from 22 hospitals of São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** [online], v. 54, n. 9, e10928, 2021.

ROQUE, Keroulay Estebanez; MELO, Enirtes Caetano Prates. Adaptação dos critérios de avaliação de eventos adversos a medicamentos para uso em um hospital público no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 13, n. 4, p. 607-619, 2010.

RÖRIG, Kelly Cristina Ortolan; COLACITE, Jean; ABEGG, Maxwel Adriano. Produção de fatores de virulência *in vitro* por espécies patogênicas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 225-227, 2009.

SARDI, Janaina C. O. *et al.* *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10–24, 2013.

TAFF, Heather T. *et al.* Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. **Future Microbiology**, v. 8, n. 10, p. 1325 - 1337, 2013.

TAMURA, Nathalie Kira *et al.* Virulence factors for *Candida* spp. recovered from intravascular catheters and hospital workers hands. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 91-93, 2007.

THEIN, Zaw M; SAMARANAYAKE, Yuthika H.; SAMARANAYAKE, Lakshman P. *In vitro* biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. **Archives of Oral Biology**, v. 52, n. 8, p. 761-767, 2007.

TOBUDIC, Selma *et al.* Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. **Mycoses**, v. 55, n. 3, p. 199–204, 2012.

TODD, Betsy. Clinical Alert: *Candida Auris*. **The American Journal of Nursing**, v. 117, n. 4, p. 53-55, 2017.

VANDEBOSSCHE, Inge *et al.* Susceptibility testing of fluconazole by the NCCLS broth macrodilution method, E-test, and disk diffusion for application in the routine laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 918-921, 2002.

WILSON; Dustin T. *et al.* Role of isavuconazole in the treatment of invasive fungal infections. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 12, p. 1197-206.

ZONIOS, Dimitrios I.; BENNETT, John E. Update on azole antifungals. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 29, n. 2, p. 198-210, 2008.

APÊNDICE A - Coleta de informações relacionadas à entrada do paciente no hospital, tempo de internação e utilização de dispositivos, ventilação mecânica e sedação

ID	Iniciais	Idade	Sexo	Diag.Inicial	Temp. Internação (dias)	Dispositivos	VM	Uso de Sedação
Paciente 01	F.C.S.S	21	1	PANCREATITE MEDICAMENTOSA/ UVEITE /CETOACIDOSE DIABETICA	82	1	2	2
Paciente 02	A. D.A.R	45	1	HEPATOPATIA CRONICA	15	1	1	1
Paciente 03	E.C.F	82	1	PNEUMONIA	21	1	1	1
Paciente 04	G.B.D	59	2	INFECÇÃO DE CATETER SHILLEY	24	1	2	2
Paciente 05	C.C.O. S	75	1	SEPSE URINARIA/PULMONAR	13	1	2	2
Paciente 06	C.F.M	51	1	CA DE MAMA	7	1	2	2
Paciente 07	G.A.N	68	2	CHOQUE MISTO SEPSE DE FOCO URINARIO/DIABETES MELLITUS	22	1	1	1
Paciente 08	B.C.F	69	2	INSUFICIENCIA RENAL AGUDA/MIELOMA MULTIPLO	32	1	1	1
Paciente 09	L.F.S	46	2	DPOC EXACERBADO	5	1	1	1
Paciente 10	J.O.F	91	2	HDA/BRONCOASPIRAÇÃO/ PNEUMONIA	1	1	2	2
Paciente 11	S.B	77	2	PNEUMONIA	9	1	1	1
Paciente 12	A.D.A	40	2	DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRONICA	16	1	1	1
Paciente 13	J.C.P	74	2	SINDROME DE FOURNIER /SEPSE FOCO CUTANEO	9	1	2	2
Paciente 14	A.P	55	2	CHOQUE SEPTICO PULMONAR	127	1	1	1
Paciente 15	A.C.C	90	1	APENDICITE AGUDA/LAPAROTOMIA EXPLORADORA	22	1	1	1
Paciente 16	V.L.C	52	1	PO DRENAGEM DE ABCESSO VOLUMOSO HEPATICO A/E	39	1	1	1
Paciente 17	S.S	58	2	LEUCEMIA LINFOIDE/PANCITOPENIA	77	1	1	1
Paciente 18	M.L.F	51	1	INFECÇÃO DO TRATRO URINARIO/HIPOGLICEMIA	33	1	1	1
Paciente 19	M.A.O	68	2	PERFURAÇÃO DE ESOFAGO/LAPAROTOMIA+ RAFIA+JEJUNOSTOMIA SUBOCCLUSÃO INTESTINAL/PARALISIA FLÁCIDA AGUDA?	23	1	1	1
Paciente 20	J.M	89	1	PIELONEFRITE	37	1	1	1
Paciente 21	N.F.L	74	1	COVID 19	40	1	1	1
Paciente 22	J.P.F	28	1	INSUFICIENCIA RENAL AGUDA	4	1	2	2
Paciente 23	B.G.F	83	2	INSUFICIENCIA RENAL AGUDA	22	1	1	1
Paciente 24	C.M.R	70	1	SEPSE DE FOCO PULMONAR	47	1	1	1
Paciente 25	M.M.A	73	1	SEPSE URINARIA/ESTADO HIPEROSMOLAR NAO CETOTICO	41	1	1	1
Paciente 26	E.S.J	54	1	MIELOMA MULTIPLO/ITU	16	1	1	1
Paciente 27	M.A.S	66	1	INSUFICIENCIA RENAL CRONICA	20	1	1	1
Paciente 28	A.M.E	78	2	COVID 19	59	1	1	1
Paciente 29	N.F	76	1	COVID 19	9	1	1	1
Paciente 30	G.B.L	79	1	COVID 19	57	1	1	1
Paciente 31	O.R.O	73	2	COVID 19	18	1	1	1
Paciente 32	B.S.A	73	1	SEPSE FOCO URINARIO	16	1	2	2
Paciente 33	R.R.S	68	1	COVID 19	26	1	1	1
Paciente 34	N.A.L.P	72	1	COVID 19	18	1	1	1
Paciente 35	M.A.F.S	63	1	COVID 19	35	1	1	1
Paciente 36	I.I.C	40	1	COVID 19	12	1	1	1
Paciente 37	L.R.S	68	2	INSUFICIENCIA CARDIACA CONGESTIVA	27	1	1	1
Paciente 38	D.R.S	80	1	SEPSE FOCO URINARIO	6	1	2	2
Paciente 39	T.M.L	40	2	SEPSE FOCO URINARIO/CIRROSE HEPATICA	35	1	1	1
Paciente 40	C.F.J	67	2	TEP POS COVID	10	1	1	1
Paciente 41	P.C.S	56	2	COVID 19	22	1	1	1
Paciente 42	V.D.F	42	2	TCE GRAVE	81	1	1	1
Paciente 43	A.R.S	37	1	COVID 19	25	1	1	1

Legenda: ID: identificação; VM: ventilação mecânica

Legenda: ID: identificação; VM: ventilação mecânica; 1 e 2: codificação referenciada na Ficha do Paciente (ANEXO F)

Fonte: Prontuários que contemplaram os critérios de inclusão no estudo

APÊNDICE B - Coleta de informações relacionadas à utilização de dispositivos, à presença de culturas bacterianas e utilização de antibióticos antibacterianos

ID	IOT	TQT	CVC	CVP	Uso de Droga vasoativa	SVD	Presença de Cultura positiva para bactéria	Bactéria (Gram positiva)	Bactéria (Gram negativa)	MR	Uso de ATB	Classe ATB
Paciente 01	2	2	1	1	2	1	1	2	1	1	1	11
Paciente 02	1	2	1	2	1	1	2	2	2	2	1	2
Paciente 03	1	2	1	2	1	1	1	1	1	2	1	14
Paciente 04	2	2	1	2	2	2	1	1	2	2	2	15
Paciente 05	2	2	2	1	2	1	1	2	1	2	1	1
Paciente 06	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	1	2
Paciente 07	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	3
Paciente 08	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	11
Paciente 09	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	6
Paciente 10	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	15
Paciente 11	1	2	1	2	1	1	1	1	2	2	1	13
Paciente 12	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2
Paciente 13	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2
Paciente 14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11
Paciente 15	1	2	1	2	1	1	1	1	2	2	1	2
Paciente 16	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11
Paciente 17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11
Paciente 18	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	11
Paciente 19	1	1	1	2	1	1	1	1	2	2	1	2
Paciente 20	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	11
Paciente 21	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	11
Paciente 22	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	1	2
Paciente 23	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2
Paciente 24	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	11
Paciente 25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11
Paciente 26	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2
Paciente 27	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	11
Paciente 28	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	11
Paciente 29	1	2	1	2	1	1	2	2	2	2	1	2
Paciente 30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11
Paciente 31	1	2	1	2	1	1	2	2	2	2	1	2
Paciente 32	2	2	1	1	2	1	2	2	2	2	1	3
Paciente 33	1	1	1	2	1	1	2	2	2	2	1	2
Paciente 34	1	2	1	2	1	1	2	2	2	2	1	2
Paciente 35	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	4
Paciente 36	1	2	1	2	1	1	1	1	2	2	1	2
Paciente 37	1	2	1	2	1	1	1	1	1	2	1	2
Paciente 38	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	1	2
Paciente 39	1	2	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1
Paciente 40	1	2	1	2	1	1	1	1	2	2	1	2
Paciente 41	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11
Paciente 42	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
Paciente 43	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1

Legenda:
 IOT: intubação orotraqueal; TQT: traqueostomia; CVC: cateter venoso central; CVP: cateter venoso periférico; SVD: sonda vesical de demora; MR: microrganismo multiresistente.

Legenda: ID: identificação; VM: ventilação mecânica; 1 e 2: codificação referenciada na Ficha do Paciente (ANEXO F)

Fonte: Prontuários que contemplaram os critérios de inclusão no estudo

APÊNDICE C - Coleta de informações: presença de cultura fúngica positiva nos pacientes, antifúngicos utilizados, infecção comunitária e/ou relacionada à assistência em saúde, foco da infecção e desfecho final

ID	Iniciais	Presença de cultura positiva para Fungo	Sítio de Coleta	Uso de ATF	ATF	Classe ATF	INFECÇÃO COMUNITÁRIA	INFECÇÃO RELACIONADA ASSISTÊNCIA A SAÚDE (IRAS)	Foco Infeccioso	Diagnóstico Final	Desfecho
Paciente 01	F.C.S.	1	2	1	1	2	2	1	7	NECROSECTOMIA PANCREÁTICA/PERITONITE	2
Paciente 02	A.D.A.R.	1	1	1	3	3	1	2	3	INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA/CHOQUE SEPTICO	1
Paciente 03	E.C.F.	1	1	1	1	2	2	1	4	PULMONAR/PNEUMONIA	1
Paciente 04	G.B.D.	1	2	1	1	2	2	1	2	INFECÇÃO DE CÂTER SHILLEY	2
Paciente 05	C.C.O.S.	1	1	1	3	3	1	2	3	URINÁRIA/PULMONAR RESOLVIDA	2
Paciente 06	C.F.M.	1	1	2	12	6	1	2	3	CA DE MAMA METÁSTICO	1
Paciente 07	G.A.N.	1	3	1	1	2	1	2	4	IAM	2
Paciente 08	B.C.F.	1	5	1	1	2	2	1	9	INSUFICIÊNCIA RESPIRATORIA/BRONCOPNEUMONIA	1
Paciente 09	L.F.S.	1	1	1	1	2	2	1	4	INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA/MIELOMA MULTÍPLO	1
Paciente 10	J.O.F.	1	1	2	12	6	1	2	4	DNOC/CHOQUE CARDIOGÊNICO	1
Paciente 11	S.B.	1	3	2	12	6	2	1	4	SEPSE FOCO PULMONAR/PNEUMONIA	1
Paciente 12	A.D.A.	1	6	2	12	6	1	2	7	CHOQUE SEPTICO/ABDOMEN AGUDO PERFURATIVO	2
Paciente 13	J.C.P.	1	4	1	1	1	1	2	4	PNEUMONIA FUNGICA	2
Paciente 14	A.P.	1	2	1	1	2	2	1	9	SÍNDROME DE FOLNIER/SEPSE FOCO CUTÂNEO	2
Paciente 15	A.C.C.	1	3	1	1	2	2	1	4	SEPTICEMIA/INFECÇÃO PULMONAR	1
Paciente 16	V.L.C.	1	3	1	1	2	2	1	7	SEPSE FOCO ABDOMINAL	1
Paciente 17	S.S.J.	1	1	1	1	2	2	1	7	SEPSE FOCO ABDOMINAL	2
Paciente 18	M.L.F.	1	1	1	1	2	2	1	4	SEPSE FOCO PULMONAR/HIPOKEMIA	1
Paciente 19	M.A.O.	1	1	1	1	2	2	1	3	SEPSE URINÁRIA/CISTITE	1
Paciente 20	J.M.	1	2	1	1	2	2	1	7	CHOQUE SEPTICO FOCO ABDOMINAL	1
Paciente 21	N.F.L.	1	1	1	1	2	2	1	4	CHOQUE SEPTICO FOCO PULMONAR	1
Paciente 22	J.P.F.	1	1	2	12	6	1	2	3	PIELONEFRITE	2
Paciente 23	B.G.F.	1	1	2	12	6	2	1	4	COVID 19/INSUFICIÊNCIA RENAL	1
Paciente 24	C.M.R.	1	1	1	1	2	2	1	4	INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDIZADA/CEC	1
Paciente 25	M.M.A.	1	3	1	1	2	2	1	4	SEPSE DE FOCO PULMONAR TRATADA	2
Paciente 26	E.S.J.	1	1	1	1	2	1	2	3	SEPSE URINÁRIA/ESTADO HIPEROSMOLAR NÃO CETOIC	2
Paciente 27	M.A.S.	1	1	1	2	1	2	1	1	SEPSE PULMONAR/MIELOMA MULTÍPLO	1
Paciente 28	A.M.E.	1	3	1	1	2	2	1	4	BRONCOPNEUMONIA NOSOCOMIAL	1
Paciente 29	N.F.	1	1	2	12	6	1	2	13	COVID 19/INSUFICIÊNCIA RESPIRATORIA AGUDA	1
Paciente 30	G.B.L.	1	1	1	1	2	2	1	4	POS COVID 19/SEPSE PULMONAR E URINÁRIA	2
Paciente 31	O.R.O.	1	1	1	1	2	1	2	13	INFECÇÃO POR COVID 19/ PNEUMONIA	1
Paciente 32	B.S.A.	1	1	1	1	2	1	2	3	SEPSE FOCO URINÁRIO	2
Paciente 33	R.R.S.	1	1	1	1	2	1	2	13	COVID 19/SÍNDROME DA ANGIUSTIA RESPIRATORIA AGUDA	1
Paciente 34	N.A.L.P.	1	3	1	1	2	2	1	13	COVID 19/PNEUMONIA VÍRAL	1
Paciente 35	M.A.F.S.	1	1	1	1	2	2	1	13	COVID 19/PNEUMONIA VÍRAL	1
Paciente 36	I.I.C.	1	1	1	1	2	1	2	13	COVID 19/PNEUMONIA VÍRAL	1
Paciente 37	L.R.S.	1	2	2	12	6	2	1	2	CHOQUE CARDIOGÊNICO/INSUFICIÊNCIA CARDÍACA CONGESTIVA	1
Paciente 38	D.R.S.	1	1	1	1	2	1	2	3	SEPSE FOCO URINÁRIO	2
Paciente 39	T.M.L.	1	1	1	1	2	2	1	3	SEPSE FOCO URINÁRIO/CIRROSE HEPÁTICA	1
Paciente 40	C.F.J.	1	3	1	1	2	2	1	4	INSUFICIÊNCIA RESPIRATORIA/FIBROSE	1
Paciente 41	P.C.S.	1	3	1	1	2	2	1	4	PULMONAR COVID 19/PNEUMONIA VÍRAL	1
Paciente 42	V.D.F.	1	2	1	1	2	2	1	4	TCE GRAVE/PNEUMONIA	2
Paciente 43	A.R.S.	1	1	1	1	2	2	1	4	PNEUMONIA ASSOCIADA A VENTILAÇÃO MECÂNICA	2

Legenda: ATF: antifúngico

Legenda: ID: identificação; VM: ventilação mecânica; 1 e 2: codificação referenciada na Ficha do Paciente (ANEXO F)

Fonte: Prontuários que contemplaram os critérios de inclusão no estudo

ANEXO A – Autorização para a utilização das amostras da IHSCPC



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Alfenas/MG - CEP 37130-900
 Fone: (35) 3299-1000 Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 18 de março de 2020

Exmo Sr. Dr. Alberto Silas Volponi – D.D. Diretor Técnico IHSCPC
 Exmo Sr. Ricardo Sá – D.D. Superintendente IHSCPC

Vimos, através desta, solicitar sua autorização para a utilização de amostras fúngicas coletadas na **Irmandade do Hospital da Santa Casa de Poços de Caldas (IHSCPC)** para o desenvolvimento de pesquisa de mestrado do aluno André Francisco dos Reis matriculado no programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

A pesquisa é intitulada: "**Análise diferencial da capacidade de formação de biofilmes e da sensibilidade antifúngica de células planctônicas e biofilmes de *Candida albicans* e espécies não-*albicans* de *Candida* spp. isoladas de pacientes criticamente enfermos sujeitos a eventos adversos relacionados à assistência**".

O projeto será encaminhado para aprovação ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFAL-MG

As amostras obtidas serão utilizadas com a finalidade de pesquisa e os dados resultantes serão divulgados no meio científico desde que sejam preservadas as identidades do paciente e do hospital.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Amanda Lateralci Tranches Dias
 Orientadora/ Programa de Pós graduação em Ciências Biológicas
 Universidade Federal de Alfenas-UNIFAL-MG

De acordo a ciente:

Dr. Alberto Silas Volponi
 Diretor Técnico do Hospital da Santa Casa de Poços de Caldas
 Poços de Caldas, MG

Im. do Hosp. da Santa Casa
 de Poços de Caldas
 Dr. Alberto Silas Volponi
 Diretor Técnico
 CPF 320.189.169-02
 CRM/MG 24.7108

ANEXO B- Declaração do Comitê de ética da IHSCPC



Poços de Caldas, 05 de agosto de 2019


Declaração Comitê de Ética Médica

Ilma. Profa. Dra. Amanda Latercia Tranches Dias
D.D. Orientadora/Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Universidade Federal de Alfenas/MG.

Ilma. Profa. Dra. Amanda

Venho por meio desta muito respeitosamente, conforme legislação médica em vigor e Código de Ética Médica **autorizar**, após análise do vosso pedido: do envio de amostras de material biológico(culturas obtidas de amostras de fungos) de pacientes internados na Santa Casa de Poços de Caldas, pelo seu orientando: aluno **André Francisco dos Reis**, também médico pertencente ao Corpo Clínico deste hospital, para atender as demandas do seu projeto de pesquisa intitulado: *"Análise diferencial da capacidade de formação de Biofilmes e da sensibilidade antifúngica de células planctônicas e Biofilmes de Candida albicans e espécies não albicans de Candida spp. soladas de pacientes criticamente enfermos sujeito a eventos adversos relacionados à assistência."*

Atenciosamente


Dra Cibele Angélica de Souza Spina
CRM MG 36594 CRM SP 100930
Presidente da Comissão de Ética Médica
Irmãdade do Hospital da Santa Casa de Poços de Caldas – IHSCPC

Praça Francisco Escobar, s/n - Centro, Poços de Caldas - MG, 37701-027
Tel.: (035) 3729 6000 – Fax: (035) 3729 6001
www.santacasa.pc.com.br

Fonte: Autor (2022)

ANEXO C

TERMO DE SOLICITAÇÃO DE DISPENSA DO TCLE (TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO)

Eu, André Francisco dos Reis (Mestrando/ CPF: 609.930.226-34), pesquisador responsável pela pesquisa "**Análise diferencial da capacidade de formação de biofilmes e da sensibilidade antifúngica de células planctônicas e sésseis de *Candida albicans* e espécies não-*albicans* de *Candida* isoladas de pacientes criticamente enfermos sujeitos a eventos adversos relacionados à assistência**" sob orientação da profa Amanda L. T. Dias (CPF: 044.827.266-05), reafirmo, conforme as Resoluções CNS 466/2012 e 510/2016 e suas complementares, os princípios éticos de pesquisas que envolvam seres humanos relacionados à confidencialidade de informações, privacidade, sigilo e anonimato, proteção da identidade dos participantes e garantia de dar esclarecimentos sobre a pesquisa. Porém, dadas as características da presente pesquisa e de seus participantes, resulta inviável o Registro de Consentimento ou do Assentimento Livre e Esclarecido. Por isso, solicito perante este Comitê de Ética em Pesquisa a dispensa da utilização do TCLE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, o que se justifica por inviabilidade de acesso aos participantes. Os dados da pesquisa supracitada serão obtidos por meio de análises de amostras do fungo *Candida* spp. isoladas de pacientes que estiveram internados nos setores de emergência e de terapia intensiva da Irmandade do Hospital da Santa Casa de Poços de Caldas (IHSCPC) e sujeitos a incidentes que possam estar relacionados ao estabelecimento de infecção fúngica. As amostras deverão ser de pacientes maiores de 18 anos e serão avaliadas quanto à capacidade de formação de biofilmes e quanto à sensibilidade aos antifúngicos utilizados em ambientes hospitalares, tais como anfotericina B, fluconazol e Caspofungina, tendo sido esse método descrito detalhadamente no projeto de pesquisa submetido ao CEP e, no caso de dados secundários, serão autorizados em formulário próprio. Afirmando que a obtenção desses dados, com a dispensa do TCLE solicitada, não colocará em risco a integridade física e emocional dos participantes. Afirmando ainda que garantirei a confidencialidade dos dados, bem como do acesso aos envolvidos na pesquisa. Declaro ainda que tenho conhecimento de que, conforme a Resolução CNS 510/2016, a dispensa do registro de consentimento ou de assentimento não isenta o pesquisador do processo de consentimento ou de assentimento, salvo nos casos previstos nesta Resolução.

Alfenas, 9 de Novembro de 2020

André Francisco dos Reis (CPF: 609.930.226-34):



Dr. André Francisco dos Reis
M é d i c o
CRM: ME 32249

Amanda Latércia Tranches Dias (CPF:044.827.266-05):



ANEXO D - Termo de compromisso para desenvolvimento de protocolos de pesquisa em tempos de pandemia

segunda-feira, 9 de novembro de 2020

TERMO DE COMPROMISSO PARA DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLOS DE PESQUISA NO PERÍODO DA PANDEMIA DO CORONAVÍRUS (COVID-19)

Eu ANDRÉ FRANCISCO DOS REIS, CPF 609.930.226-34 e RG M-3 840.386, pesquisador responsável pelo projeto de pesquisa intitulado **Análise diferencial da capacidade de formação de biofilmes e da sensibilidade antifúngica de células planctônicas e sésseis de *Candida albicans* e espécies não *albicans* de *Candida* isoladas de pacientes criticamente enfermos sujeitos a eventos adversos relacionados à assistência,** submetido ao CEP/CONEP sob número CAAE 352924/2021/0005144. Estou ciente enquanto à necessidade do cuidado à integridade física e emocional de pesquisadores e participantes da pesquisa, conforme diretrizes do Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e da própria CONEP, como descrito no Comunicado CONEP de 09/05/2020. Dessa forma, para a execução dos procedimentos de pesquisa presenciais, planejados para serem realizados no período de pandemia, serão adotadas medidas sanitárias para a prevenção e gerenciamento de todas as atividades de pesquisa, garantindo-se as ações primordiais à saúde, minimizando prejuízos e potenciais riscos, além de prover cuidado e preservar a integridade e assistência dos participantes e da equipe de pesquisa. De maneira específica no presente protocolo, serão tomadas as seguintes medidas minimizadoras de riscos: entrevistas agendadas em locais ventilados, uso de máscaras/ EPIs, distanciamento físico de 1,5 m entre pesquisador e participante, uso de desinfecção com álcool gel entre cada procedimento, entre outros. Se mesmo sendo tomadas todas as medidas descritas, resultar necessária a suspensão, interrupção ou o cancelamento da pesquisa, em decorrência dos riscos imprevisíveis aos participantes da pesquisa, por causas diretas ou indiretas, submeterei imediatamente notificação para apreciação do Sistema CEP/Conep.


André Francisco dos Reis

Dr. André Francisco dos Reis
Médico
CRM - MG 32249


Amanda Latercia Tranches Dias

ANEXO E - Critérios de rastreamento adotados para a análise dos prontuários dos pacientes maiores de 18 anos, criticamente enfermos e que estiveram internados nos setores hospitalares de alta complexidade de um hospital terciário localizado na região sul do estado de Minas Gerais

FICHA DE DADOS DO PACIENTE

PACIENTE:

ID:

Idade: Sexo: F M Diagnóstico Inicial:

Tempo de Permanência na instituição:

INFORMAÇÕES:

Uso de Dispositivo: Sim Não

Uso de Ventilador Mecânico (VM): Sim Não

IOT: Sim Não TQT: Sim Não

Uso de Sedação: Sim Não

Uso de Cateter venoso central (CVC): Sim Não

Uso de Cateter Periférico (CVP): Sim Não

Uso de droga vasoativa: Sim Não

Uso de Sonda vesical de demora (SVD): Sim Não

Presença de cultura positiva para bactéria: Sim Não

Espécie:

Gram da Bactéria Positiva: Sim Não

Gram da Bactéria Negativa: Sim Não

Presença de Microorganismo multirresistente: Sim Não

Uso de antibiótico: Sim Não

Qual: Classe:

CLASSE DE ANTIMICROBIANO

1. () Penicilinas 2. () Cefalosporinas 3. () Carbapenêmicos 4. () Aminoglicosídeos

5. () Macrolídeos 6. () Quinolonas 7. () Tetraciclina 8. () Glicilciclina

9. () Anfencóis 10. () Glicopeptídeos 11. () Polimixinas 12. () Rifamicinas

13. () Oxazolidinonas 14. () Sulfonamidas 15. () N.d.a

Presença de cultura positiva para Fungo: Sim Não

SITIO DE COLETA

- 1() Urocultura 2() Hemocultura 3() Secreção Traqueal 4() Lavado Bronco Alveolar
5() Lesão MIE 6() Líquido Intraperitoneal

ESPECIE DE FUNGO:

- 1.() *C. albicans* 2.() *C. não-albicans* 3.() *C. famata*
4.() *C. krusei* 5.() *C. tropicalis* 6.() *C. parapsilosis*
7.() *Saccharomyces cerevisiae*

Uso de antifúngico: 1() Sim 2() Não Qual:

- 1.() Fluconazol 2.() Anfotericina B 3.() Anidulafungina 4.() Itraconazol
5.() Miconazol 6.() Cetoconazol 7.() Voriconazol 8.() Caspofungina
9.() Micafungina 10.() Terbinafina 11.() Griseofulvina 12.() N.d.a

CLASSE DE ANTIFUNGICOS

- 1.() Anfotericina B 2.() Imidazólicos 3.() Equinocandinas 4.() Terbinafina
5.() Griseofulvina 6.() N.d.a

Perfil de sensibilidade do antifúngico: 1() Sim 2() Não

FOCO INFECCIOSO:

1.() Sem foco definido	2.() Infecção de corrente sanguínea	3.() Infecção urinária
4.() Pneumonia/PAV óssea/articular	5.() Infecção de prótese	6.() Infecção
7.() Infecção abdominal cutânea	8.() Infecção sítio cirúrgico	9.() Pele e partes moles / cutânea
10.() Endocardite	11.() Meningite	12.() Infecção respiratória
13.() Infecção viral / COVID	14.() Outras infecções:	

Infecção Comunitária: 1() Sim 2() Não

Infecção relacionada à assistência a saúde: 1() Sim 2() Não

Diagnóstico Final:

DESFECHO: 1() Óbito 2() Alta

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS GERAIS

A segurança do paciente é uma séria preocupação global de saúde pública, segundo a OMS. De acordo com estimativas consideradas conservadoras, os dados mais recentes mostram que o dano ao paciente é uma das causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, com índices comparáveis ao de doenças como tuberculose e malária. Mundialmente, milhões de pacientes são prejudicados por cuidados de saúde não seguros, resultando em milhões de mortes por ano em países de baixa e média rendas. Considera-se que a maior parte desses óbitos seja evitável. Há neste contexto, consideráveis impactos no âmbito pessoal, social e econômico. Em 2019, a OMS solicitou ações urgentes de países e parceiros para reduzir danos aos pacientes na área de saúde. A segurança ao paciente envolve a redução do risco de danos desnecessários associados à assistência em saúde até um mínimo aceitável (OMS, 2021). Neste contexto, ressalta-se a importância do conhecimento dos principais agentes fúngicos presentes em ambientes hospitalares, de seus respectivos potenciais associados à virulência e se há correlação destes com a exposição ou não dos pacientes a eventos adversos. Dentre as centenas de espécies fúngicas descritas, leveduras do gênero *Candida* são os maiores agentes de infecção hospitalar representando um desafio para a sobrevivência de pacientes com doenças graves e em período pós-operatório. Muitas destas espécies são capazes de formar biofilmes e, conseqüentemente, podem ser refratárias à terapia antifúngica instituída.

REFERÊNCIAS

- ADAM, Berit; BAILLIE, George S.; DOUGLAS, L. Julia. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 344–349, 2002.
- BONE, Roger C. *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **American College of Chest Physicians**, v.101, n. 6, p. 1644-1655,1992.
- CAGGIANO, Giuseppina *et al.* *Candida* bloodstream infections in Italy: changing epidemiology during 16 years of surveillance. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 256580, 2015.
- CALVO, Belinda *et al.* First report of *Candida auris* in America: clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia. **Journal of Infection**, v. 73, n. 4, p. 369-374, 2016.
- CANUTO, Mar Masiá; RODERO, Félix Gutiérrez. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 9, p. 550-563, 2002.
- CASSIANI, Silvia Helena de Bortoli; GIMENES, Fernanda Raphael Escobar; MONZANI, Aline Aparecida Silva. O uso da tecnologia para a segurança do paciente. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v.11, n.2, p.413-417, 2009.
- CHANDRA, Jyotsna *et al.* Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5385–5394, 2001.
- COLOMBO, Arnaldo Lopes *et al.* Prospective observational study of candidemia in Sao Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, n. 5, p. 570–576, 2007.
- COLOMBO, Arnaldo Lopes; GUIMARÃES, Thaís. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599– 607, 2003.
- DE MELO, Isadora Souza Ferraz *et al.* *Candida* sp, uma breve revisão bibliográfica. **Recisatec - Revista Científica Saúde e Tecnologia**, v. 2, n. 5, p. E25129-e25129, 2022.
- DE TORO, María *et al.* Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 3, p. 418-424, 2011.
- DONLAN, Rodney M.; COSTERTON, J. William. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167–193, 2002.

- FERREIRA, Andressa Martins Dias *et al.* Percepções dos profissionais de enfermagem acerca do uso da informatização para segurança do paciente. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 40, p.e20180140, 2019.
- FLÓREZ, Carmen *et al.* In vitro susceptibilities of bloodstream isolates of *Candida* spp.: results from a multicenter active surveillance program in Andalusia. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 9, p. 518-22, 2009.
- FRANCOLINI, Iolanda; DONELLI, Gianfranco. Prevention and control of biofilm-based medical- device-related infections. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 227–238, 2010.
- INSTITUTO LATINO-AMERICANO PARA ESTUDOS DA SEPSE. Conselho Federal de Medicina. **Sepse: um problema de saúde pública**. Brasília, 2015. 91 p.
- KLEIN, Bruce S.; TEBBETS, Brad. Dimorphism, and virulence in fungi. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 314–319, 2007.
- KRCMERY, Vladimír; BARNES, A.J. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **The Journal of Hospital Infection**, v. 50, n. 4, p. 243-260, 2002.
- KRETZER, Sara Letícia. **Infecções relacionadas à assistência à saúde em hospital universitário de Santa Catarina: perfil epidemiológico de candidemia no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2013**. 2015. 120 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2015.
- LAN, Lisa; XU, Jianping. Multiple gene genealogical analyses suggest divergence and recent clonal dispersal in the opportunistic human pathogen *Candida guilliermondii*. **Microbiology**, v. 152, n. 5, p. 1539-1549, 2006.
- LOBO, Suzana Margareth *et al.* Mortalidade por sepse no Brasil em um cenário real: projeto UTIs Brasileiras. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 31, n. 1, p. 1-4, 2019.
- MALUCHE, Maria Eduarda; SANTOS, Jairo Ivo dos. *Candida* sp. e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 1, p. 65-67, 2008.
- MARCOS-ZAMBRANO, Laura Judith *et al.* *Candida guilliermondii* complex is characterized by high antifungal resistance but low mortality in 22 cases of candidemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 7, p. e00099-17, 2017.
- MATSUMOTO, Masaru *et al.* Strong antifungal activity of SS750, a new triazole derivative, is based on its selective binding affinity to cytochrome P450 of fungi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 308-314, 2002.

MENDIRATTA, D. K. *et al.* Candida colonization in preterm babies admitted to neonatal intensive care unit in the rural setting. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 263-267, 2006.

NOLTE, Frederick S. *et al.* Isolation and characterization of fluconazole-and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 1, p.196-199, 1997.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Plano de ação global para a segurança do paciente 2021-2030**: em busca da eliminação dos danos evitáveis nos cuidados de saúde. Genebra, 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Qualidade da assistência: segurança do paciente. *In*: CONFERÊNCIA SANITÁRIA PAN- AMERICANA, 26. SESSÃO DO COMITÊ REGIONAL, 54., 2002, Washington. **Anais [...]** Washington: Organização pan-americana da saúde, 2002. p. 11-12, 23-27.

PAPPAS, Peter G. *et al.* Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. 409-417, 2016.

PAPPAS, Peter G. *et al.* Guidelines for treatment of candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 2, p. 161-189, 2004.

PFALLER, Michael A.; DIEKEMA, Daniel J. Epidemiology of invasive mycoses in North America. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 1–53, 2010.

PFALLER, Michael A.; DIEKEMA, Daniel J.; SHEEHAN, Daniel J. Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 435-447, 2006.

REEDY, Jennifer L.; FLOYD, Anna M.; HEITMAN, Joseph. Mechanistic plasticity of sexual reproduction and meiosis in the *Candida* pathogenic species complex. **Current Biology**, v.19, n. 11, p. 891-899, 2009.

RIVERS, Emanuel *et al.* Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 19, p. 1368-1377, 2001.

ROMEO, Orazio; CRISEO, Giuseppe. Molecular epidemiology of *Candida albicans* and its closely related yeasts *Candida dubliniensis* and *Candida africana*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 212-214, 2009.

ROQUE, Keroulay Estebanez; MELO, Enirtes Caetano Prates. Adaptação dos critérios de avaliação de eventos adversos a medicamentos para uso em um hospital público no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 13, n. 4, p. 607-619, 2010.

RÖRIG, Kelly Cristina Ortolan; COLACITE, Jean; ABEGG, Maxwel Adriano. Produção de fatores de virulência *in vitro* por espécies patogênicas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 225-227, 2009.

SILVA, Aline Teixeira *et al.* Nursing care and the focus on patient safety in the Brazilian scenario. **Saúde Debate**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 111, p. 292-301, 2016.

SINGER, Mervyn *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 801-810, 2016.

SOUSA, Maiana Regina Gomes de *et al.* Eventos adversos em hemodiálise: relatos de profissionais de enfermagem. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 47, n. 1, p. 76-83, 2013.

TAFF, Heather T. *et al.* Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. **Future Microbiology**, v. 8, n. 10, p. 1325 - 1337, 2013.

TALAPKO, Jasminka *et al.* *Candida albicans* - the virulence factors and clinical manifestations of infection. **Journal of Fungi (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 2, p. 79, 2021.

TAMURA, Nathalie Kira *et al.* Virulence factors for *Candida* spp. recovered from intravascular catheters and hospital workers hands. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 91-93, 2007.

TOBUDIC, Selma *et al.* Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. **Mycoses**, v. 55, n. 3, p. 199–204, 2012.

TODD, Betsy. Clinical Alert: *Candida Auris*. **The American Journal of Nursing**, v. 117, n. 4, p. 53-55, 2017.