

REGINA TEIXEIRA BARBIERI RAMOS

**Estudo sentinela: monitoramento da colonização fúngica de mucosa oral em crianças
internadas em Hospital Público, São Paulo**

São Paulo

2023

REGINA TEIXEIRA BARBIERI RAMOS

Estudo sentinela: monitoramento da colonização fúngica de mucosa oral em crianças internadas em Hospital Público, São Paulo

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Diagnóstico Bucal, Radiologia Odontológica e Imaginologia) para obter o título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Claudete Rodrigues Paula

São Paulo

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Ramos, Regina Teixeira Barbieri.

Estudo sentinela: monitoramento da colonização fúngica de mucosa oral em crianças internadas em Hospital Público, São Paulo / Regina Teixeira Barbieri Ramos; orientadora Claudete Rodrigues Paula -- São Paulo, 2023.

127 p.: fig.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração: Diagnóstico Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Candidemia. 2. Crianças hospitalizadas. 3. Mucosa oral. 4. Candidíase oral. 5. Colonização oral. I. Ramos, Regina Teixeira Barbieri. II. Título.

Fábio Jastwebski – Bibliotecário - CRB8/5280

Ramos RTB. Estudo sentinela: monitoramento da colonização fúngica de mucosa oral em crianças internadas em Hospital Público, São Paulo. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 10/05/2023

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Carina Domaneschi

Instituição: FOUSP

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Luciana da Silva Ruiz Menezes

Instituição: Instituto Adolfo Lutz/ Bauru

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Debora Moreira

Instituição: Faculdade de Mauá

Julgamento: Aprovada

DEUS

Tenha fé em si mesmo, porque Deus habita dentro de você.

Portanto, ter fé em si mesmo é ter fé em Deus.

*Tenha confiança em suas capacidades, e caminhe sem temer os
obstáculos.*

Você pode vencer!

Você vai vencer!

*Corresponda à confiança que Deus depositou em você, quando lhe
entregou as capacidades de que dispõe, para que você a desenvolvesse
e pusesse em prática.*

(Minutos de Sabedoria)

AOS MEUS PAIS

*Maria José de Lourdes Teixeira Barbieri e António Carlos Barbieri,
por todo amor, dedicação, carinho, sabedoria, apoio, incentivo e por
sempre serem meu porto seguro, por estarem presentes em todos os
momentos de minha vida!
Sem vocês eu não seria nada!*

AO MEU MARIDO

*Syllas dos Passos Ramos, por todo amor, carinho, paciência,
perseverança, que sempre confiou em minha capacidade, me
incentivou e deu todo apoio para eu poder me dedicar a esse trabalho.*

AOS MEUS FILHOS

*Gabriel Barbieri Ramos e Julia Barbieri Ramos, são a razão de minha
vida, que me dão forças, energias, muito amor, alegrias, que me
ensinam
muito todos os dias.*

A minha querida orientadora

Claudete Rodrigues Paula

Que desde o princípio, me recebeu com todo carinho e confiança.

Por toda dedicação, ensinamentos, paciência e generosidade. Sempre empenhada em me proporcionar o melhor dos seus conhecimentos.

Aprendi demais com a minha Mestre, que é uma pessoa magnânima, sempre pronta a ajudar a todos.

Por ser além de tudo, uma amiga muito especial em minha vida.

Para sempre, minha mestra!

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo e especialmente a Faculdade de Odontologia da USP e ao Departamento de Diagnóstico Bucal, Radiologia Odontológica e Imaginologia, pela oportunidade da realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cláudio Costa, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Bucal, Radiologia Odontológica e Imaginologia, por toda atenção, esclarecimentos e apoio.

Ao Hospital Infantil Darcy Vargas por conceder a realização das coletas em pacientes internados. Aos pacientes, que permitiram a realização das coletas. A todos os funcionários desse hospital, especialmente a Shirley Nakano, diretora do laboratório, que me recebeu com muito carinho, deu todo o apoio e atenção para realização das coletas, manipulação e armazenamento das mesmas. Ao enfermeiro Cirilo Cesar Naozuka Simões, que me acompanhou nas primeiras coletas e me deu todo apoio necessário. Ao Dr. José Alberto Marzliak, dentista responsável pelos pacientes do hospital, que me acompanhou e me ajudou na realização das coletas. As enfermeiras e médicos da UTI e do Setor de internação de oncologia, em especial ao Dr. Marcelo Otsuka, que desde o início me apoiou e me aconselhou com relação aos pacientes. A Dra. Mariana Volpe Arnoni, por me ajudar com as informações dos pacientes.

À Controlbio – Assessoria Técnica Microbiológica S/S Ltda, especialmente a Dra. Maria José Silveira, que foi essencial para realização prática desse trabalho, me recebeu com todo carinho em seu laboratório, tive toda atenção necessária, ensinamentos, me proporcionou a identificação das minhas amostras pela metodologia Maldi-Tof. Agradeço a todos os profissionais do laboratório, especialmente a Paula de Maio Trezza (chefe do laboratório), a Débora de Maio Trezza (supervisora do laboratório), Érica Dentello Moreira (supervisora do laboratório), Luciana Cardoso Santos (analista do laboratório), Sueli de Oliveira Santos (apoio técnico), Juliano Ciasca Giaretta (gerente de qualidade), por serem sempre muito atenciosos, por toda a assistência necessária para realização do meu trabalho.

Ao Dr. Lucas Xavier Bonfietti do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, e ao Dr. Mário Mendes Bonci da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por toda colaboração e execução de antifungigrama.

A Profa. Dra. Marcia Souza Carvalho Mellhem do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, que me recebeu com muito carinho e me deu todo apoio com relação aos ensinamentos com antifungograma.

A Profa. Dra. Carina Domaneschi, professora da Faculdade de Odontologia da USP – FOUSP, por todo apoio.

A Profa. Dra. Luciana da Silva Ruiz do Instituto Adolfo Lutz de Bauru, que me deu todo apoio, conselhos e suporte em várias fases do trabalho, além da sua sincera amizade.

Aos meus amigos micologistas, por todo carinho e apoio, em especial a Luciana da Silva Ruiz, Rennan Luiz Oliveira dos Santos, Rinaldo Ferreira Gandra, Débora Moreira, Francisco de Assis Baroni, Mário Mende Bonci, Margareth Léa da Silva Maia, Marcos Auler, Érik Gonçalves Silva e Bosco Cristiano.

Aos funcionários da FOUSP, em especial, a Cátia Tiezzi dos Santos, Maria Aparecida Pinto e Iracema Mascarenhas Pires, pela imensa atenção, dedicação, esclarecimentos e apoio durante todo meu trabalho.

Aos funcionários da biblioteca da FOUSP, especialmente a Glauci Elaine Damasio por toda atenção e esclarecimentos para a elaboração da tese.

Enfim, a todos que me ajudaram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

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

RESUMO

Ramos RTB. Estudo sentinela: monitoramento da colonização fúngica de mucosa oral em crianças internadas em Hospital Público, São Paulo [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2023 Versão Corrigida.

Foram coletadas leveduras da mucosa oral de 80 pacientes de 0 a 17 anos, internados no Hospital Infantil Darcy Vargas. Ao todo foram feitas 167 coletas, e destas, 43 amostras foram positivas para leveduras. Das 43 amostras positivas, 5 apresentaram 2 espécies ou gêneros diferentes na mesma amostra da mucosa oral, perfazendo então 48 cepas. As leveduras foram identificadas por método tradicional, Chromagar (diagnóstico presuntivo) e Maldi-Tof. As amostras foram avaliadas quanto a produção de proteinase e sensibilidade aos antifúngicos pela técnica de microdiluição em caldo segundo método de EUCAST. Dos 80 pacientes, 26 (32,5%) apresentaram amostras positivas para fungos leveduriformes. A levedura mais isolada da mucosa oral foi *Candida albicans* “sensu stricto” (ss) com 72,92% (35/48), seguida de *Candida parapsilosis* “sensu stricto” (ss) com 14,6% (7/48), *Candida dubliniensis* com 4,16% (2/48) e *Candida glabrata* “sensu stricto” (ss), *Candida tropicalis*, *Candida fabianii*, e *Kodamaea ohmeri* com 2,08% (1/48) cada. A atividade enzimática para proteinase, foi produzida em 96% (46/48) das cepas estudadas. A maioria das amostras apresentaram reação fortemente positiva para proteinase (índice 3) com 70,8% (34/48), 25% (12/48) apresentaram reação positiva para proteinase (índice 2) e apenas 4,2% (2/48) apresentaram ausência de atividade enzimática (índice 1). De todas as amostras de *Candida albicans* ss, 25,7% (9/35) produziram atividade positiva para proteinase (índice 2), 68,6% (24/35) produziram atividade fortemente positiva e 5,7% (2/35) apresentaram ausência de atividade para proteinase (índice 1). Com relação aos isolados de *C. parapsilosis* ss, 85,7% (6/7) apresentaram atividade fortemente positiva (índice 3) e 14,3% (1/7) atividade positiva (índice 2). As 2 amostras de *C. dubliniensis*, *C. glabrata* ss e *C. tropicalis* apresentaram atividade fortemente positiva (índice 3), já as amostras de *C. fabianii* e *K. ohmeri* apresentaram reação positiva (índice 2). Um paciente, apresentou candidemia por *C. parapsilosis* ss isolada do sangue e cateter. Essas amostras apresentaram atividade enzimática fortemente positiva para proteinase (índice 3). Já o outro paciente, apresentou candidemia por *C. parapsilosis* ss isolada do sangue e da mucosa oral e apresentou atividade

enzimática fortemente positiva para proteinase (índice 3). Com relação a sensibilidade/resistência aos antifúngicos, pode-se observar que, dentre as cepas estudadas, destacam-se: *C. albicans* ss: 6(R) AMB, 5(R) VCZ e 2(R) FCZ; uma das cepas apresentou resistência cruzada (VCZ e FCZ) e outra foi multirresistente, apresentou resistência aos 3 antifúngicos (AMB, VCZ e FCZ). Duas cepas de *C. parapsilosis* ss apresentaram resistência a AMB. A cepa de *C. tropicalis* apresentou resistência cruzada (VCZ e FCZ). Em conclusão, a técnica tradicional e Maldi-Tof, para a identificação de leveduras, demonstraram concordância de resultados de 91,5%. A atividade enzimática para proteinase, foi produzida em 96% (46/48) das cepas estudadas. Pelos resultados obtidos pode-se observar ainda a presença e colonização de leveduras na mucosa oral deste grupo de crianças internadas em Hospital Público, S.P., e na grande maioria com câncer. *C. albicans* ss foi a espécie mais frequente, destacando-se ainda o isolamento de *C. fabianii* e *K. ohmeri*, espécies raras em material clínico e surgindo, cada vez mais, como patógenos oportunistas.

Palavras-chave: candidemia, crianças hospitalizadas, mucosa oral, candidíase oral, colonização oral.

ABSTRACT

Ramos RTB. Sentinel study: monitoring of fungal colonization of the oral mucosa in children admitted to a Public Hospital, São Paulo [thesis]. São Paulo: University of São Paulo, School of Dentistry; 2023. Corrected Version

Yeasts were collected from the oral mucosa of 80 patients aged 0 to 17 years old admitted to Hospital Infantil Darcy Vargas. In all, 167 samples were collected, and of these, 43 samples were positive for yeast. Of the 43 positive samples, 5 showed 2 different species or genera in the same sample of the oral mucosa, totaling 48 strains. Yeasts were identified by the traditional method, Chromagar (presumptive diagnosis) and Maldi-Tof. The samples were evaluated for proteinase production and sensitivity to antifungal agents by the broth microdilution technique according to the EUCAST method. Of the 80 patients, 26 (32.5%) had positive samples for yeast fungi. The most isolated yeast from the oral mucosa was *Candida albicans* “sensu stricto” (*ss*) with 72.92% (35/48), followed by *Candida parapsilosis* “sensu stricto” (*ss*) with 14.6% (7/48), *Candida dubliniensis* with 4.16% (2/48) and *Candida glabrata* “sensu stricto” (*ss*), *Candida tropicalis*, *Candida fabianii*, and *Kodamaea ohmeri* with 2.08% (1/48) each. The enzymatic activity for proteinase was produced in 96% (46/48) of the studied strains. Most samples showed a strongly positive reaction for proteinase (index 3) with 70.8% (34/48), 25% (12/48) showed a positive reaction for proteinase (index 2) and only 4.2% (2/48) showed absence of enzymatic activity (index 1). Of all *C. albicans ss* samples, 25.7% (9/35) produced positive activity for proteinase (index 2), 68.6% (24/35) produced strongly positive activity and 5.7% (2/35) showed absence of activity for proteinase (index 1). Regarding the *C. parapsilosis ss* isolates, 85.7% (6/7) showed strong positive activity (index 3) and 14.3% (1/7) positive activity (index 2). The 2 samples of *C. dubliniensis*, *C. glabrata ss* and *C. tropicalis* showed strong positive activity (index 3), whereas the samples of *C. fabianii* and *K. ohmeri* showed a positive reaction (index 2). One patient presented candidemia due to *C. parapsilosis ss* isolated from blood and catheter. These samples showed strongly positive enzyme activity for proteinase (index 3). The other patient, on the other hand, had candidemia caused by *C. parapsilosis ss* isolated from the blood and oral mucosa and had a strongly positive enzyme activity for proteinase (index 3). Regarding sensitivity/resistance to antifungal agents, it can be observed that, among the strains studied, the following stand out: *C. albicans ss*: 6(R) AMB,

5(R) VCZ and 2(R) FCZ; one of the strains showed cross-resistance (VCZ and FCZ) and another was multidrug resistant, showing resistance to 3 antifungal agents (AMB, VCZ and FCZ). Two strains of *C. parapsilosis* ss showed resistance to AMB. *C. tropicalis* strain showed cross-resistance (VCZ and FCZ). In conclusion, the traditional technique and Maldi-Tof, for the identification of yeasts, showed a concordance of results of 91.5%. The enzymatic activity for proteinase was produced in 96% (46/48) of the studied strains. From the results obtained, the presence and colonization of yeasts in the oral mucosa of this group of children admitted to Public Hospital, S.P., and the vast majority with cancer, can be observed. *C. albicans* ss was the most frequent species, with emphasis on the isolation of *C. fabianii* and *K. ohmeri*, rare species in clinical material and increasingly emerging as opportunistic pathogens.

Keywords: candidemia, hospitalized children, oral mucosa, oral candidiasis, oral colonization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Colônias de <i>C. albicans</i> em ágar Sabouraud-dextrose.....	51
Figura 4.2 - Leveduras semeadas em Chromagar – A) <i>C. albicans</i> (colônias verdes) e <i>C. glabrata</i> (colônias rosa lilás); B) <i>C. parapsilosis</i> (colônias rosas); C) <i>C. tropicalis</i> (colônias azuis); D) <i>C. dubliniensis</i> (colônias verdes escuras).....	52
Figura 4.3 - Pesquisa do tubo germinativo – efeito Reynolds-Braude.....	53
Figura 4.4 - Aspecto microbiológico de <i>C. parapsilosis</i>	54
Figura 4.5 - Aspecto microbiológico de <i>C. albicans</i>	54
Figura 4.6 - Aspecto microbiológico mostrando blastoconídios e início de filamentação.....	54
Figura 4.7 - Aspecto microbiológico mostrando blastoconídios em cachos.....	54
Figura 4.8 - Proteinase.....	57
Figura 4.9 - Placa de microdiluição em caldo	61
Figura 5.1 - Distribuição dos 80 pacientes por faixa etária incluídos neste estudo.....	66
Figura 5.2 - Porcentagem de pacientes com e sem câncer internados no Hospital Infantil Darcy Vargas, incluídos nesse estudo.....	66
Figura 5.3 -Distribuição numérica dos 80 pacientes internados no HIDV divididos por gênero, com e sem câncer.....	67
Figura 5.4 - Distribuição das espécies de leveduras obtidas de amostras positivas dos 26 pacientes internados no Hospital Infantil Darcy Vargas	67

Figura 5.5 - Distribuição dos 26 pacientes com isolamento de leveduras da mucosa oral por faixa etária.....	68
Figura 5.6 - Frequência das cepas de leveduras isoladas dos 8 pacientes que apresentaram colonização oral.....	69
Figura 5.7 - Aspecto microbiológico de <i>C. albicans ss</i>	72
Figura 5.8 - Aspecto microbiológico de <i>C. dubliniensis</i>	72
Figura 5.9 - Frequência das cepas isoladas da mucosa oral dos pacientes internados no Hospital Infantil Darcy Vargas.....	73

LISTA DE QUADROS

- Quadro 4.1 - Resultados de cepa-padrão *Candida krusei* ATCC 6258 frente aos antifúngicos, segundo EUCAST Versão 6.0, 04/05/2022. 61
- Quadro 4.2 - Resultados de cepa-padrão *Candida parapsilosis* ATCC 22019 frente aos antifúngicos, segundo EUCAST Versão 6.0, 04/05/2022. 62
- Quadro 4.3 - Visão geral de pontos de corte, clínicos e epidemiológicos para espécies de leveduras, usando o EUCAST E.Def 7.3, (EUCAST 2022)..... 63

LISTA DE TABELAS

- Tabela 5.1 - Identificação das espécies de leveduras isoladas da mucosa oral dos pacientes estudados no Hospital Infantil Darcy Vargas nos anos de 2019 e 2020..... 71
- Tabela 5.2 - Comparação de identificação dos métodos tradicionais, “Chromagar Candida” e Maldi-Tof em coletas da mucosa oral dos pacientes internados no Hospital Infantil Darcy Vargas..... 75
- Tabela 5.3 - Atividade da enzima proteinase isoladas da mucosa oral dos pacientes internados no Hospital Infantil Darcy Vargas.....76
- Tabela 5.4 - Classificação de cada espécie de levedura frente aos 4 antifúngicos, segundo a metodologia EUCAST (S- sensível, I – intermediário e R – resistente)..... 79
- Tabela 5.5 - Distribuição de valores de concentração inibitória mínima (MIC) de 4 fármacos antifúngicos frente a 48 cepas de leveduras provenientes da mucosa oral de pacientes internados no Hospital Infantil Darcy Vargas..... 80
- Tabela 5.6 - Síntese da sensibilidade de 48 cepas de leveduras, isoladas da mucosa oral de pacientes internados no Hospital infantil Darcy Vargas..... 81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Anfotericina B
AFG	Anidulafungina
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATCC	“American Type Culture Collection”
BVS	Biblioteca Virtual em Saúde
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAS	Caspofungina
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. dubliniensis</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
<i>C. fabianii</i>	<i>Candida fabianii</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>C. spp</i>	espécies de <i>Candida</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
Células T	linfócitos T
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	“Clinical and Laboratory Standards Institute”
CVC	Cateter Venoso Central
dc	diâmetro da colônia
ddc	diâmetro da colônia mais a zona de degradação
DMSO	Tampão Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECOFF	Ponto de Corte Epidemiológico
et al.	et ali, e outros
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	“European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”

FCY	5-flucitosina
FCZ	Fluconazol
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
GVHD	Doença do enxerto contra o hospedeiro
HIDV	Hospital Infantil Darcy Vargas
HT	Halo transparente
IHF	Infecção Hospitalar Fúngica
ISA	Isaconazol
ITZ	Itraconazol
<i>K. ohmeri</i>	<i>Kodamaea ohmeri</i>
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
MALDI-TOF	“Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight”
MEDLINE	Sistema Online de Busca e Análise de Literatura Médica
MFG	Micafungina
MIC	“Minimal Inhibitory Concentration”
MOPS	Tampão Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
NIS	nistatina
Obs	observação
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
POZ	posaconazol
Pubmed	livre acesso a base de dados Medline
Pz	“precipitation zone”
R	Resistente
RN	Recém-nascido
RPMI	Meio “Roswell Park Memorial Institute”
S	Sensível
Scielo	“Scientific Electronic Library Online”
SDD	Sensibilidade Dose Dependente

Ss	“sensu stricto”
SUS	Sistema Único de Saúde
TALE	Termo de Assentimento
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UTIN	Unidade de Terapia Intensiva Neonatal
UTIP	Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica
VCZ	Voriconazol
YCB	“Yeast Carbon Base”

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
<	menor
>	maior
g	grama
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual
mL	mililitro
°C	grau Celsius
pH	escala numérica que determina o grau de acidez de uma solução aquosa
CO ₂	gás carbônico
UFC	unidades formadoras de colônias
μL	microlitro
L	litro
mg	miligrama
g	grama
nm	nanômetro
Kg	kilograma
mol/L	massa molecular de uma substância expressa em gramas
P	denominado Paciente no nosso estudo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
2	REVISÃO DE LITERATURA	35
2.1	Métodos tradicionais, moleculares para a caracterização de leveduras.....	41
2.2	Espectrometria de Massa – MALDI-TOF.....	42
2.3	Fatores relacionados à virulência.....	43
2.4	Testes de susceptibilidade aos antifúngicos.....	44
3	PROPOSIÇÃO	47
3.1	Proposições gerais.....	47
3.2	Proposições específicas.....	47
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	Casuística.....	49
4.1.1	Critérios de Inclusão	49
4.1.2	Critérios de Exclusão	49
4.1.3	Comitê de Ética	50
4.2	Coleta de Material das Crianças.....	50
4.3	Perfil Fenotípico das Leveduras.....	51
4.3.1	Método tradicional	51
4.3.1.1	Avaliação da Pureza das Colônias.....	52
4.3.1.2	Prova do tubo Germinativo.....	53
4.3.1.3	Microcultivo em lâmina.....	53
4.3.1.4	Provas bioquímicas (Zimograma e Auxanograma).....	55
4.3.1.5	Produção de Urease.....	56
4.4	Fatores Relacionados à Virulência.....	56
4.4.1	Produção de Exoenzimas	56
4.4.1.1	Proteinase (Ruchel et al., 1982).....	56
4.5	Espectrometria de Massa – Maldi-Tof.....	57
4.6	Teste de sensibilidade aos Antifúngicos – Método EUCAST.....	58
4.6.1	Preparação das Soluções Estoque	58
4.6.2	Distribuição dos Antifúngicos	59
4.6.3	Preparação do Inóculo	59
4.6.4	Execução do teste de Microdiluição	60

4.6.5	Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	62
4.7	Procedimento de Análise de Resultados.....	64
5	RESULTADOS.....	65
5.1	Colonização Oral - Dois ou mais isolamentos sequenciais de leveduras	68
5.2	Sangue e cateter	70
5.3	Óbitos das crianças no período de estudo.....	70
5.4	Diferenciação de <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i>	72
5.5	Caracterização das cepas pela técnica de espectrometria de massa Maldi-Tof.....	73
5.6	Comparação de identificação dos métodos tradicionais, “Chromagar Candida” e Maldi-Tof	74
5.7	Atividade enzimática – Proteínase	76
5.8	Sensibilidade aos antifúngicos – Metodologia de Microdiluição em Caldo pelo método EUCAST.....	77
6	DISCUSSÃO.....	83
6.1	Isolamento e Caracterização de Leveduras.....	83
6.2	Produção de Proteínase – Fator de Virulência.....	87
6.3	Sensibilidade/ Resistência aos Antifúngicos.....	88
7	CONCLUSÕES.....	93
	REFERÊNCIAS.....	95
	APÊNDICES	105
	ANEXOS.....	117

1 INTRODUÇÃO

Os fungos têm emergido, nas últimas décadas, como um dos principais agentes causadores de doenças em humanos, principalmente, em pacientes imunocomprometidos e internados em unidades de saúde. Um estudo nos Estados Unidos da América, demonstrou que entre os anos de 1979 e 2000, houve um aumento anual de 207% da epidemiologia de septicemia provocada por fungos (Paula et al., 2007; Matta et al., 2017).

Pelo menos 8% dos pacientes que ingressam nos hospitais adquirem infecção hospitalar fúngica (IHF). Conseqüentemente, o tempo de permanência dos pacientes nos hospitais é ampliado, gerando mais custos no tratamento e favorecendo a maior utilização nos leitos hospitalares públicos, além de interromper a vida produtiva do indivíduo (Yamamoto, 2010).

A infecção hospitalar fúngica nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) em neonatais, pode variar de 2 a 10% com mortalidade de até 60 % dependendo do patógeno e do estado geral do neonato (Paula, et al., 2007). Entre os recém-nascidos (RN) com peso ao nascer < 1000g, 4 a 8% desenvolverão candidemia e a mortalidade pode chegar a 30%. Em recém-nascidos que sobrevivem, frequentemente, têm deficiência neurológica e imunológica de longo prazo, incluindo paralisia cerebral, cegueira, deficiência auditiva, “déficits” cognitivos, e leucomalácia periventricular (Caggiano et al., 2017; De Rose et al., 2021).

A origem da IHF pode ser endógena ou exógena. Endógena se refere aos microrganismos da própria biota do paciente com proliferação ou mudança do sítio da levedura, induzidas por fatores predisponentes do hospedeiro ou do fungo. Já a exógena, se refere a fungos que chegam ao paciente a partir de fontes externas, tais como, as mãos dos agentes de saúde, dispositivos utilizados pelos pacientes graves como cateteres, sondas e também sistemas de climatização hospitalar (Paula et al., 2007; Yamamoto, 2010).

As infecções nosocomiais fúngicas podem ser ocasionadas por leveduras ou fungos filamentosos. Entre os fungos filamentosos, os gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* são os mais prevalentes. Entre as leveduras, as espécies do gênero *Candida* é o patógeno que tem grande destaque em infecção nosocomial, principalmente em pacientes imunocomprometidos, incluindo os pacientes submetidos a terapias imunossupressoras, em tratamento de câncer, transplantados, com AIDS, pacientes que sofreram tratamentos prolongados com antibacterianos ou intervenções médicas invasivas (Arnoni et al., 2018).

Entre os patógenos responsáveis pelas infecções da corrente sanguínea, o gênero *Candida* representa o terceiro / quarto patógeno e sua epidemiologia tem sido bem estudada nos Estados Unidos e Europa, mas não na América Latina. No Brasil, as taxas de incidência são fragmentadas ao considerar dados de todas as regiões do país (Oliveira et al., 2014; Rodríguez et al., 2018).

A epidemiologia da candidemia varia geograficamente (Caggiano et al., 2017; Matta et al., 2017; Piqueras et al., 2020). Apesar de *Candida albicans* ainda ser a principal causa de candidemia, nos últimos anos, se observou um aumento significativo do número de infecções causadas por *Candida não-albicans* em várias partes do mundo (Caggiano et al., 2017; Matta et al., 2017). Alguns estudos relataram que 40 a 50% destas infecções são causadas por espécies de *Candida não-albicans* (Ruiz et al., 2005; Paula et al., 2007; García-Rodríguez et al., 2013).

C. albicans ainda é a levedura mais frequentemente isolada da corrente sanguínea. Devido à sua resistência inata ou adquirida a agentes antifúngicos, as infecções invasivas causadas por espécies de *Candida não-albicans* são mais difíceis de serem tratadas. Portanto, a administração do tratamento deve ser baseada na identificação em nível de espécie. A segunda levedura mais isolada da corrente sanguínea de indivíduos diagnosticados com candidemia nos últimos dez anos é: *Candida parapsilosis* “sensu stricto”, que também é de grande interesse médico. (Oliveira, et al., 2014; Rodríguez et al., 2018).

Segundo Guo et al. (2021), *C. parapsilosis* se tornou a segunda espécie de *Candida não-albicans* mais prevalente que causa infecções invasivas em todo o mundo, variando de 24,3% na América Latina a 12,9% na Ásia. *C. parapsilosis* é considerada uma das principais causas de infecções relacionadas a cateteres e pode formar biofilmes em cateteres venosos centrais (CVCs) e outros implantes médicos. O complexo *Candida parapsilosis* apresenta 3 espécies crípticas: *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*.

Devido as altas taxas de morbidade e mortalidade, a candidemia é uma preocupação importante na medicina relacionada a saúde pública. A taxa de mortalidade em crianças é de 30% e em adultos é de 50% (Oliveira et al., 2014). Em ambas as idades, os fatores de risco para aquisição dessa infecção são semelhantes como: a internação prolongada em Unidade de Terapia Intensiva, infecção bacteriana prévia, uso de cateter venoso central, nutrição parenteral e imunossupressão. Os recém-nascidos apresentam como principais fatores de risco: prematuridade e imaturidade do sistema imunológico, barreiras físicas enfraquecidas, colonização, exposição a fatores ambientais, cateter venoso central ou tubo endotraqueal, por

tempo prolongado, bloqueadores H2, antibióticos e corticosteroides, por tempo prolongado, nutrição parenteral, tempo prolongado de hospitalização, cirurgia recente, diálise, hipertensão materna, restrição do crescimento intrauterino, asfíxia, infecção hospitalar e idade gestacional avançada (Tinoco-Araujo et al., 2013; Caggiano et al., 2017).

Os fungos fazem parte da microbiota residente, colonizando de 10 a 60% dos RN prematuros. Até o fim da primeira semana de internação, cerca de 50% desses pacientes são colonizados por *Candida* spp. Em diversos estudos sobre infecções fúngicas, as leveduras do gênero *Candida* são as mais comuns, sendo *C. albicans* a espécie mais frequente, responsável por 75% dos casos de infecções fúngicas oportunistas, seguida por *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* e *C. parapsilosis* (Tinoco-Araujo et al., 2013; Batista et al., 2014).

A frequência de colonização é inversamente proporcional à idade gestacional e ao peso ao nascer do RN. Bebês prematuros são os mais afetados, apresentando infecções invasivas após a colonização (De Rose et al., 2021).

Na área de neonatologia, a candidíase invasiva representa um grande impacto. Acomete de 2% a 20% dos RN prematuros, representando 10% dos casos de sepse em RN com baixo peso (<1.500g) e representa a segunda maior causa de mortalidade relacionada a infecções oportunistas em RN prematuros, com extremo baixo peso (<1.000g). Em RN prematuros, a mortalidade decorrente da candidíase invasiva é elevada, variando entre 20% a 50% (Tinoco-Araujo et al., 2013; Batista et al., 2014).

Enquanto há muitos estudos epidemiológicos relativos a população adulta, mostrando a distribuição das espécies, suscetibilidade antifúngica e fatores de risco, a candidemia na população pediátrica ainda é pouco estudada. Alguns estudos, feitos em hospitais de diferentes regiões geográficas, relatam que as espécies mais frequentes que causam infecções da corrente sanguínea em pacientes pediátricos são: *C. albicans* e *C. parapsilosis* “sensu stricto”. Em adultos, as espécies isoladas mais frequentes são *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, e *C. krusei* (Oliveira et al., 2014).

2 REVISÃO DA LITERATURA

No Brasil, as espécies mais comumente isoladas em pacientes pediátricos são *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Em adultos, as espécies mais comuns são as mesmas que em pacientes pediátricos, exceto pela espécie *C. tropicalis*, que é a segunda mais frequente em adultos. O alto isolamento de *C. parapsilosis* em pacientes pediátricos pode ser explicado pelo fato desta espécie estar relacionada à prematuridade, presença de cateteres venosos centrais e uso de nutrição parenteral total. Diferenças anatômicas e fisiológicas entre pacientes pediátricos e adultos, alteram a suscetibilidade a infecções causadas por diferentes espécies de *Candida*, o que influencia a abordagem do tratamento antifúngico, incluindo questões relacionadas à toxicidade das drogas, farmacocinética e dosagens (Oliveira et al., 2014).

Khouri et al. (2016), no período de um ano, isolaram e identificaram 100 amostras de *Candida* de 67 pacientes, as quais 74% foram caracterizadas como colonização e 26% como infecção nosocomial. *C. albicans* foi a mais prevalente (40%), seguida de *C. tropicalis* (25%), *C. parapsilosis* (21%), *C. glabrata* (9%), *C. rugosa* (2%), *C. novyensis* (1%), *C. krusei* (1%) e *C. guilliermondii* (1%). As espécies de *Candida* não-*albicans* representaram 71,4% dos casos de colonização e 52,1% de infecção. *C. albicans* foi a espécie mais comum encontrada nas secreções e no sangue. *C. parapsilosis* foi a espécie mais isolada de cateter venoso, enquanto *C. tropicalis* e *C. glabrata* foram as espécies mais isoladas de sondas abdominais. A maioria das amostras mostrou alta susceptibilidade aos agentes antifúngicos.

Segundo Caggiano et al. (2017), em um levantamento bibliográfico de 2000-2015, total de 45 artigos, concluíram que a espécie *C. albicans* foi a mais dominante na Europa variando entre 47% e 100% e na América do Norte e América do Sul variando entre 40 a 69,2%. As espécies de *Candida* não-*albicans* foram predominantes na Ásia variando entre 25 e 92% com média de 75%. Na Austrália, a proporção de *C. albicans* e *Candida* não-*albicans* foi distribuída igualmente.

Em Pequim, de 2010 a 2019, as espécies de *Candida* não-*albicans* mais identificadas foram *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (Guo et al., 2021).

Matta et al. (2017), se basearam em 40 artigos documentando episódios de candidemia em centros médicos da América Latina e Caribe. As espécies mais comumente encontradas em todos os países causando candidemia foram *C. albicans*, *C. parapsilosis* “sensu stricto”, *C.*

tropicalis, e *C. glabrata*. *C. albicans* foi a principal causa de candidemia em 32 de 40 estudos que exibem taxas de prevalência variando entre 18,8% e 66%. Concluíram que a candidemia é causada principalmente por *C. albicans*, seguida de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Na Argentina, Brasil e Colômbia foi observado uma tendência para o aumento na frequência de candidemia causada por *C. glabrata*.

Segundo estudo de Oliveira et al. (2014), a frequência de leveduras do gênero *Candida* isoladas de sangue de 104 pacientes pediátricos internados em hospital público de São Paulo, no período de 2007 a 2010, demonstraram que as espécies de *Candida* identificadas por meio fenotípico e genotípico, foram: 37,5% de *C. albicans*, 24,03% de *C. tropicalis*, 22,1% de *C. parapsilosis*, 5,8% de *Pichia anomala*, 4,8% de *C. guilliermondii*, 2,8% de *C. krusei*, 1,9% de *C. glabrata* e 0,96% de *C. pararugosa*. Revelando assim um aumento das espécies de *Candida* não-*albicans*, ao longo dos anos, principalmente em 2009 e 2010.

Piqueras et al. (2020), fizeram um estudo retrospectivo da candidemia em crianças de 0 a 14 anos em um hospital terciário no período de 2011 a 2018. Foram diagnosticados 68 episódios de candidemia em 62 crianças, 48% ocorreram na UTIN (Unidade de Terapia Intensiva Neonatal), 31% na UTIP (Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica) e 21% nas enfermarias de pediatria. *C. albicans* foi a espécie mais frequentemente isolada UTIN (53%), e *C. parapsilosis* predominou entre os pacientes da UTIP (59%) e enfermarias pediátricas (50%). Um terço dos lactentes de UTIN apresentou candidíase invasiva, a maioria deles com peso extremamente baixo ao nascer (35%). A mortalidade ocorreu principalmente em pacientes de UTIN (26%), predominou em bebês de extremo baixo peso e não mudou ao longo do tempo.

Warris et al. (2020), realizaram um estudo europeu multicêntrico retrospectivo da epidemiologia e desfecho da candidemia neonatal e pediátrica (≤ 18 anos) diagnosticadas de 2005 a 2015. Foram relatados 1.395 episódios de candidemia (57,8% do sexo masculino) em 23 hospitais de 10 países europeus. Dos 1395 episódios, 36,4% ocorreram em RN (≤ 44 semanas pós-menstrual), 13,8% em bebês (> 44 semanas pós-menstrual a 1 ano) e 49,8% em crianças e adolescentes. As espécies predominantes foram *C. albicans* (52,5%) e *C. parapsilosis* (28%), seguidas de *C. tropicalis* (4,4%), *C. glabrata* (3,5%) e *C. krusei* (2,2%). Observou-se maior proporção de candidemia causada por *C. albicans* entre os pacientes neonatais (60,2%) e com maiores taxas de *C. parapsilosis* observada entre os bebês (42%). As crianças internadas em enfermarias de hematologia-oncologia apresentaram as maiores taxas

de espécies *Candida* não-*albicans*. (Obs: Idade pós menstrual = idade gestacional somada a idade cronológica do bebê)

Diaz et al. (2020), realizaram uma revisão descritiva de cepas de *Candida dubliniensis* isoladas em 2018 e 2019 em uma grande instituição pediátrica terciária em Columbus, Ohio. No período de 18 meses, *C. dubliniensis* foi identificada em 48 pacientes com 67 amostras positivas para leveduras, sendo 44 de escarro (66%), 11 de fluido de lavagem broncoalveolar (16%), 4 de sangue (6%), 3 de feridas (4%), 2 de secreções esofágicas (3%), 2 de fluidos peritoneais (3%) e 1 de secreção vaginal (1%). Desses 48 pacientes, 8 pacientes (17%) apresentaram infecções invasivas (3 com pneumonia, 2 com esofagite, 1 com peritonite, 1 com candidemia relacionada ao cateter e 1 com candidíase disseminada) e receberam terapia antifúngica. Os 40 pacientes restantes (83%) foram considerados colonizados.

Segundo Arastehfar et al. (2019), *Candida fabianii* (*Cyberlindnera fabianii*) é uma espécie rara de levedura patogênica, que possui capacidade de causar septicemia, biofilme e apresenta resistência a fluconazol, voriconazol, caspofungina e anfotericina B. Além disso, o tratamento profilático de infecção causada por *C. fabianii* pode levar ao resultado em falha de tratamento de 50% dos pacientes e pode causar septicemia fatal. Essa espécie, quando avaliada bioquimicamente, tem sido erroneamente identificada como *Cyberlindnera jadinii* (*C. utilis*) e *Wickerhamomyces anomalus* (*C. pelliculosa*), segundo os autores citados acima.

Kaur et al. (2020), verificaram no ano de 2014 (de janeiro a dezembro) 316 casos de candidemia em um hospital público do norte da Índia. Destes, 58,8% dos pacientes eram menores de 18 anos de idade e 41,2% de adultos. Entre o grupo pediátrico, 74,7% eram neonatos. Na população pediátrica (n=186), foram isolados: *C.krusei* (44%), *C.tropicalis* (19,4%), *C.pelliculosa* (14,5%), *C.albicans* (8,6%), *C.parapsilosis* (4,3%), *C.guilliermondii* (2,2%), *K. ohmeri* (1,6%), *C.ortopsilosis* (1%), *Trichosporon asahii* (1%), *Cyberlindnera jadinii* (1%), *C.auris* (0,5%), *Lodderomyces elongisporus* (0,5%), *C.fabianii* (0,5%) e *C.glabrata* (0,5%).

Segundo Zhou et al. (2021), *Kodamaea ohmeri*, anteriormente conhecido como *Pichia ohmeri*, tem sido considerado como um patógeno humano emergente nas últimas décadas, e tem causado vários tipos de infecções com alta mortalidade. Pode causar infecções invasivas e não invasivas. Este estudo revisou sistematicamente todos os casos publicados de infecção por *K. ohmeri*, visando um melhor entendimento as características clínicas e epidemiológicas do organismo. Nesse estudo, os autores verificaram que houveram surtos nosocomiais de *K.*

ohmeri na pediatria (UTI). Tem sido relatados mortalidade significativamente alta de 50% em casos de infecções invasivas.

O diagnóstico da candidemia representa um desafio para a equipe médica, pois, os sinais e sintomas não são específicos. A candidíase invasiva pode se manifestar como um quadro de sepse, que pode ser confundida com a sepse de origem bacteriana, dificultando a escolha do tratamento medicamentoso correto (Consolo, 2012). Além disso, em RN, principalmente nos prematuros, a quantidade de sangue que se consegue coletar é pequena e muitas vezes as hemoculturas podem dar resultado negativo em um grande número de pacientes com sepse fúngica. Até 50% dos bebês com líquido cefalorraquidiano (LCR) positivo para *C. albicans* ou *C. parapsilosis* podem ter hemoculturas negativas em sete dias. Isso explica a complexidade do diagnóstico de infecções invasivas por leveduras do gênero *Candida*, no RN, e a necessidade de uma terapia imediata, no momento da suspeita diagnóstica (De Rose et al., 2021).

A boca é considerada uma porta de entrada para infecções fúngicas oportunistas e, a candidíase bucal, uma possível fonte primária para a colonização da mucosa gastrintestinal e disseminação sistêmica da infecção por meio dos capilares mesentéricos. Desse modo, deve-se compreender as alterações bucais da candidíase, por exemplo em RN prematuros, em crianças com câncer, levando a cuidados bucais que são realizados para prevenção e controle de novos casos de candidíase (Tinoco-Araujo et al., 2013; Batista et al., 2014).

Em RN prematuros, a candidíase bucal representa a infecção oportunista mais comum. A candidíase mucocutânea do tipo pseudomembranosa é a mais encontrada e tem a aparência muito semelhante a leite coagulado (placas brancas na mucosa oral). Tais placas podem ser destacadas, sendo constituídas por hifas, células epiteliais e tecido necrosado. A mucosa subjacente pode estar normal ou eritematosa, apresentando máculas vermelhas e não placas brancas, dolorosas em toda a cavidade oral; as lesões podem surgir novamente ou subsequentes à eliminação da pseudomembrana. A leucoplasia por *Candida* spp., também conhecida como crônica hiperplásica, apresenta placas brancas não destacáveis e um risco aumentado (até 10%) para transformação maligna em carcinoma oral de células escamosas (Tinoco-Araujo et al., 2013; Batista et al., 2014; Vila et al., 2020).

Em pacientes submetidos à terapia antineoplásica, pode-se observar uma incidência de 44,4% de candidíase oral durante o tratamento oncológico. Dentre as formas mais comuns, 87,5% dos pacientes foram acometidos por candidíase pseudomembranosa e 12,5% apresentaram candidíase eritematosa (Dantas et al., 2020).

C. parapsilosis “sensu stricto” tem também adquirido importância no campo da estomatologia. Alguns estudos baseados em culturas e outros no DNA tem reportado estas espécies como a segunda levedura mais frequentemente isolada da cavidade oral depois de *C. albicans* (Rodríguez et al., 2018).

Livério et al. (2017), verificaram a presença de *C. dubliniensis* entre cepas isoladas da mucosa oral de crianças com AIDS as quais foram inicialmente caracterizadas como *C. albicans* por métodos tradicionais.

Sato et al. (2017), realizaram um estudo com 266 moradores de comunidade, com 60 anos ou mais, na cidade de Otsuchi, que foi severamente danificada pelo Grande Terremoto e Tsunami do Leste do Japão em 2011. Amostras orais foram coletadas da língua por meio de “swab”. Foram detectados: 142 (53,4%) participantes com *C. albicans* e 63 (23,7%) participantes com *Candida* não-*albicans*. O fator significativo de colonização por *C. albicans* foi "dentes deteriorados". Fatores relacionados à colonização por *Candida* não-*albicans* foram, segundo os autores, "idade mais de 80 anos", "número de dentes remanescentes", "uso de dentaduras", e "obesidade".

Silva et al. (2018), estudaram a incidência de espécies de *Candida* em grupos de bebês e crianças com fissuras orofaciais, durante o período pré e pós-operatório e até o retorno à primeira consulta. Foram relatadas na admissão do paciente e na enfermaria cirúrgica, incidência (39,1%) de colonização oral por espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *Candida* spp.), sem correlação com os tipos de fissuras orofaciais ou história cirúrgica. Houve reduções significativas nas frequências de *Candida* e mudanças de espécies, ao longo dos períodos de amostragem, revelando padrões dinâmicos de colonização oral: eliminação, manutenção ou neocolonização dos biótipos. Os dados mostraram biótipos de *Candida* resistentes ao fluconazol sensíveis a anfotericina, especialmente *C. albicans*.

Devemos ressaltar ainda a espécie de *Candida auris*, responsável por diversas infecções hospitalares em vários países do mundo, é resistente ao fluconazol e tem sido descrito cepas multirresistentes. Apresenta elevada transmissibilidade e sobrevive por longo tempo no meio ambiente. Ela já foi isolada de vários sítios anatômicos tais como pele e mucosas. Procedimentos invasivos ou sistema imunológico comprometido, pode levar esta levedura a corrente sanguínea, sendo assim de alto risco para o paciente. Tratamento com longos períodos com uso de antibióticos, antifúngicos e quimioterápicos também são considerados fatores de risco para contaminação. (Alastruey-Izquierdo et al., 2019)

Okolo et al. (2020) fizeram um estudo transversal em três unidades de saúde terciárias em Jos, Centro-Norte Nigéria. Este estudo teve como objetivo principal analisar a colonização oral de neonatos. Amostras de swab oral foram coletadas de 58 neonatos e processadas usando métodos fenotípicos e técnicas moleculares. A taxa de colonização oral neonatal foi de 6,9%. As amostras de *Candida* isoladas foi 100% de *C. tropicalis* confirmada pelo sequenciamento e análise filogenética. *C. tropicalis* é um dos principais colonizadores orais em neonatos.

Sav et al. (2020), fizeram coletas da mucosa oral de 34 pacientes adultos com candidíase oral observados durante o período de 2016 a 2018 em hospital municipal de Kayseri, na Turquia. As identificações foram feitas por métodos tradicionais e Chromagar Candida. Do total de pacientes: *C. albicans* (41,2%), 8 *C. glabrata* (23,5%), 8 *C. parapsilosis* (23,5%) e 4 *C. tropicalis* (11,8%). Cetoconazol apresentou o valor MIC mais baixo. Os valores de MIC de nistatina para espécies *Candida* não-*albicans* foram maiores que para *C. albicans*.

2.1 Métodos tradicionais, moleculares para a caracterização de leveduras

A identificação das leveduras é etapa fundamental para o monitoramento das taxas de infecção hospitalar, para a identificação precoce de surtos de infecções por *Candida* e, faz-se necessária para uma adequação rápida da terapia antifúngica (Colombo, Guimarães, 2003).

Os métodos fenotípicos comumente empregados em laboratórios para caracterização de leveduras tem como base principal a análise do perfil morfológico e bioquímico destes organismos. A observação de estruturas microscópicas, os testes de avaliação de atividade enzimática e da capacidade de assimilação e fermentação de substratos, compõe um conjunto de métodos, com as quais se pode identificar uma levedura em nível de espécie, definir o comportamento da mesma em diferentes condições e assim definir as diversas características deste microrganismo (Spolidorio et al., 2009).

Os métodos moleculares, além de fornecerem uma identificação correta e precoce, tornaram-se também uma ferramenta importante na epidemiologia hospitalar promovendo a tipagem molecular. Esta vem sendo muito utilizada para avaliar possíveis fontes de surtos hospitalares e para estabelecer a identidade ou similaridade das linhagens presentes no ambiente hospitalar. Avanços na biologia molecular têm permitido o desenvolvimento de métodos moleculares para o estabelecimento de variações genéticas entre as amostras de leveduras, sendo estes métodos muito utilizados em investigações epidemiológicas (Hernández-Castro et al., 2010). Além disso, a detecção de variações genéticas, entre isolados de um determinado patógeno, é importante porque traduz possíveis variações fenotípicas tais como diferenças na composição antigênica, na virulência, na sensibilidade a antifúngicos (Pfaller et al., 1995).

Vários trabalhos, em diferentes regiões do mundo, vêm demonstrando a importância das espécies de *Candida* e o uso da biologia molecular em casos de surtos nosocomiais e na determinação da rota de transmissão nosocomial (Hernández-Castro et al., 2010; Ruiz et al., 2013), culminando, assim, em melhorias para os estudos epidemiológicos realizados em ambiente hospitalar.

2.2 Espectrometria de Massa – MALDI-TOF

Segundo Lima-Neto et al. (2014), Maldi-tof (Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight) é uma técnica físico-química que tem sido utilizada para rápida e confiável identificação microbiana. O espectro gerado é analisado como um perfil proteômico individual, onde importantes proteínas ribossomais aparecem, o que é uma vantagem porque eles podem ser prontamente empregados como biomarcadores. A identificação rápida de bactérias intactas por perfis proteômicos Maldi-Tof MS foram usados pela primeira vez em 1996. Mais recentemente, MALDI-TOF MS tem sido usado para detectar e identificar leveduras. É capaz de discriminar espécies intimamente relacionadas, como *C. glabrata* de *C. braccarensis*, *C. albicans* de *C. dubliniensis* e, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* de *C. parapsilosis*, previamente separados apenas por métodos moleculares. A análise MS é uma técnica poderosa para identificar isolados de *Candida* e pode discriminar entre espécies intimamente relacionadas e a confiabilidade desta metodologia Maldi-Tof MS é alta. No entanto, devido à variabilidade biológica dessas leveduras, é necessária a disponibilidade de uma extensa base de dados. Portanto, se faz necessário ter coleções de culturas com materiais biológicos de alta qualidade para alimentar os bancos de dados do MALDI-TOF MS com espectros de referência, segundo os autores acima citados.

Existem 3 sistemas de análise bioinformática dos espectros dos microrganismos comercializados: Microflex LT Biotyper (Bruker Daltonics), VITEK MS IVD (bioMérieux) e MALDI microMX (Waters Corporation), (Barbosa et al., 2021).

Barbosa et al. (2021), fizeram uma revisão integrativa nas bases de dados SciELO, BVS, Web of Science, PUBMED e Google Acadêmico e tiveram como objetivo verificar a utilidade do MALDI-TOF, como ferramenta diagnóstica, nos protocolos de sepse em comparação com a cultura. Observaram que a implementação do MALDI-TOF no protocolo de sepse reduz o tempo do diagnóstico etiológico, do tempo até a terapia efetiva, do tempo de permanência em UTI e da diminuição dos custos hospitalares. Além disso, ele é utilizado para diagnósticos de microrganismos raros. Concluíram que a inclusão do MALDI-TOF tem potencial para trazer benefícios na condução do paciente com sepse.

2.3 Fatores relacionados à virulência

Além do aspecto relacionado à identificação, estudos envolvendo a epidemiologia e patogenicidade das cepas são de fundamental importância para uma melhor compreensão do agente etiológico e sua interação com o hospedeiro.

Um aspecto importante destas interações são os fatores relacionados à virulência demonstrados pelas espécies de *Candida* e outras leveduras. Os mecanismos patogênicos envolvidos com o início e a progressão de infecções por *Candida* ainda não são completamente compreendidos. Vários estudos com mutantes de *C. albicans*, desprovidos de genes de virulência específicos, tem mostrado que nenhum fator único de virulência pode ser identificado como determinante dominante na virulência desta levedura. Geralmente, se aceita que a virulência de *Candida* é um evento multifatorial regulado pela capacidade dos microrganismos adaptarem-se às mudanças ambientais e coordenar a expressão de vários genes de virulência (Calderone; Fonzi, 2001).

A maioria das espécies patogênicas de *Candida* tem desenvolvido uma ampla variedade de fatores de virulência para auxiliar sua capacidade de colonizar tecidos, causar a doença, e superar as defesas do hospedeiro. Entre eles, a produção e exoenzimas tais como proteinases aspárticas (Lacaz et al., 2002).

Proteinases são enzimas secretadas “in vitro” por espécies patogênicas de *Candida* durante a infecção. Essas enzimas podem ser secretadas “in vitro” quando a levedura é cultivada na presença de proteínas exógenas (usualmente albumina bovina sérica) como fonte de nitrogênio. Acredita-se que a proteinase tenha como função degradar anticorpos, aumentando a capacidade do microrganismo de colonizar e penetrar nos tecidos do hospedeiro (Vinitha, 2009). Experimentalmente, mutantes deficientes na produção de proteinase parecem ser menos virulentos que as cepas capazes de secretar enzimas proteolíticas.

2.4 Testes de susceptibilidade aos antifúngicos

A sensibilidade aos fármacos varia entre as diferentes espécies de *Candida*, ressaltando a importância em identificá-las, bem como em se determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIMs) para orientação terapêutica. Conseqüentemente houve uma necessidade do desenvolvimento de métodos padronizados de susceptibilidade “in vitro”, que serviram como um guia para nortear a escolha terapêutica, monitorar a eficácia da mesma e diminuir o aparecimento de cepas resistentes (St-Germain et al., 2001; Costa et al., 2004).

Existem vários testes que podem ser usados para a determinação da sensibilidade antifúngica, tais como: Diluição em meio líquido por técnicas de macrodiluição e microdiluição; Difusão em ágar a partir de discos e fitas com concentrações variáveis de antifúngicos.

Em 2009, o “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) indicou o documento M44-S3 que é o método de referência para os testes de susceptibilidade a leveduras com pontos de corte por espécie. Este documento foi substituído pelo CLSI M60-S1 de 2017.

A técnica do EUCAST, para a leitura dos antifungogramas é preconizada pelos grupos de pesquisa europeus, e a leitura final desta técnica é realizada de modo automatizado em espectrofotometro, é uma proposta de melhoria do método do CLSI (Melhem; Szeszs, 2017).

No tratamento de infecções fúngicas invasivas quatro principais classes de antifúngicos são usadas no Brasil: polienos, particularmente anfotericina B, triázóis (fluconazol, voriconazol, cetoconazol, itraconazol e posoconazol), equinocandinas (caspofungina, anidulafungina, micafungina) e pirimidinas (flucitosina) (Pappas et al., 2009). O aumento da ocorrência de espécies de *Candida* potencialmente resistentes aos fármacos azólicos já existentes, levou ao desenvolvimento de outras drogas antifúngicas como o voriconazol, que apresenta uma atividade de amplo espectro (Pelletier et al., 2002).

A susceptibilidade das leveduras do gênero *Candida* aos antifúngicos disponíveis depende, dentre outros fatores, da espécie do isolado, no entanto nem sempre determinado isolado segue o padrão geral dos membros de sua espécie. O uso terapêutico e profilático de agentes tais como a anfotericina B e os azóis menos tóxicos, que são frequentemente

administrados por períodos prolongados, tem dado origem a casos alarmantes de resistência aos antifúngicos (Pfaller et al., 1998; Bizerra et al., 2014).

Guo et al. (2021), fizeram um estudo retrospectivo em diferentes hospitais terciários da China (2005-2020). Coletaram 884 amostras clínicas, todas pertencentes ao complexo *C. parapsilosis* (763 *C. parapsilosis*, 72 *C. metapsilosis* e 49 *C. orthopsilosis*). Analisaram a susceptibilidade antifúngica frente a 10 drogas: anfotericina (AMB), anidulafungina (AFG), caspofungina (CAS), micafungina (MFG), fluconazol (FCZ), voriconazol (VCZ), itraconazol (ITZ), posaconazol (POZ), 5-flucitosina (FCY) e isaconazol (ISA). A taxa de resistência de *C. parapsilosis* da corrente sanguínea aos medicamentos foi 3,5%, de *C. metapsilosis* a AFG e CAS foi de 7,7% e de *C. orthopsilosis* a FCZ e VCZ foi de 15% e a CAS, MFG e POZ era de 5%. Embora o ISA atue no mesmo alvo que outros azólicos, ele pode ser usado como uma terapia alternativa para casos originados por cepas do complexo *C. parapsilosis* resistentes a FCZ ou VCZ.

Devido a um aumento significativo no uso de agentes antifúngicos como profilaxia e terapia empírica, surgiram isolados clínicos resistentes, particularmente contra triazóis e equinocandinas. Isto resultou em resistência ao fluconazol entre isolados clínicos que eram primariamente sensíveis a esta droga, incluindo cepas de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Embora a resistência as equinocandinas seja considerada, incomum, a ocorrência de isolados com menor suscetibilidade a essa classe terapêutica tem sido cada vez mais relatada, principalmente entre isolados de *C. glabrata* (Matta et al., 2017).

O fluconazol (FCZ) foi sugerido como um agente antifúngico na profilaxia e tratamento da candidíase oral. No entanto, um grau significativo de resistência a FCZ foi detectado em isolados de *C. não-albicans*. No geral, voriconazol (VCZ) mostrou mais potência “in vitro” do que o fluconazol ou itraconazol contra a maioria dos isolados do gênero *Candida* (Sav et al., 2020).

Para uma melhor resposta no tratamento da candidíase oral, a medicação antifúngica deve ser iniciada precocemente. A nistatina é um antifúngico tópico de primeira escolha para este tratamento devido a sua eficácia, ausência de efeitos colaterais graves, baixa resistência e menor custo. Nos casos de candidíase oral associada à imunossupressão, é realizada a administração sistêmica de medicamentos, como fluconazol, cetoconazol, flucitosina e anfotericina-B. O tratamento intravenoso com anfotericina-B ou equinocandinas é indicado quando há casos sistêmicos graves ou resistentes aos azóis. Vale ressaltar a importância do uso

racional destes fármacos no ambiente hospitalar, visando diminuir a resistência aos mesmos, ofertando uma terapia adequada e, conseqüentemente, elevando a sobrevida dos pacientes (Varano et al., 2019).

A conscientização da epidemiologia local e do perfil de suscetibilidade a antifúngicos das infecções por *Candida* em diferentes centros médicos tem grande relevância na orientação dos clínicos, na otimização de sua estratégia de prevenção e tratamento de tais infecções fúngicas (Matta et al., 2017).

Além disso, a colonização da mucosa por *C. albicans* e *Candida* não-*albicans* é um importante fator de risco para candidemia potencialmente fatal (De Rose et al., 2021).

Convém novamente salientar o estudo de Batista et al. (2014), onde os autores chamam a atenção para a importância da colonização da mucosa oral como fator de risco para a candidemia.

O monitoramento desta microbiota, o gerenciamento e comunicação dos achados laboratoriais, podem levar a elaboração de protocolo que auxiliará em conhecimento mais aprofundado da epidemiologia e terapêutica destas infecções fúngicas.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Proposições gerais

Verificar a colonização por leveduras na mucosa oral de crianças internadas em Hospital Público Infantil: caracterização das leveduras, sensibilidade aos antifúngicos, comunicação e gerenciamento dos achados no período de estudo. Análise de risco da colonização para possíveis casos de septicemia.

3.2 Proposições específicas

1. Isolar as leveduras da mucosa oral de crianças hospitalizadas;
2. Identificar as leveduras, isoladas por métodos tradicionais: Análises macro e micro-morfológicas, formação de blastoconídio, tubo germinativo e características fisiológicas (auxanograma e zimograma).
3. Cultivo em meio de Chromagar; purificação das cepas e diagnóstico presuntivo.
4. Caracterização das cepas pela técnica de espectrometria de massa Maldi-Tof.
5. Comparar os resultados obtidos para a identificação das leveduras - Métodos tradicionais; “Chromagar Candida” e Maldi Tof.
6. Pesquisa dos fatores relacionados a virulência: pesquisa de proteinase.
7. Determinar a sensibilidade/resistência das cepas isoladas pelo método de microdiluição em caldo aos antifúngicos: anfoterina B; nistatina; fluconazol; e voriconazol. A leitura dos antifúngicos foi realizada pelo método EUCAST.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

O presente estudo foi conduzido, de forma prospectiva, em crianças de 0 a 17 anos, internadas no Hospital Infantil Darcy Vargas, a partir de março de 2019 a março de 2020. O referido hospital, subordinado a Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, integrado ao SUS, possui alta complexidade, com 90 leitos, o que lhe confere, segundo Costa (1998), o título de hospital terciário de médio porte. Este mesmo hospital, atende crianças com diversas patologias.

4.1.1 Critérios de Inclusão

Pacientes de 0 a 17 anos, de ambos os sexos, com patologias diferentes, com ou sem doença de base, sem lesão na mucosa oral e internadas no referido hospital. Só participaram da pesquisa, as crianças cujos responsáveis tenham lido e assinado o Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). O termo de assentimento (TALE), foi explicado ao paciente que tem mais de 6 anos.

4.1.2 Critérios de Exclusão

Pacientes com 18 anos ou mais, ou que não estavam internados no referido hospital e pacientes com lesão na mucosa oral .

4.1.3 Comitê de Ética

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em 01 de março de 2019, CAAE: 03211218.2.0000.0075. Também foi aprovado em 07 de maio de 2019 no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Darcy Vargas -HIDV/SES.

4.2 Coleta de Material das crianças

Antes do início das coletas, os responsáveis pelas crianças foram orientados a preencher o “Termo de Consentimento” de livre participação na pesquisa. Nas crianças os seguintes dados foram avaliados: idade, sexo, peso, patologia e tempo de internação.

As coletas foram realizadas com o auxílio do Dr. José Alberto Marzliak, dentista chefe responsável do Hospital Infantil Darcy Vargas.

As coletas foram realizadas, na mucosa oral na internação, durante o período de estadia no hospital, e a cada 10 dias. Os materiais foram coletados com auxílio de “swabs” e, semeados em ágar Sabouraud dextrose (Difco, EUA) (Figura 4.1) e CHROMagar Candida (BioMeriex, França). As culturas isoladas foram armazenadas para posterior ensaios laboratoriais.

Em caso de candidemia, no grupo em estudo, foi retirado o sangue do paciente e do cateter, para se fazer a hemocultura. A semeadura do sangue foi feita em meio de cultura bifásico BACTEC (Difco, EUA). Esse material foi semeado também em ágar sangue pela técnica de rolamento e após crescimento, as culturas foram semeadas em ágar Sabouraud-dextrose.

Figura 4.1- Colônias de *C. albicans* em ágar Sabouraud-dextrose



Fonte: A autora.

4.3 Perfil Fenotípico da Leveduras

4.3.1 Método Tradicional

Os testes empregados seguiram a Monografia. “The Yeasts. A taxonomic study”: análises macro e micro-morfológicas, formação de clamidoconídios, tubo germinativo e características fisiológicas (Kurtzman et al., 2011).

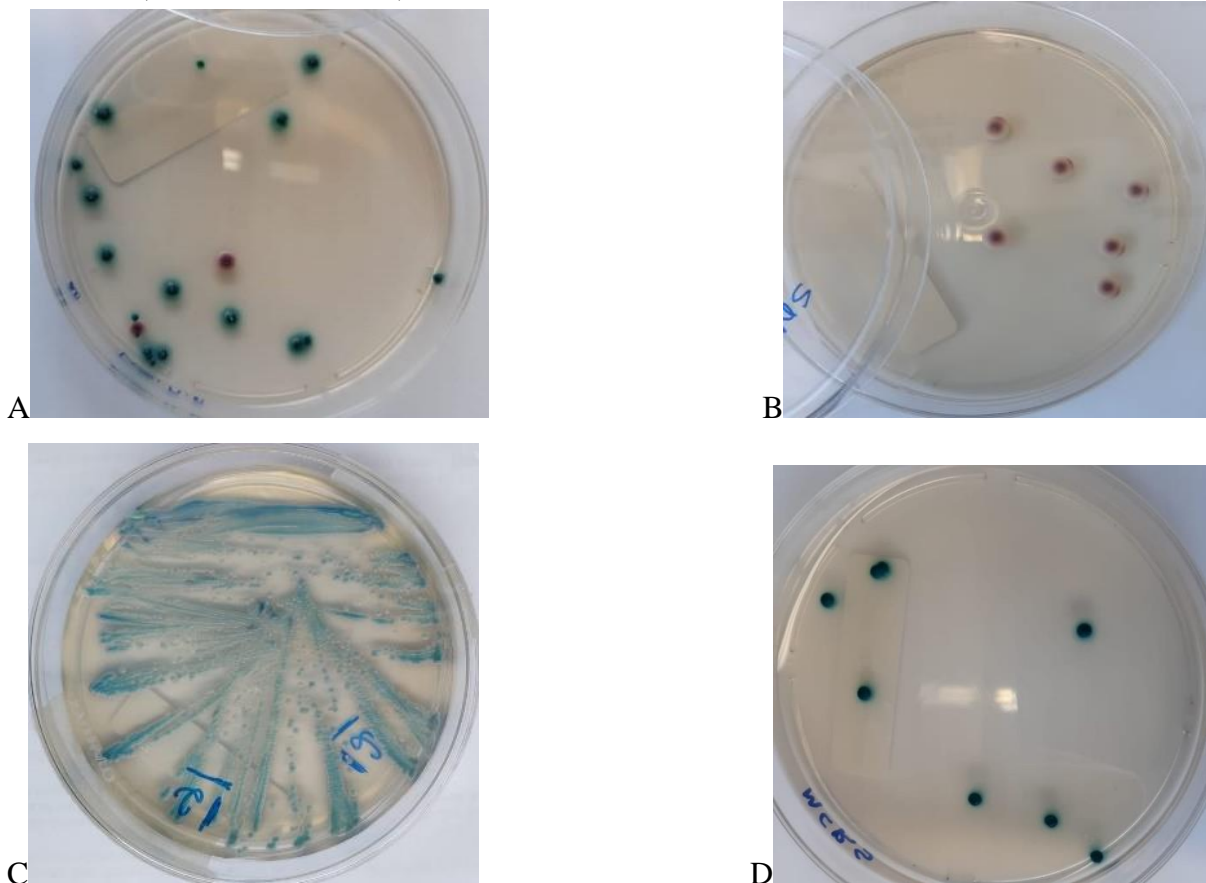
Inicialmente todas as amostras de leveduras isoladas foram semeadas por esgotamento de alça no meio cromogênico “CHROmagar”®.

Esta identificação presuntiva foi interpretada de acordo com as cores apresentada pelas colônias segundo instruções do fabricante.

4.3.1.1 Avaliação da Pureza das Colônias

Após isolamento, as colônias foram avaliadas quanto a pureza, por meio de plaqueamento em meio cromogênico CHROMagar Candida (BBL) (Figura 4.2). Esse procedimento tem, por finalidade isolar e identificar presuntivamente: colônias de coloração verde claro (sugestivas de *C. albicans*), colônias de coloração verde escuro (sugestivas de *C. dubliniensis*), colônias de cor azul (sugestivas de *C. tropicalis*), colônias apresentando coloração rosa em diferentes tonalidades e aspectos (sugestivas de outras espécies de leveduras do gênero *Candida*) (Carrillo Munõz et al., 2001; Quindós et al., 2001; Cooke et al., 2002; Lacaz et al., 2002).

Figura 4.2 - Leveduras semeadas em Chromagar – A) *C. albicans* (colônias verdes) e *C. glabrata* (colônias rosa lilás); B) *C. parapsilosis* (colônias rosas); C) *C. tropicalis* (colônias azuis); D) *C. dubliniensis* (colônias verdes escuras).



Fonte: A autora.

4.3.1.2 Prova do Tubo Germinativo

Foi verificado, em primeiro momento, a habilidade de formação de tubo germinativo ou efeito Reynolds- Braude (Figura 4.3). Para visualização desta característica, uma pequena quantidade de colônia foi transferida para um tubo, previamente esterilizado, contendo 0,5 mL de soro bovino fetal e incubada a 37°C em banho maria, por três horas. Após este período, uma gota dessa suspensão foi examinada ao microscópio, entre lâmina e lamínula. A evidenciação de tubo germinativo configura teste positivo e, presuntivamente, diagnóstico de *C. albicans* (Koneman et al., 2001).

Figura 4.3 - Pesquisa do tubo germinativo efeito Reynolds-Braude



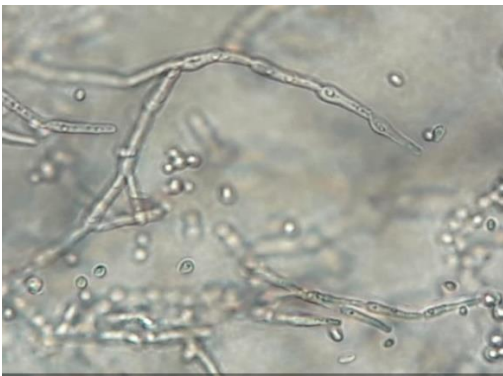
Fonte: A autora.

4.3.1.3 Microcultivo em lâmina

O microcultivo ou técnica de Ridell foi realizado com o objetivo de visualizar as estruturas morfológicas típicas de cada espécie do gênero (Figuras: 4.4, 4.5, 4.6 e 4.7). O meio de cultura ágar fubá, acrescido de Tween 80, com pH ajustado entre 5,8 e 6,2 foi distribuído em camada fina sobre lâminas previamente preparadas em câmara de microcultivo com auxílio de pipeta estéril. Após solidificação do meio, cada amostra foi semeada em três linhas finas, horizontais e paralelas na superfície do ágar e coberta com lamínula. O sistema foi fechado e em seguida incubado a 27°C, por até três dias.

A leitura foi executada observando se a presença de estruturas características como pseudomicélio, arranjo dos blastoconídios (ocorrendo em grupos ou cachos, no início da hifa e/ou ao longo desse, isolados ou aos pares, nos pontos de constrição ou irregularmente distribuídos no pseudomicélio). A presença de clamidoconídios foi anotada como diagnóstico presuntivo de *C. albicans*. As outras espécies do gênero foram avaliadas conforme características morfológicas específicas. O meio de cultura foi obtido comercialmente – ágar corn meal (Difco – EUA) e seu preparo obedeceu às orientações do fabricante.

Figura 4.4- Aspecto microbiológico de *C. parapsilosis*



Fonte: A autora.

Figura 4.5-Aspecto microbiológico de *C. albicans*



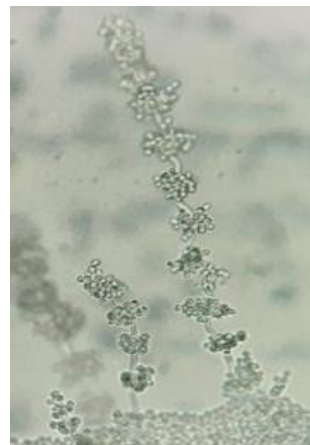
Fonte: A autora.

Figura 4.6 –Aspecto microbiológico mostrando blastoconídios e início de filimentação



Fonte: A autora.

Figura 4.7 – Aspecto microscópico mostrando blastoconídios em cacho



Fonte: A autora.

4.3.1.4 Provas Bioquímicas (Zimograma e Auxanograma)

ZIMOGRAMA

No teste de fermentação de carboidratos (zimograma) foi utilizado o meio basal, distribuído em alíquotas de 2 mL em tubos de ensaio contendo tubos de Durham invertidos, para visualização da produção de CO₂. As amostras foram avaliadas quanto a capacidade de fermentar glicose, galactose, maltose, sacarose, lactose, trealose, xilose, melibiose e rafinose. Para tanto, foi adicionado 1 mL da solução de cada carboidrato, preparadas à concentração de 6% em salina estéril.

AUXANOGRAMA

O auxanograma foi realizado para observar o padrão de assimilação de nove carboidratos (glicose, galactose, maltose, sacarose, lactose, trealose, xilose, melibiose e rafinose) como única fonte de carbono. Para isto, foi preparado o meio de cultivo C (Dfco, EUA).

O inóculo correspondeu a uma concentração celular de $1-6 \times 10^6$ UFC/mL. A mistura obtida na placa, meio de cultivo mais a concentração de células, foi cuidadosamente homogeneizada, evitando-se a formação de bolhas e deixada solidificar a temperatura ambiente. Após solidificação, os carboidratos foram distribuídos em pontos previamente marcados. A incubação foi à temperatura de 27°C, por até 96 horas e a leitura foi realizada diariamente. O resultado foi considerado positivo quando da evidenciação do halo de crescimento em torno de cada carboidrato.

4.3.1.5 Produção de Urease

Para o teste de produção da enzima urease utilizou-se o meio de Christensen (Difco, EUA), que contém como indicador de pH o vermelho de fenol. O meio foi preparado em placas de Petri (60x15 mm), e então foram inoculadas em seu centro cada uma das amostras (cultivadas previamente por 72 horas), incubando-as a 32 °C com observações diárias por até 7 dias. As amostras positivas, ao hidrolisarem a ureia, alteraram o pH do meio de cultivo de ácido para alcalino, modificando a coloração do indicador de pH de amarelo para róseo (Kurtzman et al., 2011).

4.4 Fatores relacionados à Virulência

4.4.1 Produção de Exoenzimas

4.4.1.1 Proteínase (Ruchel et al., 1982)

Após solidificação da mistura, quatro amostras de leveduras, com crescimento de 24 horas, foram repicadas com alça de platina em pontos equidistantes no meio ágar-proteínase (18 g YCB, 2 g Albumina Bovina, 2,5 g Protovit, 18 g ágar e 1000mL água) e, no centro, controle positivo (ATCC 90028 *C. albicans*). As placas foram, então, incubadas a 37°C durante quatro dias.

A presença da enzima foi observada pela formação de um halo translúcido de degradação da proteína ao redor da colônia da levedura (Figura 4.8). A atividade enzimática (Pz) foi medida segundo Price et al. (1982), utilizando-se a razão entre o diâmetro da colônia mais a zona de degradação (ddc), ou seja, $Pz = dc/ddc$. Os resultados do Pz foram interpretados da seguinte maneira: $Pz = 1$ (atividade enzimática negativa, código 1), $0,64 \leq Pz < 1$ (atividade enzimática positiva, código 2), $Pz < 0,64$ (atividade enzimática fortemente positiva, código 3). A cepa ATCC 90028 de *C. albicans* foi utilizada como controle.

Figura 4.8 – Proteinase – halo de degradação ao redor da colônia



Fonte: A autora.

4.5 Espectrometria de Massa - MALDI-TOF

Todas as amostras foram identificadas por espectrometria de massa por meio do MALDI-TOF. Assim, as cepas foram incubadas por 48 horas a 30°C em ágar Sabouraud dextrose e cinco colônias foram transferidas para microtubos de 1,5mL por meio de alça bacteriológica. Após agitação rigorosa com 0,3mL de água destilada, 0,9mL de etanol foi adicionado à cada amostra e então centrifugados a 20.000g por 2 minutos. Após descarte do sobrenadante o sedimento foi secado em ar ambiente. Após, 10µL do sedimento foram misturados com 50µL de ácido fórmico (70%), e volume igual de acetonitrila foi adicionada a amostra. A mistura foi, então, novamente centrifugada a 20.000g por 2 minutos e 1µL do sobrenadante foi adicionado na placa de aço MALDI, que secou em ar ambiente. Em sequência foram adicionados 2µL da matriz (ácido ciano-4-hidróxido-cinnamico em ácido acetonitrila-2,5% trifluoroacético a 50%), que secaram em ar ambiente e a análise foi realizada em um sistema Microflex LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), em triplicata, para avaliar a qualidade e reprodutibilidade dos espectros. Por fim, os espectros no intervalo de

massa $m_z = 2.000$ a 20.000 foram obtidos e analisados no software Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics) (Lima-Neto et al., 2014). Os resultados são expressos em “logscore” e, segundo o fabricante, valores de “logscore” $< 1,7$ são considerados insuficientes para identificação de gênero, entre $1,7$ e $2,0$ são aceitáveis para identificação do gênero, enquanto valores de “logscore” $> 2,0$ são requeridos para uma identificação acurada da espécie.

4.6 Teste de Sensibilidade aos Antifúngicos – Método segundo EUCAST (2020)

4.6.1 Preparação das soluções estoque

Foram utilizados os fármacos em pó, anfotericina B, fluconazol, nistatina e voriconazol para o preparo de soluções estoques (soluções mãe), mantidas congeladas a -70°C . Soluções dos antifúngicos devem ser preparadas levando-se em consideração a potência do lote do pó do antifúngico que será utilizado. A quantidade do pó necessário para preparar a solução mãe deve ser calculada como segue:

$$\text{Peso (g)} = \frac{\text{Volume (L)} \times \text{Concentração (mg/L)}}{\text{Potência (mg/g)}}$$

As soluções mãe (12.800 mg/L para todos os fármacos diluídos em DMSO) foram preparadas a partir da pesagem dos antifúngicos em balança analítica de precisão, dissolvidas nos solventes indicados para cada droga. A anfotericina B e o voriconazol solução mãe foram diluídos em dimetil sulfóxido (DMSO – Sigma Chemical - EUA). A dissolução subsequente dos antifúngicos para o preparo das soluções de uso (tubos) foi realizada em meio RPMI 1640 com L-glutamina e indicador de pH sem bicarbonato (Sigma Chemical, EUA) suplementado com glicose para uma concentração final de 2% (RPMI 2% G) tamponada com $0,165 \text{ mol/L}$ de

tampão MOPS (Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico) [Sigma, EUA] em pH 7.0. O intervalo de concentrações dos testes (já com inóculo) para anfotericina B e voriconazol foi de 0,008 mg/L a 4 mg/L. O fluconazol diluído em DMSO e o intervalo de concentração foi de 0,125 mg/L a 64 mg/L. O intervalo de concentração utilizado nesse teste com a nistatina foi de 0,03 mg/L a 16 mg/L.

4.6.2 Distribuição dos antifúngicos

As soluções de uso dos antifúngicos foram distribuídas em placas de microdiluição descartáveis, com 96 poços de fundo chato (Evergreen Scientific, EUA), com tampas, com capacidade de aproximadamente 300 µL por poço. Foram dispensados 100 µL de cada tubo contendo a solução de uso correspondente do agente antifúngico nos poços de 1 a 10 de cada coluna da placa de microdiluição. Para cada poço das colunas 11 e 12, foi dispensado 100 µL do meio RPMI 2% G com o dobro da concentração. Portanto, cada coluna de 1 a 10 conterá 100 µL do antifúngico em meio RPMI 2% G. As colunas 11 e 12 conterão o meio RPMI 2% G.

As placas foram seladas com filme plástico (Seal Plate, Excel Scientific, EUA) e estocadas a -70°C, sem perda da potência do antifúngico. As placas contendo anfotericina B foram protegidas da luz, por este fármaco ser fotossensível.

4.6.3 Preparação do inóculo

Para realização do teste foram repicadas os 48 isolados em ágar Sabouraud-dextrose (Difco, EUA) 24 horas antes do teste. Foram feitas suspensões com 5 mL de água destilada

estéril para se obter uma turvação correspondente à escala 0,5 de Mc Farland ($1-5 \times 10^6$ UFC/mL), medindo a absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda de 530 nm. Feito isso, 1 mL da suspensão foi diluída em 9 mL de meio RPMI, ficando com uma concentração final de levedura de $1-5 \times 10^5$ UFC/mL.

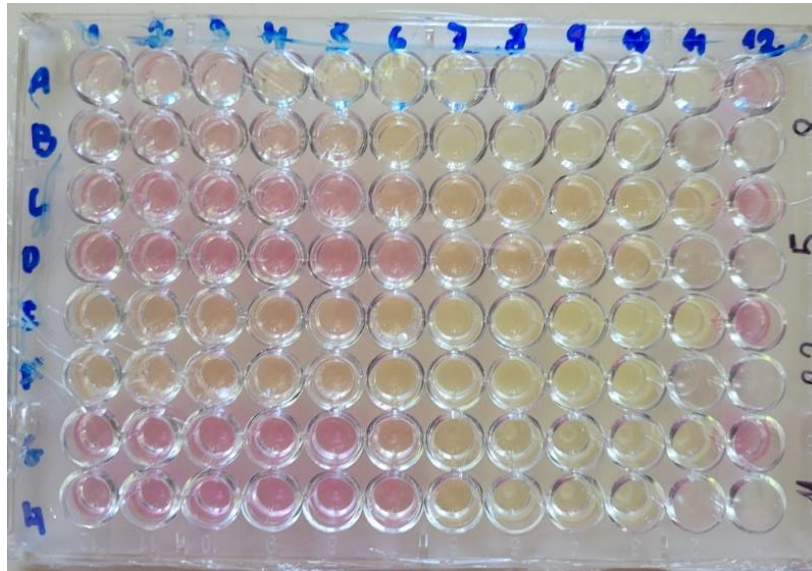
4.6.4 Execução do teste de microdiluição

As placas de microdiluição foram inoculadas dentro de 30 min da preparação da suspensão do inóculo a fim de manter a concentração de células. Os tubos contendo os inóculos dos diferentes isolados, foram devidamente identificadas. Com uma pipeta multicanal (Eppendorf) com 11 ponteiros, foram distribuídos 100 μ L da suspensão da levedura A na fileira A, nos orifícios de 2 a 11. A levedura B foi distribuída na fileira B e assim por diante. Na fileira G foi distribuída a cepa padrão *C. krusei* ATCC 6258 e na fileira H a cepa padrão *C. parapsilosis* ATCC 22019. A coluna 11 é o controle de crescimento, contendo 100 μ L do meio estéril livre de antifúngicos, foram inoculadas 100 μ L da mesma suspensão do inóculo. A coluna 12 contendo 200 μ L do meio RPMI, lote usado para o preparo do inóculo como controle de esterilidade.

Com a adição do inóculo foi feita uma diluição de 1:2 dos fármacos, obtendo-se um gradiente de concentração de 0,125 μ g/mL - 64 μ g/mL e 0,008 μ g/mL - 4 μ g/mL para anfotericina B e voriconazol. Para nistatina o intervalo foi de 0,03 a 16 mg/L.

As placas foram incubadas a 35°C sem agitação durante o 24 hs. As placas de microdiluição (Figura 4.9) foram lidas em um leitor de placas de microdiluição no comprimento de onda de 530 nm recomendado para determinar a absorbância. Foram compilados os resultados de CIM obtidos das placas validadas pelas cepas padrão ATCC. Resultados de cepas padrão Quadros 5.1 e 5.2 segundo EUCAST.

Figura 4.9 - Placa de microdiluição em caldo, pós incubação (coloração amarela indica o crescimento fúngico)



Fonte: A autora.

Quadro 4.1- Resultados de cepa-padrão *Candida krusei* ATCC 6258 frente aos antifúngicos, segundo EUCAST Versão 6.0, 04/05/2022

AGENTE ANTIFÚNGICO	MIC b (mg/L)	
	Alvo	Range
Anfotericina B	0,25-0,5	0,125-1
Anidulafungina	0,03	0,016-0,6
Caspofungina	NAc	NAc
Fluconazol	32	16-64
Flucitosina	2	1-4
Isavuconazol	0,03	0,016-0,06
Itraconazol	0,06	0,03-0,125
Micafungina	0,06	0,03-0,125
Voriconazol	0,06-0,125	0,03-0,25
Posaconazol	0,03	0,016-0,06

ATCC “American Type Culture Collection”

b- Cepas de *Candida* requerem leitura do MIC em espectrofotômetro após 1 dia de incubação

c- Não avaliado

Quadro 4.2- Resultados de cepa-padrão *Candida parapsilosis* ATCC 22019 frente aos antifúngicos, segundo EUCAST Versão 6.0, 04/05/2022

AGENTE ANTIFÚNGICO	MIC b (mg/L)	
	Alvo	Range
Anfotericina B	0,25-0,5	0,125-1
Anidulafungina	0,5	0,25-1
Caspofungina	NAc	NAc
Fluconazol	1	0,5-2
Flucitosina	0,25	0,125-0,5
Isavuconazol	0,016	0,008-0,03
Itraconazol	0,06	0,03-0,125
Micafungina	1	0,5-2
Voriconazol	0,03	0,016-0,06
Posaconazol	0,03	0,016-0,06

ATCC “American Type Culture Collection”

b- Cepas de *Candida* requerem leitura do MIC em espectrofotômetro após 1 dia de incubação

c- Não avaliado

4.6.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM do antifúngico é definida como a menor concentração, registrada em mg/L, que inibe o crescimento do fungo em percentual pré-definido (50%, 90%, ou inibição total). A concentração inibitória mínima (CIM) de cada antifúngico indica o ponto de corte “endpoint” e é definida como o primeiro poço com redução de 50% ou mais do crescimento, para os azólicos, e de 90% ou mais para anfotericina B e nistatina, quando comparado ao controle positivo (Arikan et al., 2002).

Os resultados de valores de CIM foram interpretados de acordo com o Quadro 5.3.

Quadro 4.3 - Visão geral de pontos de corte, clínicos e epidemiológicos para espécies de leveduras, usando o EUCAST E.Def 7.3, (EUCAST 2022)

Espécies	Fármacos	ECOFF (mg/L)		Pontos de corte clínicos (mg/L)	
		WT ≤	S≤	I	R>
<i>C. albicans</i>	Anfotericina B	1	1		1
	Anidulafungina	0,03	0,03		0,03
	Micafungina	0,016	0,016		0,016
	Fluconazol	0,5	2	4	4
	Itraconazol	0,03	0,06		0,06
	Posaconazol	0,06	0,06		0,06
	Voriconazol	0,03	0,06	0,125-0,25	0,25
	Isavuconazol	ND	ND		ND
<i>C. dubliniensis</i>	Anfotericina B	0,25	1		1
	Anidulafungina	ND			
	Micafungina	ND			
	Fluconazol	0,5*	2	4	4
	Itraconazol	0,06	0,06		0,06
	Posaconazol	0,06	0,06		0,06
	Voriconazol	0,03	0,06	0,125-0,25	0,25
	Isavuconazol	ND	ND		ND
<i>C. glabrata</i>	Anfotericina B	1	1		1
	Anidulafungina	0,06	0,06		0,06
	Micafungina	0,03	0,03		0,03
	Fluconazol	16	0,01	≤16	16
	Itraconazol	2	ND		ND
	Posaconazol	1	ND		ND
	Voriconazol	1	ND		ND
	Isavuconazol	ND	ND		ND
<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B	1	1		1
	Anidulafungina	4	4		4
	Micafungina	2	2		2
	Fluconazol	2	2	4	4
	Itraconazol	0,125	0,125		0,125
	Posaconazol	0,06	0,06		0,06
	Voriconazol	0,06	0,125	0,25	0,25
	Isavuconazol	ND	ND		ND
<i>C. tropicalis</i>	Anfotericina B	1	1		1
	Anidulafungina	0,06	0,06		0,06
	Micafungina	0,06	ND		ND
	Fluconazol	1	2	4	4
	Itraconazol	0,125	0,125		0,125
	Posaconazol	0,06	0,06		0,06
	Voriconazol	0,125	0,125	0,25	0,25
	Isavuconazol	ND	ND		ND

ECOFF (ponto de corte epidemiológico) - valor de MIC mais alto para isolados desprovidos de fenotipicamente detectáveis mecanismos de resistência.

ND – Não determinado

4.7 Procedimento de Análise dos Resultados

Os dados foram tabulados e analisados com auxílio da planilha eletrônica Microsoft-Excel.

As variáveis analisadas foram sexo, idade, tipo de patologia, presença ou ausência de leveduras e testes micológicos.

Estes testes foram supervisionados pelo Prof. Dr. Eliseu Wartzman (Fac. Saúde Pública - USP).

Os valores de MIC foram avaliados segundo moda, intervalo, MIC 50 e MIC 90.

5 RESULTADOS

No período de setembro de 2019 a março de 2020, foram estudados 80 pacientes com idades entre 0 e 17 anos, internados no Hospital Infantil Darcy Vargas. Dos 80 pacientes, 20 com idade entre 3 e 5 anos; 16 com idades entre 6 e 8 anos; 14 com idades entre 12 e 14 anos; 12 com idades entre 9 e 11 anos; 10 com idades entre 15 e 17 anos e 8 com idades entre 0 e 2 anos (Figura 5.1).

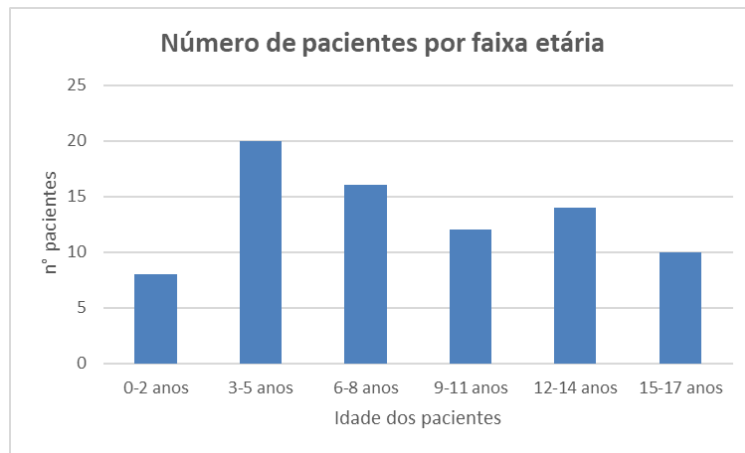
Do total de pacientes incluídos nesse estudo, 76% (61/80) apresentam algum tipo de câncer (Figura 5.2). Desses 80 pacientes, 61,25% (49/80) pacientes do sexo masculino, sendo 79,6% (39/49) com câncer e dentre os 31 pacientes do sexo feminino, 71% (22/31) com câncer (Figura 5.3).

Foram feitas 167 coletas da mucosa oral dos pacientes. Destas 167 coletas, 43 amostras biológicas foram positivas para leveduras, destas, 5 apresentaram 2 espécies ou gêneros diferentes na mesma amostra da mucosa oral, perfazendo então 48 cepas (Figura 5.4). Das 48 cepas de leveduras, 72,92% (35/48) identificadas como *C. albicans* “sensu stricto” (ss), 14,6% (7/48) *C. parapsilosis* “sensu stricto” (ss), 4,16% (2/48) *C. dubliniensis*, 2,08% (1/48) *C. glabrata* “sensu stricto” (ss), 2,08% (1/48) *C. tropicalis*, 2,08% (1/48) *C. fabianii* e 2,08% (1/48) *Kodamaea ohmeri* (Figura 5.9 e Tabela 5.1). O paciente P1 apresentou candidemia por *C. parapsilosis* “sensu stricto” (ss) isolada do sangue e cateter e o paciente P24 apresentou colonização da mucosa oral e sangue por *C. parapsilosis* “sensu stricto” (ss) (Tabela 5.1). Denominamos P como sigla para paciente.

Dos 80 pacientes estudados, 26 (32,5%) apresentaram cultura positiva para leveduras. Destes, 30,8% (8/26) apresentaram colonização oral com amostras sequenciais no período estudado e o paciente P24 teve colonização oral e candidemia pela mesma espécie de levedura e o paciente P1 apresentou fungemia no sangue e cateter (Tabela 5.1).

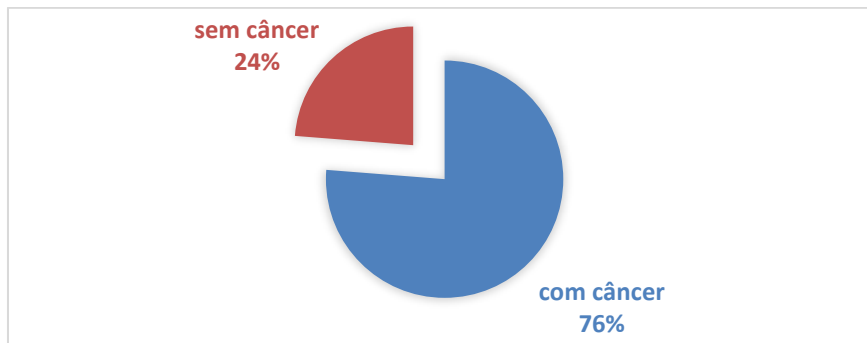
As faixas etárias com maior número de isolamento de leveduras da mucosa oral foram: de 3-5 anos e 6-8 anos com 6 pacientes em cada; 9-11 anos e 15-17 anos com 4 pacientes respectivamente; 0-2 anos e 12-14 anos com 3 pacientes respectivamente (Figura 5.5).

Figura 5.1 - Distribuição dos 80 pacientes por faixa etária incluídos neste estudo



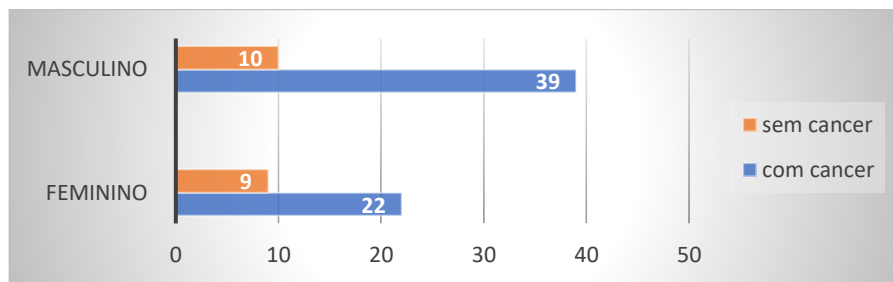
Fonte: A autora.

Figura 5.2 - Porcentagem de pacientes com e sem câncer internados no Hospital Infantil Darcy Vargas, incluídos nesse estudo



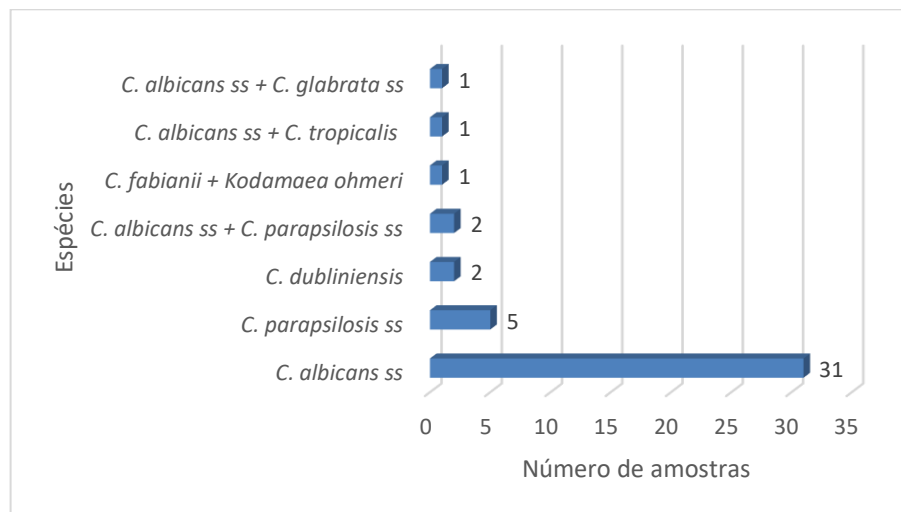
Fonte: A autora.

Figura 5.3 - Distribuição numérica dos 80 pacientes internados no Hospital Infantil Darcy Vargas divididos por gênero, com e sem câncer



Fonte: A autora.

Figura 5.4 - Distribuição das amostras de leveduras obtidas da mucosa oral de 26 pacientes internados no Hospital Infantil Darcy Vargas



Fonte: A autora.

Figura 5.5 – Distribuição dos 26 pacientes com isolamento de leveduras da mucosa oral por faixa etária



Fonte: A autora.

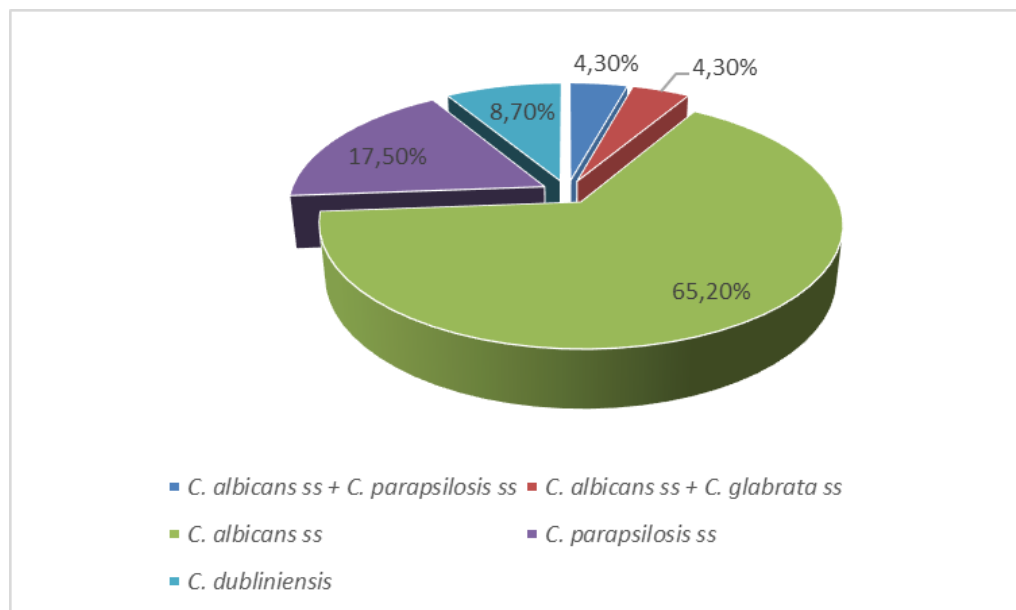
5.1 Colonização Oral - Dois ou mais isolamentos sequenciais de leveduras

Dos 26 pacientes que apresentaram amostras positivas para leveduras, 30,8% (8/26) desses pacientes apresentaram colonização oral durante o período do estudo, pelo menos com duas amostras sequenciais positivas para leveduras. Destes 8 pacientes, obtivemos o total de 23 amostras da mucosa oral positivas para leveduras. Os pacientes foram: P3, P4, P5, P8, P14, P16, P23 e P24 (Tabela 5.1). Sendo que o P3(paciente de 11 anos do sexo feminino com adenocarcinoma) teve 3 amostras positivas para *C. albicans ss*; P4 (paciente de 1 ano do sexo masculino com neuroblastoma) teve 2 amostras positivas para *C. parapsilosis ss*; P5 (paciente de 16 anos do sexo feminino com sarcoma sinovial) teve 2 amostra de *C. dubliniensis* e 1 de *C. albicans ss + C. parapsilosis ss*; P8 (paciente de 17 anos do sexo feminino com leucemia mieloide aguda (LMA)) teve 2 amostras de *C. albicans ss* e 1 de *C. albicans ss + C. glabrata ss*; P14 (paciente de 5 meses do sexo masculino com neuroblastoma) teve 4 amostras de *C. albicans ss*; P16 (paciente de 8 anos do sexo feminino com LMA) teve 3 amostras de *C. albicans ss*, P23 (paciente de 15 anos do sexo masculino com LMA) teve 3 amostras *C.*

albicans ss e P24 (paciente de 3 anos do sexo feminino com LLA) teve 2 amostras de *C. parapsilosis* ss.

Destas 23 amostras biológicas positivas coletadas dos 8 pacientes com colonização oral, 65,2% (15/23) amostras de *C. albicans* ss; 4,3% (1/23) amostra de *C. albicans* ss + *C. parapsilosis* ss, 4,3% (1/23) amostra de *C. albicans* ss + *C. glabrata* ss, 8,7% (2/23) amostras de *C. dubliniensis* e 17,5% (4/23) amostras de *C. parapsilosis* ss (Figura 5.6).

Figura 5.6 - Frequência das cepas de leveduras isoladas dos 8 pacientes que apresentaram colonização oral (dois ou mais isolamentos sequenciais)



Fonte: A autora.

5.2 Sangue e cateter

Dos 80 pacientes estudados, o paciente P1 de 8 anos do sexo masculino com linfoma não Hodgkin (LNH), apresentou candidemia por *Candida parapsilosis ss* isolada do sangue e cateter. Esse paciente não apresentou colonização oral. Já o paciente P24 de 3 anos do sexo feminino com leucemia linfóide aguda (LLA), apresentou candidemia por *C. parapsilosis ss* isolada do sangue e teve colonização na mucosa oral pela mesma espécie (Tabela 5.1).

5.3 Óbitos das crianças no período de estudo

Dos 26 pacientes que apresentaram amostras da mucosa oral positivas para leveduras, 19,2% (5/26) evoluíram para óbito (Tabela 5.1). Dois desses pacientes apresentaram uma das amostras com mais de uma espécie de levedura: 1 amostra de *C. albicans ss* + *C. parapsilosis ss* e outro 1 amostra de *C. albicans ss* + *C. tropicalis*.

Dos 5 pacientes que evoluíram para óbito, 3 apresentaram colonização oral por leveduras, que foram: Pacientes P3 e P16 colonizados por *C. albicans ss* e paciente P5 colonizado por *C. dubliniensis* (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Identificação das espécies de leveduras isoladas da mucosa oral dos pacientes estudados no Hospital Infantil Darcy Vargas nos anos de 2019 e 2020

P	N	Cavidade oral	Óbito
***1	1	<i>C. albicans ss</i>	-
2	1	<i>C. albicans ss</i>	-
***3	3	<i>C. albicans ss</i> (3) ***	X
***4	2	<i>C. parapsilosis ss</i> (2) ***	-
***5	3	<i>C. dubliniensis</i> (2) ***/ <i>C. albicans ss e C. parapsilosis ss</i>	X
6	1	<i>C. albicans ss</i>	-
7	1	<i>C. albicans ss</i>	-
***8	3	<i>C. albicans ss</i> (2) ***/ <i>C. albicans ss e C. glabrata ss</i>	-
9	1	<i>C. albicans ss</i>	-
10	1	<i>C. albicans ss</i>	-
11	1	<i>C. albicans ss</i>	-
12	1	<i>C. albicans ss e C. tropicalis</i>	X
13	1	<i>C. albicans ss</i>	-
14	4	<i>C. albicans ss</i> (4)	-
15	1	<i>C. albicans ss</i>	X
16	3	<i>C. albicans ss</i> (3)	X
17	1	<i>C. fabianni e Kodamaea ohmeri</i>	-
18	1	<i>C. parapsilosis ss</i>	-
19	2	<i>C. albicans ss</i> (2)	-
20	1	<i>C. albicans ss</i>	-
21	2	<i>C. albicans ss e C. parapsilosis ss / C. albicans ss</i>	-
22	1	<i>C. albicans ss</i>	-
23	3	<i>C. albicans ss</i> (3)	-
24	2	<i>C. parapsilosis ss</i> (2)	-
25	1	<i>C. albicans ss</i>	-
26	1	<i>C. albicans ss</i>	-
Total	43	48	5

P: número do paciente; N: número de amostras biológicas positivas; X: evolução para óbito

***Pacientes colonizados (2 ou mais isolamentos sequenciais de leveduras)

***Paciente P1 teve candidemia por *C. parapsilosis* no sangue e cateter

***Paciente P24 teve colonização oral, no sangue e cateter por *C. parapsilosis*

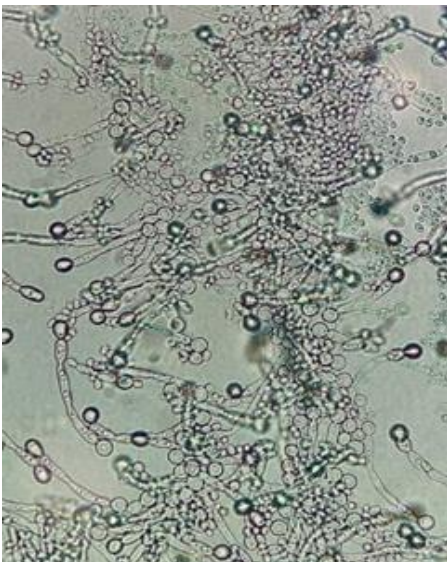
Fonte: A autora.

5.4 Diferenciação de *C. albicans* e *C. dubliniensis*

Trinta e sete amostras foram identificadas inicialmente por métodos tradicionais como: *C. albicans*, foram avaliadas quanto ao seu crescimento ou não a 42° C e cultivadas em meio cromogênico (CHROMagar), para triagem de identificação de *C. dubliniensis*. De todas essas amostras, somente 2 apresentaram colônias verde escuras, presuntivo de *C. dubliniensis*, entretanto cresceram a 42°C sugestivo de *C. albicans*.

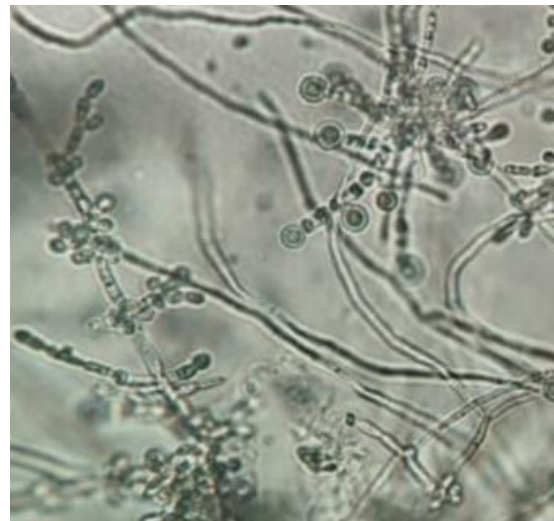
Para confirmarmos essas suspeitas, realizamos a metodologia de Maldi-Tof, onde foi confirmado que se tratava de 35 amostras de *C. albicans* “sensu stricto” (ss) e de 2 amostras de *C. dubliniensis*.

5.7- Aspecto microbiológico de *C. albicans* ss



Fonte A autora.

Figura 5.8- Aspecto microbiológico de *C. dubliniensis*



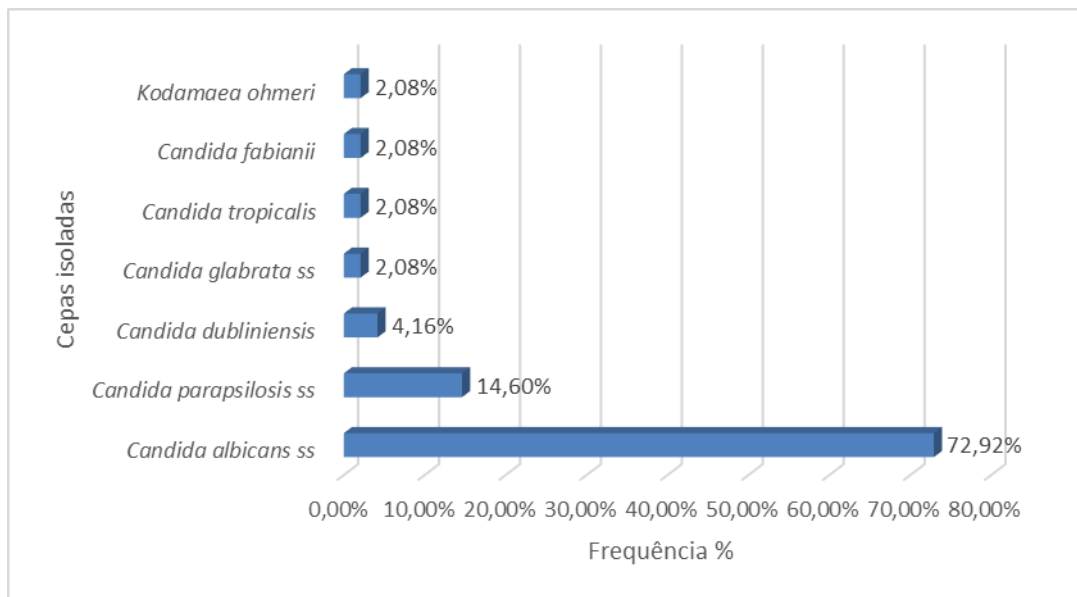
Fonte A autora.

5.5 Caracterização das cepas pela técnica de espectrometria de massa Maldi-Tof.

Todas as amostras isoladas da mucosa oral foram estudadas por métodos tradicionais, semeadas em meio cromogênico, isoladas e também foram identificadas pela técnica de espectrometria de massa. Do total de 48 cepas de leveduras isoladas de mucosa oral, 72,92% (35/48) identificadas como *C. albicans* “sensu stricto”, 14,6% (7/48) *C. parapsilosis* “sensu stricto”, 4,16% (2/48) *C. dubliniensis*, 2,08% (1/48) *C. glabrata* “sensu stricto”, 2,08% (1/48) *C. tropicalis*, 2,08% (1/48) *C. fabianii* e 2,08% (1/48) *Kodamaea ohmeri* (Figura.5.9).

Duas amostras de *C. parapsilosis* “sensu stricto” (ss) foram isoladas do sangue e cateter do paciente P1 e 1 amostra de *C. parapsilosis* ss foi isolada do sangue do paciente P24 (Tabela 5.1).

Figura 5.9 - Frequência das cepas de leveduras isoladas da mucosa oral dos pacientes internados no Hospital Infantil Darcy Vargas



Fonte A autora.

5.6 Comparação de identificação dos métodos tradicionais, “Chromagar Candida” e Maldi-Tof

Como podemos verificar na Tabela 5.2, o nível de concordância entre a metodologia fenotípica tradicional e a técnica de Maldi-Tof, na identificação das cepas isoladas foi de 91,6% (44/48). As únicas amostras que apresentaram discordância entre as metodologias foram dos pacientes 5 (P5) e 17 (P17). Em relação ao P5, nos métodos tradicionais, identificou-se 2 cepas como *C. albicans* e após análise de Maldi-Tof observou-se que se tratava de 2 cepas de *C. dubliniensis*. Em relação ao P17, nos métodos tradicionais, identificou-se como *C. parapsilosis* e após análise de Maldi-Tof observou-se que se tratava de *C. fabianii* e *Kodamaea ohmeri*. Já a comparação entre “Chromagar Candida” e a identificação das cepas por Maldi-Tof, foi de 100% (48/48) de concordância.

Tabela 5.2 - Comparação de identificação dos métodos tradicionais, “Chromagar Candida” e Maldi-Tof em coletas da mucosa oral dos pacientes internados no Hospital Infantil Darcy Vargas

P	Identificação por métodos tradicionais	T. G.	Crescimento Chromagar	Clamidoconídeo em ágar fubá +tween 80 -*/	Maldi-Tof
1	<i>C. albicans</i>	+	Verde	+	<i>C. albicans ss</i>
2	<i>C. albicans</i>	+	Verde	+	<i>C. albicans ss</i>
3	<i>C. albicans</i> (3)	+	Verde	+	<i>C. albicans ss</i> (3)
4	<i>C. parapsilosis</i> (2)	-	Rosa	-	<i>C. parapsilosis ss</i> (2)
***5	<i>C. albicans</i> (2)/ <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i>	+	Verde escuro	+	<i>C. dubliniensis</i> (2)
		+	Verde	+	<i>C. albicans ss</i> e <i>C. parapsilosis ss</i>
			Rosa	-	<i>parapsilosis ss</i>
6	<i>C. albicans</i>	+	Verde	+	<i>C. albicans ss</i>
7	<i>C. albicans</i>	+	Verde	+	<i>C. albicans ss</i>
8	<i>C. albicans</i> (2)/ <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i>	+	Verde	+	<i>C. albicans ss</i> (2)
			Verde	+	<i>C. albicans ss</i> e <i>C. glabrata ss</i>
			Rosa-lilás	-	<i>glabrata ss</i>
9	<i>C. albicans</i>	+	Verde	+	<i>C. albicans ss</i>
10	<i>C. albicans</i>	+	Verde	+	<i>C. albicans ss</i>
11	<i>C. albicans</i>	+	Verde	+	<i>C. albicans ss</i>
12	<i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i>	+	Verde	+	<i>C. albicans ss</i> e <i>C. tropicalis</i>
		-	Azul	-	<i>tropicalis</i>
13	<i>C. albicans</i>	+	Verde	+	<i>C. albicans ss</i>
14	<i>C. albicans</i> (4)	+	Verde	+	<i>C. albicans ss</i> (4)
15	<i>C. albicans</i>	+	Verde	+	<i>C. albicans ss</i>
16	<i>C. albicans</i> (3)	+	Verde	+	<i>C. albicans ss</i> (3)
***17	<i>C. parapsilosis</i>	-	Rosa	-	<i>C. fabianii</i>
			Azul	-	<i>Kodamaea ohmeri</i>
18	<i>C. parapsilosis</i>	-	Rosa	-	<i>C. parapsilosis ss</i>
19	<i>C. albicans</i> (2)	+	Verde	+	<i>C. albicans ss</i> (2)
20	<i>C. albicans</i>	+	Verde	+	<i>C. albicans ss</i>
21	<i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i>	+	Verde	+	<i>C. albicans ss</i> e <i>C. parapsilosis ss</i>
		-	Rosa	-	<i>parapsilosis ss</i>
	<i>C. albicans</i>	+	Verde	+	<i>C. albicans ss</i>
22	<i>C. albicans</i>	+	Verde	+	<i>C. albicans ss</i>
23	<i>C. albicans</i> (3)	+	Verde	+	<i>C. albicans ss</i> (3)
24	<i>C. parapsilosis</i> (2)	-	Rosa	-	<i>C. parapsilosis ss</i> (2)
25	<i>C. albicans</i>	+	Verde	+	<i>C. albicans ss</i>
26	<i>C. albicans</i>	+	Verde	+	<i>C. albicans ss</i>

P: número do paciente; T.G.: tubo germinativo.

***Paciente que apresentou discordância entre as metodologias

ss: “sensu stricto”

Fonte: A autora.

5.7 Atividade enzimática – Proteinase

A atividade enzimática para proteinase, resultantes de halos transparentes (degradação total das proteínas) ocorreu em 96% (45/48) das leveduras isoladas da mucosa oral. A maioria das amostras estudadas 70,8% (34/48) apresentaram índice 3, reação fortemente positiva para proteinase, 25% (12/48) apresentaram índice 2, reação positiva para proteinase e apenas 4,2% (2/48) apresentaram ausência de atividade enzimática. Do total de 35 cepas de *Candida albicans* ss, 25,7% (9/35) produziram atividade positiva para proteinase (índice 2), 68,6% (24/35) produziram atividade fortemente positiva e 5,7% (2/35) apresentaram ausência de atividade para proteinase. Com relação as cepas de *C. parapsilosis* ss, 85,7% (6/7) apresentaram atividade fortemente positiva (índice 3) e 14,3% (1/7) atividade positiva (índice 2). Com relação demais espécies de leveduras, as 2 cepas de *C. dubliniensis*, *C. glabrata* ss e *C. tropicalis* apresentaram atividade fortemente positiva (índice 3), já as cepas de *C. fabianii* e *K. ohmeri* apresentaram reação positiva (índice 2). (Tabela 5.3)

As duas amostras de *C. parapsilosis* ss do sangue e cateter do paciente P1 apresentaram atividade enzimática fortemente positiva para proteinase (índice 3). Tanto a amostra do sangue, quanto a isolada da mucosa oral do paciente P24 apresentou atividade enzimática fortemente positiva para proteinase (índice 3).

Tabela 5.3 – Atividade da enzima proteinase isoladas da mucosa oral dos pacientes internados no Hospital Infantil Darcy Vargas

Espécies de leveduras	Índice de atividade enzimática (Pz)			Total
	1	2	3	
<i>Candida albicans</i>	2	9	24	35
<i>Candida parapsilosis</i>	0	1	6	7
<i>Candida glabrata</i>	0	0	1	1
<i>Candida fabianii</i>	0	1	0	1
<i>Candida dubliniensis</i>	0	0	2	2
<i>Kodamaea ohmeri</i>	0	1	0	1
<i>Candida tropicalis</i>	0	0	1	1

Pz = Valores da atividade enzimática, segundo Price et al (1982): Pz = 1 (ausência de atividade enzimática, índice 1); $0,64 \leq Pz < 1$ (atividade enzimática positiva, índice 2); $Pz < 0,64$ (atividade enzimática fortemente positiva, índice 3). Fonte: A autora.

5.8 Sensibilidade aos antifúngicos – Metodologia de Microdiluição em Caldo pelo método EUCAST

Os testes de sensibilidade antifúngica foram realizados em 48 cepas de leveduras frente a 4 antifúngicos: anfotericina B, voriconazol, fluconazol e nistatina. Também utilizamos as cepas padrão ATCC 6258 (*C. krusei*) e ATCC 22019 (*C. parapsilosis*) e os resultados dos MICs caíram no intervalo esperado segundo EUCAST (Quadro 4.1 e 4.2 respectivamente).

A Tabela 5.5 apresenta a distribuição de valores dos MICs de 4 fármacos frente as 48 cepas de leveduras provenientes da mucosa oral de pacientes internados no referido hospital infantil. Os valores de MODA, MIC50, MIC90 e intervalo das espécies estão apresentadas na Tabela 5.6.

Os dados de sensibilidade e resistência das cepas de leveduras estudadas estão demonstrados na Tabela 5.4. Podemos observar dentre as 35 cepas de *C. albicans ss* que: frente a anfotericina B, 82,9% (29/35) foram sensíveis e 17,1% (6/35) resistentes; frente ao voriconazol, 60% (21/35) foram sensíveis, 25,7% (9/35) intermediários e 14,3% (5/35) resistentes; frente ao fluconazol, 91,4% (32/35) foram sensíveis, 2,9% (1/35) intermediário e 5,7% (2/35) resistentes. Em relação a nistatina, não podemos classificar como sensível ou resistente, pois, não temos parâmetros pelo EUCAST, mas podemos observar através de nossos resultados que os MICs da grande das cepas de *C. albicans ss* apresentaram MIC 16>mg/L (22/35), ou seja, nestes, a nistatina não inibiu o crescimento das cepas. As outras cepas de *C. albicans ss* frente a nistatina, resultaram em MIC de 1mg/L (3/35), MIC de 2 mg/L (6/35), MIC de 4 mg/L (3/35) e MIC de 8 g/L (1/35).

Segundo os pontos de cortes de cortes clínicos adotados, 6 cepas de *C. albicans ss* foram resistentes a AmB, 5 resistentes ao VCZ e 2 resistentes ao FCZ. Os MIC50, MIC90 e intervalos foram: 1 mg/L, 2 mg/L e 0,03-2mg/L para AMB, 0,06mg/L, 0,35 mg/L e 0,03-1 mg/L para VCZ, 0,5 mg/L, 2 mg/L e 0,25-8mg/L para FCZ, 16> mg/L, 16> mg/L e 1-6 mg/L para nistatina. A cepa de *C. albicans ss* do paciente P8 apresentou resistência cruzada a 2 azóis: VCZ (0,5 mg/L) e FCZ (8 mg/L). A cepa de *C. albicans ss* do paciente P15 apresentou resistência a AMB (2 mg/L) e VCZ (0,5 mg/L) e intermediário (4 mg/L) para FCZ. A cepa de *C. albicans ss* do paciente P23 apresentou resistência a AMB (2 mg/L), VCZ (0,5 mg/L) e FCZ (8 mg/L), mostrando ser multirresistente e a outra cepa de *C. albicans ss* desse mesmo paciente,

apresentou resistência a AmB (2 mg/L) e intermediário (0,12 mg/L) para VCZ. A cepa de *C. albicans ss* do paciente P1 mostrou resistência ao voriconazol (1 mg/L). Já as cepas de *C. albicans ss* dos pacientes P10 e P21 mostraram resistência a anfotericina B (2 mg/L).

Em relação a sensibilidade e resistência das 7 cepas de *C. parapsilosis ss*: frente a anfotericina B, 71,4% (5/7) foram sensíveis e 28,6% (2/7) foram resistentes; frente ao voriconazol e ao fluconazol, 100% (7/7) cepas foram sensíveis. Frente a nistatina, 28,6% (2/7) obtiveram MIC de 1 mg/L, 42,8% (3/7) MIC de 2 mg L e 28,6% (2/7) de MIC de 4 mg/L. Devido ao número reduzido (10<) de cepas de *C. parapsilosis ss*, não conseguimos calcular o MIC50 e MIC90. Os intervalos foram: 0,5-2 m/L para AMB, 0,05-0,12 mg/L para VCZ, 0,25-2 mg/L para FCZ e 1-4 mg/L para NIS. As 2 cepas de *C. parapsilosis ss* do paciente P4 apresentaram resistência a AMB (2 mg/L).

A sensibilidade e resistência da cepa de *C. glabrata ss*: frente anfotericina e ao voriconazol foi sensível, e foi intermediário para fluconazol (8 mg/L) e em relação a nistatina, apresentou MIC 16> mg/L (a nistatina não inibiu o crescimento dessa cepa). Os intervalos foram: 1 mg/L para AMB, 0,5 mg/L para VCZ, 8 mg/L para FCZ e 16> mg/L para NIS. Já a cepa *C. tropicalis* apresentou sensibilidade a anfotericina B, resistência ao voriconazol (0,5 mg/L) e ao fluconazol (8 mg/L), mostrando resistência cruzada a 2 azóis e frente a nistatina apresentou MIC 16> mg/L (a nistatina não inibiu o crescimento dessa cepa). Os intervalos foram: 1 mg/L para AMB, 0,5 mg/L para VCZ, 8 mg/L para FCZ e 2 mg/L para NIS.

Quanto as 2 cepas de *C. dubliniensis*, ambas foram sensíveis a AMB, FCZ e VCZ. Em relação a nistatina, a primeira cepa apresentou MIC de 1 mg/L e a segunda apresentou MIC de 0,03 mg/L. Os intervalos foram: 0,25-0,5 mg/L para AMB, 0,03 mg/L para VCZ, 0,25-0,5 para FCZ e 0,03-1 mg/L para NIS.

Para as cepas de *C. fabianii* e *K. ohmeri*, não podemos classificar como sensíveis ou resistentes, pois não temos parâmetros pelo EUCAST. A cepa de *C. fabianii* apresentou MIC de 2 mg/L frente a anfotericina B, fluconazol e nistatina e 0,12 mg/L frente ao voriconazol. Os intervalos foram: 2 mg/L para AMB, FCZ e NIS; 0,12 mg/L para VCZ. Já a cepa de *K. ohmeri*, apresentou MIC de 0,25 mg/L frente a anfotericina B, MIC de 0,06 mg/L frente ao voriconazol, MIC de 2 mg/L frente ao fluconazol e MIC de 16> mg/L (nistatina não inibiu o crescimento dessa cepa) frente a nistatina. Os intervalos foram: 0,25 mg/L para AMB, 0,06 mg/L para VCZ, 2 mg/L para FCZ e 16> mg/L para NIS.

Tabela 5.4 – Classificação de cada espécie de levedura frente aos 4 antifúngicos, segundo a metodologia EUCAST (S- sensível, I – intermediário e R- resistente)

Espécies	Antifúngico	Números de isolados (EUCAST)		
		S	I	R
<i>C. albicans ss</i> (n=35)	Anfotericina B	29	–	6
	Voriconazol	21	9	5
	Fluconazol	32	1	2
	Nistatina	*	*	*
<i>C. parapsilosis ss</i> (n=7)	Anfotericina B	5	–	2
	Voriconazol	7	–	–
	Fluconazol	7	–	–
	Nistatina	*	*	*
<i>C. dubliniensis</i> (n=2)	Anfotericina B	2	–	–
	Voriconazol	2	–	–
	Fluconazol	2	–	–
	Nistatina	*	*	*
<i>C. tropicalis</i> (n=1)	Anfotericina B	1	–	–
	Voriconazol	–	–	1
	Fluconazol	–	–	1
	Nistatina	*	*	*
<i>C. glabrata ss</i> (n=1)	Anfotericina B	1	–	–
	Voriconazol	1	–	–
	Fluconazol	–	1	–
	Nistatina	*	*	*
<i>C. fabianii</i> (n=1)	Anfotericina B	*	*	*
	Voriconazol	*	*	*
	Fluconazol	*	*	*
	Nistatina	*	*	*
<i>K. ohmeri</i> (n=1)	Anfotericina B	*	*	*
	Voriconazol	*	*	*
	Fluconazol	*	*	*
	Nistatina	*	*	*

*Não há pontos de corte estabelecidos pelo EUCAST para as espécies *C. fabianii* e *K. ohmeri*.

*Não há pontos de corte estabelecido pelo EUCAST para a nistatina.

Fonte: A autora.

Tabela 5.5 – Distribuição de valores de concentração inibitória mínima (MIC) de 4 fármacos antifúngicos frente a 48 cepas de leveduras provenientes da mucosa oral de pacientes internados no Hospital Infantil Darcy Vargas

Espécies	Antifúngico	Nº de cepas com MIC mg/L												
		≤0,05	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	≥64
<i>C. albicans ss</i> (n= 35)	Anfotericina B	–	1	–	2	1	4	21	6	–	–	–	–	–
	Voriconazol	–	5	16	7	2	4	1	–	–	–	–	–	–
	Fluconazol	–	–	–	–	7	12	8	5	1	2	–	–	–
	Nistatina	–	–	–	–	–	–	3	6	3	1	22*	–	–
<i>C. parapsilosis ss</i> (n=7)	Anfotericina B	–	–	–	–	–	2	3	2	–	–	–	–	–
	Voriconazol	1	5	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Fluconazol	–	–	–	–	1	4	1	1	–	–	–	–	–
	Nistatina	–	–	–	–	–	–	2	3	2	–	–	–	–
<i>C. dubliniensis</i> (n=2)	Anfotericina B	–	–	–	–	1	1	–	–	–	–	–	–	–
	Voriconazol	–	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Fluconazol	–	–	–	–	1	1	–	–	–	–	–	–	–
	Nistatina	–	1	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–
<i>C. tropicalis</i> (n=1)	Anfotericina B	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–
	Voriconazol	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–
	Fluconazol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–
	Nistatina	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–
<i>C. glabrata ss</i> (n=1)	Anfotericina B	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–
	Voriconazol	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–
	Fluconazol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–
	Nistatina	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1*	–	–
<i>C. fabianii</i> (n=1)	Anfotericina B	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–
	Voriconazol	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Fluconazol	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–
	Nistatina	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–
<i>K. ohmeri</i> (n=1)	Anfotericina B	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–
	Voriconazol	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Fluconazol	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–
	Nistatina	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1*	–	–

Números em vermelhos ressaltam cepas com altos MICs

*Números vermelhos com * = MICs 16> mg/L (maior concentração de nistatina utilizada nesse estudo e não inibiu o crescimento da cepa). Fonte: A autora.

Tabela 5.6 – Síntese da sensibilidade de 48 cepas de leveduras, isoladas da mucosa oral de pacientes internados no Hospital infantil Darcy Vargas

Espécies	Antifúngico	MIC (mg/L)			
		MODA	MIC50	MIC90	Intervalo
<i>C. albicans ss</i> (n=35)	Anfotericina B	1	1	2	0,03 - 2
	Voriconazol	0,06	0,06	0,5	0,03 - 1
	Fluconazol	0,5	0,5	2	0,25 - 8
	Nistatina	16 >	16 >	16 >	1 - 16
<i>C. parapsilosis ss</i> (n=7)	Anfotericina B	1	*	*	0,5 - 2
	Voriconazol	0,03	*	*	0,05 – 0,12
	Fluconazol	0,5	*	*	0,25 – 2
	Nistatina	2	*	*	1 - 4
<i>C. dubliniensis</i> (n=2)	Anfotericina B	*	*	*	0,25 – 0,5
	Voriconazol	*	*	*	0,03
	Fluconazol	*	*	*	0,25–0,5
	Nistatina	*	*	*	0,03-1
<i>C. tropicalis</i> (n=1)	Anfotericina B	*	*	*	1
	Voriconazol	*	*	*	0,5
	Fluconazol	*	*	*	8
	Nistatina	*	*	*	2
<i>C. glabrata ss</i> (n=1)	Anfotericina B	*	*	*	1
	Voriconazol	*	*	*	0,5
	Fluconazol	*	*	*	8
	Nistatina	*	*	*	16>
<i>C. fabianii</i> (n=1)	Anfotericina B	*	*	*	2
	Voriconazol	*	*	*	0,12
	Fluconazol	*	*	*	2
	Nistatina	*	*	*	2
<i>K. ohmeri</i> (n=1)	Anfotericina B	*	*	*	0,25
	Voriconazol	*	*	*	0,06
	Fluconazol	*	*	*	2
	Nistatina	*	*	*	16>

*Não determinado pelo baixo número de cepas no grupo

Fonte: A autora.

6 DISCUSSÃO

6.1 Isolamento e Caracterização de Leveduras

Atualmente, a candidemia é reconhecida como importante problema de saúde pública. A gravidade da doença, associada a condições debilitantes do paciente, levam a um aumento do tempo de internação hospitalar, acarretando uma elevação nos casos de infecção nosocomial e nos custos socioeconômicos. Em crianças hospitalizadas, a candidemia é uma doença frequente, sendo que a epidemiologia desta infecção fúngica difere entre os neonatos, crianças e adultos. A taxa de mortalidade em adultos é de 50% e em crianças é de 30% (Paula et al., 2007; Oliveira et al., 2014; De Rose et al., 2021).

Estudos epidemiológicos são de grande importância, para se conhecer a distribuição das espécies, susceptibilidade antifúngica e fatores de risco. Sabe-se que a epidemiologia da candidemia varia geograficamente (Caggiano et al., 2017; Matta et al., 2017; Piqueras et al., 2020). Enquanto há muitos estudos sobre a epidemiologia da candidemia em adultos, em crianças ainda não é bem estudada (Oliveira et al., 2014).

As espécies do gênero *Candida* são os terceiros/quartos patógenos a causar infecções na corrente sanguínea, principalmente em pacientes imunocomprometidos (Arnoni et al., 2018). Entre as espécies, *C. albicans* é a mais encontrada na corrente sanguínea seguida da *C. parapsilosis*. (Rodríguez et al., 2018; Warris et al., 2020).

A espécie mais isolada da mucosa oral é também *C. albicans*, considerada a mais virulenta seguida de *C. parapsilosis* (Livério et al., 2017; Rodríguez et al., 2018). No presente trabalho, foram estudadas amostras de leveduras coletadas da mucosa oral de pacientes internados em Hospital público infantil. Do total de 80 pacientes, 32,5% (26/80) tiveram culturas positivas para leveduras isoladas da mucosa oral, total de 48 isolados. A grande maioria dos isolados foi de *C. albicans* “sensu stricto” com 72,92% (35/48), seguida de *C. parapsilosis* “sensu stricto” com 14,6% (7/48). Esses resultados corroboram com vários estudos mostrando que a grande maioria de leveduras isoladas da mucosa oral é de *C. albicans*, seguida de *C. parapsilosis* (Livério et al., 2017; Rodríguez et al., 2018).

Outra espécie isolada da mucosa oral neste estudo foi *C. dubliniensis* com 4,16% (2/48). As duas cepas de *C. dubliniensis* foram inicialmente identificadas pela metodologia tradicional, como *C. albicans*; observou-se, presença de tubo germinativo, de vários clamidoconídios entre outras estruturas e cresceram a 42° C, sugerindo se tratar de *C. albicans*. Em meio cromogênico, as colônias apresentaram coloração verde escuro, sugestivo de *C. dubliniensis*. Após realização pela metodologia de Maldi-Tof, foi confirmado que se tratava de *C. dubliniensis*. A identificação por método Maldi-Tof, ou molecular, se faz necessária para concluir a identificação dessas duas espécies, pois, são fenotipicamente muito semelhantes. Esses resultados também foram demonstrados no estudo de Livério et al. (2017), que isolaram *C. dubliniensis* da mucosa oral de pacientes pediátricos com AIDS e, inicialmente, tinham identificado por métodos tradicionais como *C. albicans*; após técnica molecular, comprovaram que se tratava de *C. dubliniensis*. Para entender melhor a epidemiologia de *C. dubliniensis* é necessário se pesquisar melhor a incidência dessa espécie. No Brasil, Chavasco et al. (2006), obtiveram 5,4% (2/37) isolados de *C. dubliniensis* dentre 37 cepas isoladas de candidíase eritematosa oral de pacientes HIV positivos e HIV negativos previamente identificados como *C. albicans*. Livério et al. (2017), obtiveram 6,9% (2/29) de isolados de *C. dubliniensis* dentre 29 cepas isoladas da mucosa oral, inicialmente identificadas como *C. albicans*. No presente estudo, obteve-se 5,4% (2/37) de cepas de *C. dubliniensis* dentre as 37 cepas inicialmente identificadas como *C. albicans*.

Foram encontradas outras espécies de leveduras isoladas da cavidade oral: *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Essas duas espécies são bem conhecidas, causando candidemia e também colonizando a mucosa oral, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Em pacientes oncológicos, depois de *C. albicans*, as espécies com maior taxa de prevalência são *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, respectivamente (Dantas et al., 2020). No Brasil, *C. albicans* continua sendo a mais comum espécie causadora de candidemia, seguida por *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Na Argentina, no Brasil e na Colômbia, observou-se uma tendência de aumento na frequência de candidemia por *C. glabrata* (Matta et al., 2017). Segundo Whaley et al. (2017) de todas as espécies de *Candida* não-*albicans*, *C. glabrata* é a mais comumente isolada de pacientes com candidemia, estudo realizado na América do Norte e norte da Europa, assim como outras áreas geográficas estudadas, com exceção da América Latina. Já as infecções por *C. tropicalis* são comumente associadas à malignidade, com alguns estudos relatando maior prevalência entre pacientes com doenças hematológicas, como leucemia mieloide aguda. Okolo

et al. (2020), coletaram material da mucosa oral de 58 neonatos na Nigéria, onde 100% tiveram isolamento de *C. tropicalis*.

Pode-se verificar neste trabalho, que algumas amostras coletadas da mucosa oral tinham mais de uma espécie de levedura ou gêneros diferentes, no mesmo material clínico. Um desses casos, é do paciente que teve espécies de *C. fabianii* e de *K. ohmeri* isoladas da mesma amostra. Esse caso demonstrou se tratar de uma colonização transitória, pois essas espécies apareceram em uma única coleta. *Candida fabianii* (*Cyberlindnera fabianii*) é uma espécie de levedura emergente, oportunista, com atributos de baixa virulência, mas, pode causar infecções invasivas da corrente sanguínea (Arastehfar et al., 2019). *Kodamaea ohmeri*, anteriormente conhecido como *Pichia ohmeri*, tem sido considerada com uma levedura emergente, nas últimas décadas e apresenta vários tipos de infecção com alta mortalidade. Zhou et al. (2021), mencionaram dois surtos de *K. ohmeri* na China e na Turquia, ambos envolvendo recém-nascidos e crianças. Salienta-se então neste estudo, o isolamento destas duas espécies não frequentes, mas de importância clínica crescente.

A colonização oral é o maior fator de risco à infecção fungica invasiva. A boca é considerada uma porta de entrada para infecções fúngicas oportunistas e, a candidíase bucal, uma possível fonte primária para a colonização da mucosa gastrointestinal e disseminação sistêmica da infecção por meio dos capilares mesentéricos. Desse modo, deve-se compreender as alterações bucais da candidíase, por exemplo em RN prematuros, em crianças com câncer, como neste estudo, levando a cuidados bucais que devem ser realizados para a prevenção e controle de novos casos de candidíase (Tinoco-Araujo et al., 2013; Batista et al., 2014). Apesar da maioria dos trabalhos mostrarem taxa de colonização oral alta, 80% de colonização bucal segundo Tinoco-Araújo et al. (2013); segundo Goulart et al. (2018), 51,3% de seus pacientes apresentaram colonização oral por *Candida* spp; Silva et al. (2018), obtiveram 39,1% de colonização oral por espécies de *Candida*, como neste estudo; Aslani et al. (2018), obtiveram 38,9% de colonização oral; segundo Batista et al. (2014), obtiveram 15,2% de colonização oral. Neste estudo obteve-se 30,8% (8/26) de colonização oral. Esse resultado é mais baixo que de outros trabalhos, mas devemos levar em consideração os parâmetros utilizados pelos autores citados acima, para se chegar a essa taxa de colonização, como por exemplo, quantos isolamentos sequenciais com a mesma espécie? para se afirmar que se tratava de colonização; ora, se o autor considera a colonização já no primeiro isolamento, é claro que o índice de colonização será bem maior que o outro autor que considerou dois isolamentos consecutivos,

como colonização, e assim por diante. Outro fator que deve-se levar em consideração em relação a mais baixa taxa de colonização, pode estar associada ao uso profilático de fluconazol e ao cuidado com a higiene bucal que o hospital em estudo tem com os pacientes.

Nesta pesquisa, os 8 pacientes que apresentaram colonização oral, tiveram o total de 23 amostras biológicas positivas para leveduras, sendo: 65,2 % (15/23) amostras de *C. albicans* ss; 4,3% (1/23) amostra de *C. albicans* ss + *C. parapsilosis* ss, 4,3% (1/23) amostra de *C. albicans* ss + *C. glabrata* ss, 8,7% (2/23) amostras de *C. dubliniensis* e 17,5% (4/23) amostras de *C. parapsilosis* ss. Observa-se, portanto, 2 isolamentos duplos de leveduras, no mesmo material biológico (Figura 5.6).

Em se tratando de duas amostras provenientes do sangue, dois pacientes tiveram candidemia por *C. parapsilosis* ss; o paciente P1, que não teve colonização oral prévia e o paciente P24 que teve colonização oral por *C. parapsilosis* ss e também teve candidemia pela mesma espécie (Tabela 5.1). Os dois pacientes usaram cateter, e como demonstrado na literatura, *C. parapsilosis* é considerada uma das principais causas de infecções relacionadas a cateteres e ainda pode formar biofilmes em cateteres venosos centrais (CVCs) e outros dispositivos médicos (Guo et al., 2021). Estes resultados corroboram com o estudo de Batista et al. (2014), que teve como resultado um paciente com colonização oral por *C. parapsilosis* e candidemia pela mesma espécie. Estudos demonstram que *C. parapsilosis* não precisa de colonização prévia para causar candidemia podendo ser transmitida de forma horizontal, por fontes externas de contaminação, como: equipamentos médicos, fluidos alimentares, cateteres e mãos de profissionais da saúde (Soares et al., 2013; Batista et al., 2014).

Em pacientes não colonizados observou-se também isolamentos duplos de leveduras: *C. albicans* ss + *C. tropicalis*, *C. fabianii* + *K. ohmeri* e *C. albicans* ss + *C. parapsilosis* ss.

Os pacientes internados em hospitais, estão com a imunidade mais debilitada e no presente estudo, a grande maioria deles, 76% apresentam algum tipo de câncer. Esses pacientes precisam de um diagnóstico rápido para combater uma possível sepse ou mesmo o monitoramento da colonização fúngica. Sabe-se que, a identificação de leveduras por métodos tradicionais em micologia, são muito importantes, mas requerem um tempo prolongado, que muitas vezes, pode ser crucial para o paciente. Daí a importância da espectrometria de massa; MALDI-TOF, no diagnóstico de candidemias. Segundo Barbosa et al. (2021), esse método demonstrou ser uma revolução devido à velocidade e confiabilidade dos resultados oferecidos por meio da análise do espectro de proteínas, podendo ser realizado, até mesmo, diretamente

do frasco de hemocultura positivo. Também têm o potencial de melhorar a condução do tratamento, trazendo melhora no prognóstico do paciente. Nesta pesquisa, pode-se verificar que a identificação das 48 cepas de leveduras isoladas de mucosa oral dos pacientes internados no Hospital Infantil Darcy Vargas, por métodos tradicionais e Maldi-Tof apresentaram o nível de concordância de 91,6% (44/48). Sendo que, as 4 amostras que discordaram entre as metodologias, foram identificadas por métodos tradicionais de modo diverso. O Maldi-Tof demonstrou ser uma ótima metodologia na identificação de espécies de *Candida*, destacando-se *C. dubliniensis*, e também na identificação de *K. ohmeri*. Segundo Zhou et al. (2021), o desenvolvimento do MALDI-TOF MS permitiu rápida identificação de espécies de *Candida*, em laboratórios clínicos, e tem sido usado com sucesso para identificar *K. ohmeri* em vários casos. Esses achados estão de acordo com o presente estudos mostrando taxas de identificação de levedura de 97,6% por MALDITOF MS (Aslani et al., 2018).

6.2 Produção de Proteinase – Fator de Virulência

Além do aspecto relacionado à identificação, estudos envolvendo a epidemiologia e patogenicidade das cepas são de fundamental importância para uma melhor compreensão do agente etiológico e sua interação com o hospedeiro. Um aspecto importante destas interações são os fatores relacionados à virulência demonstrados pelas espécies de *Candida* spp e outras leveduras (Calderone; Fonzi, 2001). Proteinases são enzimas secretadas “in vitro” por espécies patogênicas de *Candida*, durante a infecção. Acredita-se que a proteinase tenha como função degradar anticorpos, aumentando a capacidade do microrganismo de colonizar e penetrar nos tecidos do hospedeiro (Vinita, 2009). Neste estudo, a atividade enzimática para proteinase ocorreu em 96% das cepas de leveduras e 70,8% apresentaram índice fortemente positivo. A maioria das amostras estudadas 70,8% (34/48) apresentaram índice 3, reação fortemente positiva para proteinase, 25% (12/48) apresentaram índice 2, reação positiva para proteinase e apenas 4,2% (2/48) apresentaram ausência de atividade enzimática. Estes resultados demonstraram alta produção de proteinase, se comparado com trabalho de Batista (2009), que apresentou apenas 14,8% (8/54) amostras fortemente positivas para proteinase e também se

comparado com os resultados de De Luca et al. (2012), onde foi detectado a produção de proteinase em apenas 48% das cepas de *C. albicans* e nas cepas não-*albicans* a proteinase não foi detectada. Segundo Giolo et al. (2010), diversos estudos têm demonstrado a relação entre o aumento na síntese e a atividade das enzimas extracelulares fosfolipases e proteinases, com a elevação do potencial patogênico das leveduras, levando a quadros clínicos de candidíases mais graves.

Trabalho interessante de Abbas et al. (2021), que impediram a produção de proteinase com a utilização de domperidona e candesartana como método alternativo aos antifúngicos convencionais para o tratamento de micoses por *Candida*, o que corrobora para fato desta enzima ser fator primordial para o estabelecimento de infecções deste gênero, sendo alvo de estudo de diversos grupos de pesquisadores.

6.3 Sensibilidade/ Resistência aos Antifúngicos

O teste de suscetibilidade é uma ferramenta importante no cenário clínico; sua utilidade é baseada na disponibilidade de pontos de corte, ou valores de corte epidemiológicos (ECOFFs). Quanto a susceptibilidade/resistência das cepas, realizamos testes de microdiluição em caldo segundo (EUCAST, 2020) (padrão ouro).

Os métodos de diluição são usados para estabelecer as concentrações inibitórias mínimas (MICs) de agentes antimicrobianos. O MIC informa sobre a suscetibilidade ou resistência do microrganismo ao antifúngico, o que pode auxiliar no tratamento (EUCAST, 2020). Pode-se observar neste estudo, que do total de isolados, houve resistência de 16,7% (8/48) frente a anfotericina B (AMB). Esse resultado mostra que a taxa de resistência a AMB foi maior que a taxa de resistência a AMB de 4% obtida no trabalho de Gorgun et al. (2021). Toprak et al (2003), Nunes et al. (2011), Atalay et al. (2012), Oztürk et al. (2013), relataram em seus estudos, que todos os isolados de *Candida* eram sensíveis a AMB. Segundo Vieira et al. (2017), na literatura tem sido relatada ocorrência relativamente baixa de casos de resistência à anfotericina B, pois mutações que levam a esse tipo de resistência, diminuem drasticamente a tolerância da levedura a estresses externos, bem como aumentando a ocorrência de defeitos

na filamentação e invasão tecidual. Os mecanismos envolvidos no aumento de resistência à anfotericina B resultam em alterações na composição da membrana plasmática fúngica, alterações quantitativas de esfingolípídeos da membrana, com diminuição da formação de ergosterol, e mutação do gene *ERG3*, que leva à formação de esteróis, com menor afinidade de ligação da anfotericina B e superexpressão de bombas de efluxo (Vieira et al., 2017). Nesta pesquisa, 6 cepas de *C. albicans ss* (MIC₉₀ de 2 mg/L e intervalo de 0,03 mg/L – 2 mg/L) e 2 cepas de *C. parapsilosis ss* MIC=2 mg/L (com intervalo de 0,5 mg/L – 2 mg/L) foram resistentes a AMB.

Neste estudo, obteve-se 12,5% (6/48) de resistência ao voriconazol (VCZ) . Esse resultado foi maior que o obtido no estudo de Gorgun et al. (2021), onde obtiveram 8% de resistência ao VCZ. A resistência ao VCZ, no presente estudo, ocorreu em 5 cepas de *C. albicans ss* (MIC₉₀ de 0,5 mg/L e intervalo de 0,03 mg/L – 1 mg/L) e 1 cepa de *C. tropicalis* (intervalo de 0,5 mg/L).

Em relação a resistência ao fluconazol (FCZ), no presente estudo, obteve-se de 6,25% (3/48): 2 cepas de *C. albicans ss* (MIC₉₀ de 2 mg/L e intervalo de 0,25 mg/L – 8 mg/L) e 1 cepa de *C. tropicalis* (intervalo de 8 mg/L), enquanto Gorgun et al. (2021), obtiveram 10% de resistência ao fluconazol e Tropak et al. (2003) não obtiveram resistência em nenhuma espécie de *Candida* a este antifúngico. Segundo Whaley et al. (2017), com relação a resistência de *C. albicans* ao FCZ, citam que há um mecanismo em que ocorre mutações no gene *ERG11*. Há ainda um estudo mostrando que em 63 isolados de *C. albicans* resistentes ao FCZ, em 55 foram encontrados pelo menos 1 mutação dentro dos seus alelos do gene *ERG11*. Ainda, segundo Whaley et al. (2017), em comparação com outras espécies de *Candida*, sabe-se relativamente pouco sobre os mecanismos de resistência a azóis em *C. tropicalis*. Até o momento, experimentos para delinear diretamente o papel potencial das bombas de efluxo ainda não foram realizados em *C. tropicalis* (Whaley et al., 2017).

Neste estudo uma cepa de *C. glabrata ss* foi sensível a anfotericina B e ao voriconazol e intermediária ao fluconazol com MIC de 8 mg/L. No estudo de Gorgun et al. (2021), foi observado que dentre 2 cepas de *C. glabrata*, 1 foi resistente ao fluconazol e sensível a AMB e VCZ e a outra foi sensível a todos os antifúngicos.

Em relação as 2 cepas de *C. dubliniensis*, as mesmas mostraram-se sensíveis a AMB, VCZ e FCZ e esse resultado corrobora com o estudo de Gorgun et al. (2021), no qual a cepa de *C. dubliniensis* também se mostrou sensível a AMB, VCZ e FCZ.

Dentre todas as cepas estudadas, no presente trabalho, 1 cepa de *C. tropicalis* e 1 cepa de *C. albicans ss* apresentaram resistência cruzada (foram resistentes a 2 azóis: VCZ e FCZ). Nunes et al. (2011) obteve 2 cepas de *C. tropicalis* resistentes a VCZ e FCZ. Já no estudo de Rodrigues (2020), 1 cepa de *C. tropicalis* tinha resistência cruzada aos azóis VCZ e FCZ. Segundo Magill et al. (2006), resistência cruzada entre azóis pode acontecer rapidamente e é causada pelo uso prévio desses antifúngicos. Segundo Xiau et al. (2020), a taxa de resistência ao fluconazol em *C. tropicalis* triplicou. Estes aumentos significativos nas taxas de resistência foram observados em *C. tropicalis* para fluconazol e voriconazol. A frequência de resistência triplicou de <10% para >30%.

Também encontra-se neste estudo, uma cepa de *C. albicans ss* resistente a AMB e VCZ e uma outra *C. albicans ss* resistente a AMB, VCZ e FCZ, mostrando ser multirresistente.

Em relação a cepa de *C. fabianii*, obteve-se neste em estudo MIC de 2 mg/L para a anfotericina B, MIC de 0,12 mg/L para voriconazol e MIC de 2 mg/L para fluconazol. No estudo de Park et al. (2019), os maiores MICs para AMB, VCZ e FCZ para cepas de *C. fabianii* foram respectivamente: 0,5 mg/L, 0,25 mg/L e 8 mg/L. Portanto, estes resultados, comparados ao do estudo de Park et al. (2019), revelaram que se obteve MIC mais alto para anfotericina B, menor MIC para voriconazol e menor MIC para fluconazol. Segundo Arastehfar et al. (2019), obtiveram os maiores MICs para as cepas de *C. fabianii* foram: 2 mg/L para anfotericina B, 1 mg/l para voriconazol e 8 mg/L para fluconazol. Comparando os presentes resultados com os de Arastehfar et al. (2019), obteve-se o mesmo valor de MIC para anfotericina B e MICs menores para voriconazol e fluconazol.

Com relação a cepa de *K. ohmeri*, obteve-se neste estudo, MIC de 0,25 mg/L para anfotericina B, MIC de 0,06 mg/L para voriconazol e MIC de 2 mg/L para fluconazol. Esses resultados, comparados aos do estudo de Zhou et al. (2021), denota-se, que o MIC para anfotericina B foi de 0,25 mg/L, o que corresponde ao MIC₅₀ do estudo de Zhou et al. (2021); MIC para voriconazol no presente estudo foi de 0,06 mg/L, o que corresponde ao MIC₅₀ do estudo de Zhou et al. (2021). No presente estudo o MIC para fluconazol foi de 2 mg/L, bem abaixo do MIC₅₀ do referido estudo citado acima.

Com relação a nistatina das cepas de *C. albicans ss* (n=35) foram: 3 (MIC= 1mg/L), 6 (MIC=2 mg/L), 1(MIC= 8 mg/L) e 22 (MIC= 16> mg/L) e intervalo de 1-16mg/L. Comparando esses resultados com o estudo de Sav et al. (2020), o MIC₉₀ foi de 8 mg/L e intervalo de 2-8 mg/L; no presente trabalho 7 cepas de *C. albicans ss* estão no intervalo citado no estudo de Sav

et al. (2020), que foi de 2-8 mg/L, sendo que 1 delas com MIC=8 mg/L que é igual ao MIC90 do estudo de Sav et al. (2020). Entretanto, tem-se 3 cepas de *C. albicans ss* cujo MIC foi menor que o intervalo do estudo de Sav et al. (2020) e tem-se também 22 cepas de *C. albicans ss* com MICs muito acima do intervalo do estudo. Este resultado também foi bem mais alto que o MIC90 de 0,5 mg/L obtido por Arikan et al. (2002).

Os MICs das 7 cepas de *C. parapsilosis ss* do presente estudo frente a nistatina, foram: 2 (MIC=1 mg/L), 3(MIC=2 mg/L) e 2(MIC= 4 mg/L), se comparado com o estudo de Sav et al. (2020), que obtiveram M90=8 mg/L no intervalo de 1-8 mg/L, observa-se que: as 7 cepas de *C. parapsilosis ss* estão com MICs entre o intervalo citado pelos autores, mas, são menores que o MIC90 de 8 mg/L citado pelos autores. O resultado do presente estudo, se comparado com MIC90=1 mg/L do estudo de Arikan et al. (2002), somente 2 cepas de *C. parapsilosis ss* tem o mesmo valor de MIC, já as 5 cepas restantes, apresentaram MICs acima do MIC90 obtido por Arikan et al. (2002).

O MIC da cepa de *C. tropicalis* deste estudo frente a nistatina, foi de 2 mg/L, resultado este, que está dentro do intervalo de 2-8 mg/L citado no estudo de Sav et al. (2020), e mais alto que do Arikan et al. (2002), que obtiveram MIC90 de 0,5 mg/L.

O MIC da cepa de *C. glabrata ss* deste estudo, foi de 16> mg/L, mostrando estar bem acima do intervalo de 0,25-8 mg/L do estudo de Sav et al. (2020). Se comparado com o estudo de Arikan et al. (2002), este resultado foi muito mais alto que o MIC90 de 0,5 mg/L.

O MIC das 2 cepas de *C. dubliniensis* frente a nistatina foi de 1 (MIC=0,03 mg/L) e 1 (MIC==1 mg/L). Se comparados com o resultado do estudo de Shokoohi et al. (2021), em que, a média geométrica das 3 cepas de *C. dubliniensis* foi de 20,16 mg/L com intervalo de 16-32 mg/L, a média geométrica de 2 cepas de *C. dubliniensis* deste estudo, foi de 0,173 mg/L com intervalo de 0,03-1 mg/L, portanto foi mais baixa que do estudo de Shokoohi et al. (2021).

Ainda em relação aos resultados com a nistatina, no presente estudo, tem-se 1 cepa de *C. fabianii* com MIC= 2 mg/L e 1 cepa de *K. ohmeri* com MIC=16> mg/L e por se tratar de duas cepas emergentes, não foram encontrados resultados comparativos destas cepas em relação a nistatina.

Com relação ao isolamento, caracterização, produção de proteinase e sensibilidade/resistência aos antifúngicos de leveduras da mucosa oral deste grupo específico de crianças com câncer, mais estudos devem ser realizados para uma melhor epidemiologia a

ser esclarecida. Para tal, no intuito de aprimorar este fato, no presente trabalho, protocolos de monitoramento dos achados laboratoriais foram prontamente comunicados a equipe médica.

7 CONCLUSÕES

- 1- Da mucosa oral de 80 crianças internadas em Hospital Público, S.P., com câncer e sem câncer, 32,5% apresentaram cultura positiva para leveduras.
- 2- Das crianças estudadas, 76% apresentaram algum tipo de câncer.
- 3- As espécies totais isoladas foram: *Candida albicans ss* (72,92%); *Candida parapsilosis ss* (14,6%); *Candida dubliniensis* (4,16%); *Candida glabrata ss*, *Candida tropicalis*, *Candida fabianii* e *Kodamaea ohmeri* com (2,08%).
- 4- Das crianças sem câncer isolou-se: *C. albicans ss*, *C. tropicalis*, *C. fabianii* e *K. ohmeri*. Das crianças com câncer isolou-se: *C. parapsilosis ss*, *C. glabrata ss*, *C. albicans ss* e *C. dubliniensis*.
- 5- Obteve-se 30,8% (8/26) de colonização oral, a presença de leveduras da mesma espécie, em pelo menos duas amostras sequenciais.
- 6- Não foram isoladas as espécies *C. tropicalis*, *C. fabianii* e *K. ohmeri*, nos casos de colonização.
- 7- Ocorreram isolamentos duplos de leveduras em um mesmo material clínico, em pacientes colonizados: *C. albicans ss* + *C. parapsilosis ss*; *C. albicans ss* + *C. glabrata ss*.
- 8- Ocorreram isolamentos duplos de leveduras, em pacientes não colonizados: *C. albicans ss* + *C. tropicalis*; *C. fabianii* + *K. ohmeri*; *C. albicans ss* + *C. parapsilosis ss*.
- 9- Pelos métodos de identificação das leveduras: tradicional e Maldi-Tof, obteve-se 91,6% de concordância e entre “Chromagar Candida” e Maldi-Tof, obteve-se concordância de 100%.
- 10- -A atividade enzimática para proteinase ocorreu em 96% das cepas de leveduras e 70,80% apresentaram índice fortemente positivo.
- 11- -Em relação a sensibilidade/resistência aos antifúngicos, pode-se observar:
 - 16,7% (8/48) resistente a anfotericina B: (6 cepas de *C. albicans ss* e 2 cepas de *C. parapsilosis ss*)
 - 12,5% (6/48) resistentes a VCZ: (5 cepas de *C. albicans ss* e 1 cepa de *C. tropicalis*)
 - 6,25% (3/48) resistentes a FCZ (2 cepas de *C. albicans ss* e 1 cepa de *C. tropicalis*)
 - Obteve-se 2 cepas (1 *C. albicans ss* e 1 cepa de *C. tropicalis*) que apresentaram resistência cruzada a dois azóis VCZ e FCZ.
 - Uma cepa de *C. albicans ss* foi resistente a AMB e VCZ

- Uma cepa de *C. albicans ss* foi resistente a AMB, VCZ e FCZ, mostrando ser multirresistente
- Cepas de *C. fabianii* e *K. ohmeri*- não tem parâmetros para as metodologias da EUCAST:
 - *C. fabianii*: AMB e FCZ = MIC= 2mg/L; VCZ = MIC=0,12 mg/L.
 - *K. ohmeri*: AMB = MIC=0,25 mg/L; VCZ = MIC=0,06 mg/L; FCZ = MIC=2 mg/L.
- Com relação a nistatina – ainda não se tem parâmetros para as metodologias do EUCAST:
 - *C. albicans ss* (N=35): 3(MIC= 1mg/L), 6(MIC=2 mg/L), 1(MIC= 8 mg/L) e 22 (MIC = 16> mg/L)
 - *C. parapsilosis ss* (N=7): 2(MIC=1 mg/L), 3(MIC=2 mg/L), 2(MIC=4 mg/L)
 - *C. dubliniensis* (N=2): 1(MIC=0,03 mg/L) e 1(MIC=1 mg/L)
 - *C. tropicalis* (N=1): 1(MIC= 2 mg/L)
 - *C. glabrata ss* (N=1): 1(MIC=16> mg/L)
 - *C. fabianii* (N=1): 1(MIC=2 mg/L)
 - *K. ohmeri* (N=1): 1(MIC=16> mg/L)

12- Pelos resultados obtidos pode-se observar a presença e colonização de leveduras na mucosa oral deste grupo de crianças internadas em Hospital Público, S.P., e na grande maioria com câncer. *C. albicans ss* foi a espécie mais frequente, destacando-se ainda o isolamento de *C. fabianii* e *K. ohmeri*, espécies raras em material clínico e surgindo, cada vez mais, como patógenos oportunistas.

Outro fator importante, a ser salientado, neste trabalho, foi a realização de testes de sensibilidade/resistência aos antifúngicos, que serviram como “estudo sentinela” para o clínico, seguir terapia adequada.

REFERÊNCIAS¹

- Abbas HA, Gad AI, El-Sayed MA, El-Ganiny AM. Impeding Virulence of *Candida albicans* by Candesartan and Domperidone. *Curr Microbiol*. 2021 Nov;78(11):3957- 3967. doi: 10.1007/s00284-021-02663-x
- Abbes S, Sellami A, Hadrich I, Amouri I, Mahfoudh N, Neji S, Makni F, Makni H, Ayadi A. *Candida glabrata* strain relatedness by new microsatellite markers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012 Jan; 31(1):83-91. doi: 10.1007/s10096-011-1280-4.
- Alastruey-Izquierdo A, Asensio A, Besoli A, Calabuig E, Fernández-Ruiz M, Garcia-Vidal C , Gaschg O, Guinea J, Martín-Gomez MT, Panõ JR , Ramirez P, Ruiz-Gaitánl A , Salavert M, Tacias M, Vinuela L, Pemánl J . Recomendaciones GEMICOMED/GEIRAS-SEIMC para el manejo de las infecciones y colonizaciones por *Candida auris*. / *Rev. Iberoam. Micol*. 2019; 36(3):109–14. doi: 10.1016/j.riam.2019.06.001.
- Arastehfar A, Fang W, Al-Hatmil MAS, Afsarien, MH, Daneshnia F, Bakhtiari M, Sadati SK, Badali H, Khodavaysy S, Hagen F, Liao W, Pan W, Zomorodian, K and Boekhout T. Unequivocal identification of an underestimated opportunistic yeast species, *Cyberlindnera fabianii*, and its close relatives using a dual-function PCR and literature review of published cases. *Med Mycol*, 2019 Oct 1;57(7):833-40. doi: 10.1093/mmy/myy148.
- Arikan S, Ostrosky-Zeichner L, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Gordon D, Wallace T, Rex JH. In vitro activity of nystatin compared with those of liposomal nystatin, amphotericin B, and fluconazole against clinical *Candida* isolates. *J. Clin Microbiol*. 2002 Apr; 40(4):1406-12. doi: 10.1128/JCM.40.4.1406-1412.2002.
- Arnoni MV, Paula CR, Auler ME, Ruiz LS. Infections caused by *Fusarium* species in pediatric cancer patients and review of published literature. *Mycopathologia*. 2018 Dec. 183(6):941-49. doi: 10.1007/s11046-018-0257-6.
- Aslani N, Janbabae G, Abastabar M , Meis JF , Babaeian M , Khodavaisy S , Boekhout T and Badali H. Identification of uncommon oral yeasts from cancer patients by MALDI-TOF mass spectrometry. *BMC Infectious Diseases* .2018; 18:24. doi 10.1186/s12879-017-2916-5.
- Atalay MA, Sav H, Demir G, Koç AN. Distribuição de espécies de *Candida* isoladas de hemoculturas e suscetibilidades in vitro à anfotericina B e fluconazol. *Selçuk Med J*. 2012; 28: 149-51.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Barbosa KH, Vargas DB, Ferreira GI, Melo de Sá N, Cortes MT, Santos GS, Damásio GMX. Impact of MALDI-TOF in the diagnosis of Sepsis: an integrative review. *Braz J Development*. 2021; 7(6):58556-574. doi:10.34117/bjdv7n6-313.

Batista GCM. Perfil fenotípico e genotípico de leveduras isoladas da cavidade oral, sangue e cateter de neonatos internados em unidade de terapia intensiva neonatal de hospital terciário de São Paulo [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciência Biomédicas; 2009.

Batista GCM, Krebs VLJ, Ruiz LS, Auler ME, Hahn RC, Paula CR. Oral Colonization: A possible source for candidemia in low-weight neonates. *J Mycol Med*. 2014 Jun; 24(2):81-6. doi: 10.1016/j.mycmed.2013.11.004.

Bizerra FC, Jimenez-Ortigosa C, Souza AC, Breda GL, Queiroz-Telles F, Perlin DS, Colombo AL. Breakthrough candidemia due to multidrug-resistant *Candida glabrata* during prophylaxis with a low dose of micafungin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(4):2438-40. doi: 10.1128/AAC.02189-13.

Botterel F, Celesterke C, Costa C, Bretagne S. Analysis of microsatellite markers of *Candida albicans* used for rapid typing. *J Clin Microbiol*; 2001; 39: 4076-81.

Bretagne S, Costa JM, Besmond C, Carsique R, Calderone J. Microsatellite polymorphism in the promoter sequence of the elongation factor 3 gene of *Candida albicans* as the basis for a typing system. *J Clin Microbiol*. 1997; 35(7) 1777-80.

Caggiano G, Lovero G, De Giglio O, Barbuti G, Montagna O, Laforgia N, Montagna MT. Candidemia in the Neonatal Intensive Care Unit: A Retrospective, Observational Survey and Analysis of Literature Data. *Biomed Res Int*. 2017; 2017:7901763. doi:10.1155/2017/7901763.

Calderone RA, Fonzi WA. "Virulence factors of *Candida albicans*. *The Cells*. 2001 July; 9(7):327-35.

Carrillo Munõz AJ, Quindós, G, Delia Cárdenes, C, Vargas, RA, Arévalo, P, Brió, S, Madariaga, L. Evaluación del medio Chromalbicans Ágar para la identificación presuntiva de *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* 2001; 18: 501-8.

Chavasco JK, Paula CR, Hirata MH, Aleva NA, Melo CE, Gambale W et al.. Molecular identification of *Candida dubliniensis* isolated from oral lesions of HIV- positive and HIV- negative patients in São Paulo, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2006; 28:21-6. doi:[10.1590/S0036-46652006000100005](https://doi.org/10.1590/S0036-46652006000100005).

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 1st ed. CLSI supplement M60. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

CLSI Document M44-S3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.

Colombo, AL e Guimarães, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* sp. Rev. Soc Bras Med Trop. 2003; 36: 599-607.

Consolo, LCT. Colonização por *Candida* spp. e candidemia em crianças com sepse internadas em Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica [tese]. Mato Grosso do Sul: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2012.

Cooke VM, Miles RJ, Price RG, Midgley G, Khamri W, Richardson AC. New Chromogenic Agar Medium for the identification of *Candida* spp. Apl. Environmen Microbiol. 2002; 7(68):3622-27.

Costa H. Tópicos de administração hospitalar. São Paulo. 1ª Ed. Renovarum; 1998. p.260.

Costa M, Passos XS, Miranda ATB, Araújo RSC, Paula CR, Silva, MRR. Correlation of in vitro itraconazole and fluconazole susceptibility with clinical outcome for patients with vulvovaginal candidiasis. Mycopathologia. 2004; 157: 43-7.

Dantas JBL, Julião ELD, Azevedo, JSJ, Reis JVNA. Oral candidiasis in patients undergoing antineoplastic therapy: literature review. Rev Fac Odontol Univ Fed Bahia. 2020; 50(1): 25-34. doi: [10.9771/revfo.v50i2.38251](https://doi.org/10.9771/revfo.v50i2.38251).

De Luca C, Guglielminetti M, Ferrario A, Calabr M, Casari E. Candidemia: species involved, virulence factors and antimycotic susceptibility. New Microbiol. 2012 Oct; 35(4):459-68.

De Rose, DU, Santini A, Ronchett MP, Martini L, Serafini L, Betta P, Maino M, Caviglioli F, Cocchi I, Pungni L, Bonanno E, Tziolla C, Giuffrè M, Bua J, Della Torre B, Nardella G, Mazzeo D, Manzoni P, Dotta A, Bagolan P, Auriti C. Invasive *Candida* Infections in Neonates after Major Surgery: Current Evidence and New Directions. Pathogens. 2021; 10(3):319.

Desnos-Ollivier M, Ragon M, Robert V, Raoux D, Gantier J-C, Dromer F. *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), a Rare Human Fungal Pathogen Often Misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*). J Clin Microbiol. 2008; 46(10) 3237-42.

Diaz A, Danino D, Leber A, Wang S, Klamet E, Stack-Simone S & Washam M. Review of *Candida dubliniensis* at a Pediatric Hospital. Infection Control & Hospital Epidemiology. 2020; 41(S1): S373-S374. doi:[10.1017/ice.2020.1004](https://doi.org/10.1017/ice.2020.1004).

EUCAST – The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Overview of antifungal ECOFFS and clinical breakpoints for yeasts, moulds and dermatophytes using the EUCAST. E.Def 7.3, E.Def 9.4 and E.Def 11.0 procedures. Version 3, 2022. <http://www.eucast.org>

EUCAST - The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and agar dilution for yeasts, moulds and dermatophytes as recommended by EUCAST. Version 6.0, 2022. <http://www.eucast.org>."- p. 5-6.

EUCAST - The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EUCAST E.DEF 7.3.2 April 2020. <http://www.eucast.org>

Foulet F, Nicolas N, Eloy O, Botterel F, Gantier J-C, Costa J-M, Bretagne S. Microsatellite marker analysis as a typing system for *Candida glabrata*. J Clin Microbiol. 2005; 43; 4574-79.

García-Rodríguez J, Cantão E, Pemán J, Alvarez M, Ezpeleta G, Gómez-Nieto A et al. Incidencia etaria y geográfica y patron of sensibilidad on the antifúngicos of the species of *Candida* causatives of candidemia in the población pediátrica española. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013; 31: 363-8.

Giolo MP, Svidzinski TIE. Physiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia. Bras Patol Med Lab. 2010; 46(3):225-34. doi:[10.1590/S1676-24442010000300009](https://doi.org/10.1590/S1676-24442010000300009).

Gorgun S, Bilgin M, Kilic SS. Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from blood cultures. J Pak Med Assoc. 2021 Jun;71(6):1601-04. doi:[10.47391/JPMA.1464](https://doi.org/10.47391/JPMA.1464).

Goulart LS, Souza WW, Vieira CA, Lima JS, Olinda RA, Araújo C. Colonização oral por espécies de *Candida* em pacientes HIV positivo: estudo de associação e suscetibilidade antifúngica. Einstein (São Paulo). 2018;16(3):1-6. doi:[10.1590/S1679-45082018AO4224](https://doi.org/10.1590/S1679-45082018AO4224)

Guo J, Zhang M, Qiao D, Shen H, Wang L, Wang D, Li L, Liu Y, Lu H, Wang C, Ding H, Zhou S, Zhou W, Wei Y, Zhang H, Xi W, Zheng Y, Wang Y, Tang R, Zeng L, Xu H and Wu W. Prevalence and Antifungal Susceptibility of *Candida parapsilosis* Species Complex in Eastern China: A 15-Year Retrospective Study by ECIFIG. *Front Microbiol* 2021 Mar 4; 12:644000. doi: 10.3389/fmicb.2021.644000.

Hernández-Castro R, Arranjo-Escalante S, Carrillo-Casas EM, Moncada-Barrón D, Alvarez-Verona E, Hernández-Delgado L, Torres-Navalle P, Lavalle-VillaLobos A. Outbreak of *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: a health care workers source. *Eur J Pediatrics*. 2010; 169, 783-7.

Kaur H, Shankarnarayana SA, Hallur V, Muralidharan J, Biswal M, Ghosh AK, Ray P, Chakrabarti A, Rudramurthy SM. Prolonged Outbreak of *Candida krusei* Candidemia in Paediatric Ward of Tertiary Care Hospital. *Mycopathologia*. 2020 Apr;185(2):257-68. doi: 10.1007/s11046-020-00427-y.

Khouri S, Ruiz LS, Auller ME, Paula CR. Evaluation of infections by *Candida* at a university hospital of Vale do Paraíba, region, São Paulo State, Brazil: species distribution, colonization, risk factors and antifungal susceptibility. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2016; 7(2):51-7. doi: 10.5123/S2176-62232016000200006.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Micologia. Diagnóstico Microbiológico*, 5 ed. São Paulo: Médica e Científica; 2001. p. 1053-4.

Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. *The yeasts, a taxonomic study*. 5th. Burlington, MA, EUA: Elsevier |Science; 2011.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins Vaccari EM, MELO NT. 9ª edição *Tratado de micologia médica*. São Paulo: Sarvier; 2002., p. 1104.

Lima-Neto R, Santos C, Lima N, Sampaio P, Pais C, Neves R.P.. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolates culture collection. *Braz. J. Microbiol*. 2014 Apr./June ; 45(2): 515-522.

Livério HO, Ruiz LS, Freitas RS, Nishikaku A, Souza AC, Paula CR, Paula CR, Domaneschi C. Penotypic and genotypic detection of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* strains isolated from oral mucosa of AIDS pediatric patients. *Re Inst. Med.Tropical São Paulo*. 2017; p. 1-6.

Magill SS, Shields C, Sears CL, Choti M, Merz WG. Triazole cross-resistance among *Candida* spp.: case report, occurrence among bloodstream isolates, and implications for antifungal therapy. *J Clin Microbiol*. 2006 Feb;44(2):529-35. doi: 10.1128/JCM.44.2.529-535.2006.

Matta DA, Souza ACR & Colombo AL. Revisiting Species Distribution and Antifungal Susceptibility of *Candida* Bloodstream Isolates from Latin American Medical Centers. *J Fungi*. 2017 May 17;3(2):24. doi: 10.3390/jof3020024.

Melhem MdeSC e Szeszs MW. Testes de suscetibilidade a drogas antifúngicas. In: Zaitz C et al. *Compêndio de micologia médica*. 2 ed. – Rio de Janeiro. Guanabara Koogan; 2017. p.406-22.

Nunes EB, Monteiro JCMS, Nunes NB, Paes ALV. Perfil de sensibilidade del género *Candida* a antifúngicos en un hospital de referêncía de la Región Norte de Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude* 2011; 2(4):23-30. doi: 10.5123/S2176-62232011000400004

Okolo OM, Ayanbimpe MG, Toma AB, Envulado AE, Olubukunnola I, Izang A, Obishakin FE, Onyedibe K, Echeonwu B, Sagay AS, Egah ZD. Neonatal Oral Colonization with *Candida* in Jos, North-Central Nigeria. *J Biomed Res & Clin*. 2020; 3(4):430-4. doi.org/10.46912/jbrcp.198

Oliveira VKP, Ruiz LS, Oliveira NAJ, Moreira D, Hahn RC, Melo ASA, Nishkaku AS, Paula CR. Fungemia caused by *Candida* species in a children's public hospital in the city of São Paulo, Brazil: study in the period 2007-2010. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2014 July-August; 56(4):301-5. doi: 10.1590/S0036-46652014000400006.

Öztürk T, Özseven AG, SesliÇetin E, Kaya S. Investigaçãõ das espécies e suscetibilidades antifúngicas de cepas de *Candida* isoladas de culturas de sangue. *Kocatepe Med J*. 2013; 14: 17-22.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes D et al.. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; 48(5): 503-35.

Park JH, Oh J, Sang H, Shrestha B, Lee H, Koo J, Cho SI, Choi JS, Lee MH, Kim J, Sung GH. Identification and Antifungal Susceptibility Profiles of *Cyberlindnera fabianii* in Korea. *Mycobiology*. 2019 Sep 3;47(4):449-56. doi: 10.1080/12298093.2019.1651592.

Paula CR, Montelli AC, Ruiz LS, Batista GCM, Matsumoto FE, Arnoni MV, Viani PRC, Khouri S, Gontijo V, Krebs VL. Infecção Hospitalar Fúngica: Experiência em Hospitais Públicos de São Paulo. *Prática Hosp.* 2007; 52: 63–6.

Pelletier R, Loranger L, Marcote H, De Corolis E. Voriconazole and fluconazole susceptibility of *Candida* isolates. *J Med Mycol.* 2002; 51(6): 479-83.

Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Barry AL, Rex JH. Strain variation and antifungal susceptibility among bloodstream isolates of *Candida* species from 21 different medical institutions. *Clin Infect Dis.* 1995; .21:1507-9.

Pfaller MA, Jones RN, Messer AS, Edmond MB, Wenzel RP. National surveillance of nosocomial blood stream infections due to *Candida albicans*. Frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 31:327-32.

Piqueras A I, Rubio T, Lopez-Medina E M, Gimeno A, Modesto V, Cantón E, Pemán J. Recent changes in candidemia trends in a tertiary hospital (2011–2018). *Rev Iberoam Micol* 2020 Jul-Out; 37 (3-4): 87-93.

Price MF, Wilkinson ID, Gentry LKO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia.* 1982; 20(1): 7-14.

Quindós G, Alonso-Vargas R, Helou S, Arechavala A, Mazuelos EG, Negroni R. Evaluación de un nuevo método de cultivo cromógeno (*Candida* ID) para la el aislamiento e identificación presuntiva de *Candida albicans* y otras levaduras de interes médico. *Rev Iberoam Micol.* 2001; 18:23-8.

Rodrigues DKB. Distribuição das espécies de crípticas de *Candida* em isolados de corrente sanguínea: identificação e perfil de sensibilidade antifúngica. [tese] São Paulo: Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria do Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2020.

Rodríguez ML, Rosa AC, Rodríguez JG, Natri L, Jentuchowicz VM. Oral mucosa as a potential source of candidemia by *Candida parapsilosis* sensu stricto, under pathological conditions. *SOJ Microbiol Infect Dis.* 2018; 6(1): 1-10.

Ruchel R, Tegeler R, Trost TM. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia.* 1982; 20:233-44.

Ruiz LS, Sugizaki MF, Montelli AC, Matsumoto FE, Pires MFC, Da Silva B.C.M, E.H., SILVA, Gandra RF, Silva E, Gonçalves, Auler ME, Paula CR. Fungemia by yeasts in Brazil: occurrence and phenotypic study of strains isolated at the Public Hospital, Botucatu, São Paulo. *Journal de Mycologie Médicale*. 2005; (15): 13-21.

Ruiz LC, Khouri S, Haln CR, Da Silva EG, Parizinato VK, Gandra RF, Paula CR. Candidemia by species of the *Candida parapsilosis* complex in children's Hospital: Prevalence, biofilm production and antifungal susceptibility. *Mycopathologia*. 2013 Apr;175(3-4):231-9. doi: 10.1007/s11046-013-9616-5.

Sato T, Kishi M, Suda M, Sakata K, Shimoda H, Miura H, Ogawa A, Kobayashi S. Prevalence of *Candida albicans* and non-*albicans* on the tongue dorsa of elderly people living in a post-disaster area: a cross-sectional survey. *BMC Oral Health*. 2017 Feb 1;17(1):51. doi: 10.1186/s12903-017-0342-0.

Sav H, Altinbas R, Dursun ZB. Fungal profile and antifungal susceptibility pattern in patients with oral candidiasis. *Infez Med*. 2020 Sep 1;28(3):392-6.

Shokoohi G, Javidnia J, Mirhendi H, Rasekh-Jahromi A, Rezaei-Matehkolaei A, Ansari S, Maryami F, Goodarzi S, Romeo O. Molecular identification and antifungal susceptibility profiles of *Candida dubliniensis* and *Candida africana* isolated from vulvovaginal candidiasis: A single-centre experience in Iran. *Mycoses*. 2021 Jul;64(7):771-9. doi: 10.1111/myc.13280.

Silva JJ, Silva TA, Almeida H, Netto MFR, Cerdeira CD, Hofling JF, Boriollo MFG. *Candida* species biotypes in the oral cavity of infants and children with orofacial clefts under surgical rehabilitation. *Microb Pathog*. 2018 Nov; 124:203-15. doi: 10.1016/j.micpath.2018.08.042

Soares LPMA, Oliveira LT, Carneiro ICRS. Bloodstream infection by *Candida* spp. in the neonatal unit of a teaching hospital from North Region, Brazil: study of risk factors. *Rev Pan-Amaz Saude* 2013; 4(3):19-24.

Spolidorio DMP, Boriollo MFG, Estela C, Spolidorio LC. Diferentes métodos fenotípicos para isolamento e identificação de espécies de *Candida*. *Robrac*. 2009; 18(45):18-26.

St-Germain G, Laverdière M, Pelletier R, Bougault AM, Libman M. Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from blood and other normally sterile sites: Results of 2-year (1996 to 1998) Multicenter surveillance study in Quebec, Canada. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(3): 949-53.

Tinoco-Araujo JE, Araújo DF, Barbosa PG, Da Silva Santos PS, Medeiros AM. Invasive candidiasis and oral manifestations in premature newborns. *Einstein*. 2013; 11(1):71-5.

Toprak NÜ, Erdoğan S, Çelik C, Johansson C. In Vitro Suscetibilidade à Anfotericina B e Fluconazol de Cepas de *Candida* isoladas de hemoculturas. *Turk Microbiology Soc J* 2003; 33: 252-6.

Vila T, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Mary Ann Jabra-Rizk MA. Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity . *J Fungi*. 2020; 6(1):15. doi: 10.3390/jof6010015.

Varano N, Lima MFM, Cardoso IR, Barbosa GG, Jesus ALL, Prado CR, Marques LA, Silva NBS, Roder DVDB. *Candida* spp infections in immunosuppressed patients. *J Infect Control* 2019 Jan-Abr; 8(1):17-23.

Vieira AJH, Santos JI. Mechanisms of resistance of *Candida albicans* to the antifungals fluconazole, amphotericin B and caspofungin. *Rev Bras de An Clin*. 2017; 49(3):235-9. doi: 10.21877/2448-3877.201600407

Vinitha MBM. Activity of proteinase, phospholipase and biofilm as virulence markers in *Candida* species isolated from haematogenous samples. *J Hosp Infect* 2009; 94-5.

Warris A, Pana ZD, Oletto A, Lundin R, Castagnola E, Lehrnbecher T, Groll AH and Roilides E. EURO CANDY Study Group. Etiology and Outcome of Candidemia in Neonates and Children in Europe: An 11-year Multinational Retrospective Study. *Pediatr Infect Dis J*. 2020 Feb;39(2):114-20. doi: 10.1097/INF.0000000000002530.

Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans Candida* Species. *Front Microbiol*. 2017 Jan 12;7:2173. doi: 10.3389/fmicb.2016.02173.

Xiao M, Chen SC, Kong F, Xu XL, Yan L, Kong HS, Fan X, Hou X, Cheng JW, Zhou ML, Li Y, Yu SY, Huang JJ, Zhang G, Yang Y, Zhang JJ, Duan SM, Kang W, Wang H, Xu YC. Distribution and Antifungal Susceptibility of *Candida* Species Causing Candidemia in China: An Update From the CHIF-NET Study. *J Infect Dis*. 2020 Mar 16;221(Suppl 2):S139-S147. doi: 10.1093/infdis/jiz573.

Yamamoto ACA. Infecção Hospitalar por Leveduras do Gênero *Candida* Isoladas de Pacientes Internados nos Hospitais Universitários de Cuiabá – MT – Brasil: Identificação Fenotípica e aspectos Epidemiológicos. [tese] Mato Grosso do Sul: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2010.

Zhou M, Li Y, Kudinha T, Xu Y and Liu Z. *Kodamaea ohmeri* as an Emerging Human Pathogen: A Review and Update. *Front Microbiol* 2021; 12:736582. doi: 10.3389/fmicb.2021.736582

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – FACULDADE DE ODONTOLOGIA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Convidamos o/a Senhor(a) a permitir a participação do(a) menor, que está sob vossa responsabilidade legal a participar da pesquisa “ **Estudo sentinela: Monitoramento da colonização fúngica de mucosa oral em crianças internadas em Hospital Público, São Paulo**”, que está sob responsabilidade da pesquisadora Regina Teixeira Barbieri Ramos. Sua participação é totalmente voluntária.

O objetivo geral desta pesquisa é verificar a colonização por leveduras na mucosa oral de crianças internadas em Hospital Público Infantil e análise de risco da colonização para possíveis casos de septicemia. Para isso faremos a coleta da mucosa oral com auxílio de “swabs”. Antes do início das coletas, os responsáveis legais pelas crianças serão orientados a preencher o “Termo de consentimento” de livre participação na pesquisa.

Procedimento: Após serem informadas e esclarecidas todas as dúvidas dos responsáveis sobre a pesquisa, e consequentemente obtivermos o consentimento do responsável em deixar o menor participar do estudo, será realizada a coleta da secreção oral com o auxílio de “swabs”, um tipo de palito estéril de plástico com um algodão na ponta, o qual coletará amostra da parte interna da bochecha do participante da pesquisa no dia da internação da criança e a cada 10 dias, enquanto o paciente estiver internado. As amostras coletadas serão enviadas para o laboratório, onde serão semeadas em meios específicos e realizado todos os processos de identificação. As amostras não serão guardadas, apenas utilizadas para fazer os exames e descartadas de acordo os procedimentos operacionais do laboratório responsável.

Não haverá gastos ou pagamentos para participar da pesquisa, visto que ela se realizará dentro do Hospital Infantil Darcy Vargas (HIDV), enquanto o paciente estiver internado. Ressaltamos que esta pesquisa **não acarretará em danos ao paciente**, visto que será feita coletas sem causar nenhum tipo de dor ou ferimento.

O **risco** da participação nesta pesquisa é inexistente, mas, o paciente pode sentir um pouco de desconforto durante a coleta.

Rubrica do Participante da Pesquisa

Rubrica do Pesquisador Responsável

Como **benefícios**: serão feitos monitoramentos, onde poderemos estudar a colonização da mucosa oral por leveduras, traçando assim um perfil epidemiológico: identificação das leveduras e parâmetros relacionados a sensibilidade aos antifúngicos. Prevenção de possíveis futuras infecções fúngicas. Durante todo esse processo, o clínico será notificado de todos os resultados para melhor tratar seus pacientes. Com a finalização deste estudo, esperamos, contribuir com a adoção de medidas que possam minimizar o aparecimento dessas infecções no hospital em estudo.

Caso, por algum motivo o responsável legal ou o participante da pesquisa, sinta a sua integridade (moral, psicológica e social) comprometida deverá relatar o ocorrido ao Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição pelo telefone 3091-7960, ou pelo e-mail cepfo@usp.br ou no endereço Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – 05508-000 – São Paulo – SP. Horário de funcionamento: segunda a sexta-feira das 8 as 17 h (exceto feriados e recesso universitário). O Comitê é um colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberado e educativo, criado para defender os interesses dos participantes de pesquisa em sua integridade e dignidade para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro dos padrões éticos. (Resolução CNS nº466 de 2012)

Os resultados obtidos ficarão sob cuidado dos pesquisadores envolvidos no projeto, e serão realizados como dados de pesquisa científica, podendo vir a serem divulgados em artigos e/ou congressos, resguardando sempre o **sigilo** quanto a sua identificação. As informações fornecidas serão **confidenciais** e de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis.

Se caso este estudo for descontinuado, as suas informações e resultados não serão utilizados.

Caso a participante da pesquisa deseje **retirar seu consentimento**, em qualquer fase da pesquisa, poderá fazê-lo sem nenhum prejuízo ou punição.

O estudo será conduzido pela aluna de Doutorado e Pesquisadora Regina Teixeira Barbieri Ramos, que estará à disposição para esclarecimentos e prestar a devida assistência no decorrer da pesquisa no endereço Av. Prof. Lineu Prestes, 2227, Cidade Universitária, São Paulo – SP ou pelo telefone 3091-7893, de segunda a sexta-feira das 8 às 17h (exceto feriados e recesso universitário), ou pelo e-mail reginatbarbieri@usp.br a qualquer momento.

Rubrica do Participante da Pesquisa

Rubrica do Pesquisador Responsável

Consentimento pós-informação:

Eu, _____, responsável legal pelo(a) menor _____ fui informado(a) sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, **eu concordo** em deixar o/a menor participar do projeto, sabendo que, não vou receber valor algum em dinheiro para participar e posso desistir quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Dados do Paciente:

NOME: _____ DATA DE NASCIMENTO: _____ SEXO: () Masc. () Fem. PESO: _____
 PATOLOGIA: _____ TEMPO DE INTERNAÇÃO: _____
 ENDEREÇO: _____
 Nº: _____ APTO: _____ BAIRRO: _____
 CIDADE: _____ CEP: _____
 TELEFONE: DDD(_____) _____

Acerca dos resultados dos exames:

- () SIM quero ser contatada e informada sobre os resultados dos exames que serão realizados
 () NÃO quero ser contatada e informada sobre os resultados dos exames que serão realizados

Acerca de novas pesquisas:

- () Declaro que as informações obtidas no questionário, resultados de exames e material biológico (secreção mucosa oral) **devem ser utilizadas apenas para esta pesquisa.**
 () Declaro que as informações do questionário, os resultados dos exames e o material biológico (secreção da mucosa oral) **podem ser utilizados para outras pesquisas**, sem que seja necessário me informar.
 () SIM desejo ser contatada novamente caso haja interesse de utilizar minhas informações obtidas a partir de questionário e resultados de exames, para uma nova pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

 Assinatura do Participante da Pesquisa

 Assinatura do Pesquisador
 Regina Teixeira Barbieri Ramos

APÊNDICE B – Termo de Assentimento (6 a 12 anos)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FACULDADE DE ODONTOLOGIA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP

Termo de assentimento para crianças
(de 6 anos a 12 anos)

O termo de assentimento (TALE) não elimina a necessidade de fazer o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) que deve ser assinado pelo responsável ou representante legal do menor de 18 anos ou legalmente incapaz.

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “**Estudo sentinela: Monitoramento da colonização fúngica de mucosa oral em crianças internadas em Hospital Público, São Paulo**”.

Seus pais ou responsáveis legais permitiram que você participe.

Queremos saber se dentro da sua boca tem microrganismos que podem causar algum tipo de doença para você.

As crianças que irão participar desta pesquisa têm de 0 a 17 anos de idade.

Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir.

A pesquisa será feita aqui no hospital enquanto você estiver internado(a). Logo na sua internação, faremos a coleta da secreção da parte interna das suas bochechas com o auxílio de um “swab”(uma espécie de cotonete longo estéril). Esse processo irá se repetir a cada 10 dias enquanto você estiver internado neste hospital. Esta coleta é muito simples, não há nenhum risco para você, mas você pode sentir algum desconforto durante a coleta. Caso aconteça algo errado, você pode nos procurar pelo telefone 3091-7960 da pesquisadora Regina Teixeira Barbieri Ramos.

Coisas boas que podem acontecer: fazendo estas coletas periodicamente, podemos prevenir o aparecimento da candidíase (pode causar uma doença na boca) e sua possível piora. Com isso, os médicos serão comunicados e irão tomar a melhor decisão para você ficar melhor o mais rápido possível. Isso também faz com que o tempo de internação não seja aumentado por conta disso.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa; não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar as crianças que participaram.

Quando terminarmos a pesquisa, esperamos contribuir com a adoção de medidas que possam minimizar o aparecimento das infecções por fungos no hospital em estudo.

Se você tiver alguma dúvida, você pode me perguntar. Eu escrevi os telefones na parte de cima deste texto.

CONSENTIMENTO PÓS INFORMADO

Eu _____ aceito participar da pesquisa
“**Estudo sentinela: Monitoramento da colonização fúngica de mucosa oral em crianças internadas em Hospital Público, São Paulo**”.

Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer.

Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir e que ninguém vai ficar furioso.

Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

São Paulo, ____ de _____ de _____.

Assinatura do menor

Assinatura da pesquisadora
Regina Teixeira Barbieri Ramos

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP

Faculdade de Odontologia - Universidade de São Paulo (USP)

telefone 3091-7960, ou pelo e-mail cepfo@usp.br ou no endereço Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – 05508-000 – São Paulo – SP. Horário de funcionamento: segunda a sexta-feira das 8 às 17 h (exceto feriados e recesso universitário).

APÊNDICE C – Termo de Assentimento (12 a 17 anos)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FACULDADE DE ODONTOLOGIA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP

Termo de assentimento para crianças
(de 12 anos a 17 anos)

O termo de assentimento (TALE) não elimina a necessidade de fazer o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) que deve ser assinado pelo responsável ou representante legal do menor de 18 anos ou legalmente incapaz.

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “**Estudo sentinela: Monitoramento da colonização fúngica de mucosa oral em crianças internadas em Hospital Público, São Paulo**”.

Seus pais ou responsáveis legais permitiram que você participe.

Queremos saber se dentro da sua boca tem microrganismos que podem causar algum tipo de doença para você.

As crianças que irão participar desta pesquisa têm de 0 a 17 anos de idade.

Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir.

A pesquisa será feita aqui no hospital enquanto você estiver internado(a). Logo na sua internação, faremos a coleta da secreção da parte interna das suas bochechas com o auxílio de um “swab”(uma espécie de cotonete longo estéril). Esse processo irá se repetir a cada 10 dias enquanto você estiver internado neste hospital. Esta coleta é muito simples, não há nenhum risco para você, mas você pode sentir algum desconforto durante a coleta. Caso aconteça algo errado, você pode nos procurar pelos telefone 3091-7960 da pesquisadora Regina Teixeira Barbieri Ramos.

Coisas boas que podem acontecer: fazendo estas coletas periodicamente, podemos prevenir o aparecimento da candidíase (pode causar uma doença na boca) e sua possível piora. Com isso, os médicos serão comunicados e irão tomar a melhor decisão para você ficar melhor o mais rápido possível. Isso também faz com que o tempo de internação não seja aumentado por conta disso.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa; não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar as crianças que participaram.

Quando terminarmos a pesquisa, esperamos contribuir com a adoção de medidas que possam minimizar o aparecimento das infecções por fungos no hospital em estudo.

Se você tiver alguma dúvida, você pode me perguntar. Eu escrevi os telefones na parte de cima deste texto.

CONSENTIMENTO PÓS INFORMADO

Eu _____ aceito participar da pesquisa
“**Estudo sentinela: Monitoramento da colonização fúngica de mucosa oral em crianças internadas em Hospital Público, São Paulo**”.

Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer.

Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir e que ninguém vai ficar furioso.

Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

São Paulo, ____ de _____ de _____.

Assinatura do menor

Assinatura da pesquisadora
Regina Teixeira Barbieri Ramos

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP

Faculdade de Odontologia - Universidade de São Paulo (USP)

telefone 3091-7960, ou pelo e-mail cepfo@usp.br ou no endereço Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – 05508-000 – São Paulo – SP. Horário de funcionamento: segunda a sexta-feira das 8 as 17 h (exceto feriados e recesso universitário).

APÊNDICE D - PROTOCOLO I – MONITORAMENTO DOS ACHADOS LABORATORIAIS

Procedência da cepa: mucosa oral

Setor de Internação _____

Registro e dados do paciente _____

Data: _____

1- Cultura

Ágar Sabouraud dextrose: _____

“Chromagar” (verificação de cor): _____

2- Identificação Tradicional

- ❖ Macro e Micromorfologia – Microcultivo _____
- ❖ Crescimento a 37°C: _____
- ❖ Hidrólise da ureia: _____
- ❖ Presença de cápsula: _____
- ❖ Reação ao TTC: _____

3- Identificação pelo Maldi Tof:

4- Testes de sensibilidade aos antifúngicos:

4.1- Método EUCAST: Anfotericina B, fluconazol, voriconazol e nistatina.

- ❖ Antifúngico: _____ MICS: _____
- ❖ Classificação – resistência /sensibilidade _____

5- Identificação e Resultados com os antifúngicos

APÊNDICE E - PROTOCOLO II - COMUNICAÇÃO DOS ACHADOS LABORATORIAISmucosa oral

1- Presença de leveduras: _____

2- Ausência de leveduras: _____

3- Identificação

4- Antifungigrama

4.1. EUCAST

5- Resultados em 24hs a 48hs após o isolamento para métodos tradicionais. Caso necessário, pronta execução dos testes de antifúngicos.

6- Resultados entre 15 e 30 minutos – Maldi Tof.

7- Comunicação imediata do complexo *C haemulonii*, *C auris* e de outros isolados multirresistentes._____

ANEXO A- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FOU SP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Estudo sentinela: Monitoramento da colonização fúngica da mucosa oral em crianças internadas em Hospital Público, São Paulo.

Pesquisador: Claudete Rodrigues Paula

Área Temática:

Versão: 7

CAAE: 03211218.2.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia

Patrocinador Principal: Capes Coordenação Aperf Pesquisa Nível Superior

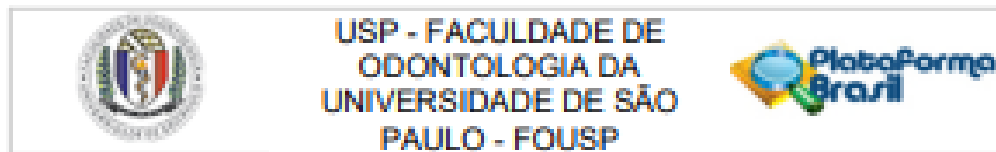
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.747.441

Apresentação do Projeto:

Este projeto foi aprovado com parecer emitido em 01/03/2019 sob o nº3.179.917. Agora as autoras do projeto submetem uma emenda com a seguinte modificação: Eu e minha orientadora resolvemos refinar a metodologia de sensibilidade/resistência pelo método de Disco Difusão por não ser um método muito preciso. Resolvemos então, fazer a metodologia de sensibilidade/resistência pela técnica de microdiluição em caldo segundo EUCAST (2020) por ser metodologia gold standard. Toda a parte molecular foi refinada, pois, utilizamos o método MALDI-ToF para identificação das leveduras, método extremamente atual. Em 28/10/2022, no arquivo apresentado PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2041065_E4.pdf, no resumo, a pesquisadora refere: Atualmente a candidemia é reconhecida como importante problema de saúde pública. A gravidade da doença, associada a condições debilitantes do paciente, levam a um aumento do tempo de internação hospitalar, acarretando uma elevação nos casos de infecção nosocomial e de custos socio-econômicos. Ressaltamos mais uma vez, que a mortalidade infantil é um grave problema de saúde pública, devido ao grande número de mortes precoces e na sua maioria poderiam ser evitadas. Estima-se, que, no mundo, mais de 20000 crianças com idade inferior a 5 anos morre por dia. Em crianças hospitalizadas, a candidemia é uma doença frequente, sendo que a epidemiologia desta infecção fúngica difere entre os neonatos, crianças e adultos. Estudos da Unidade Intensiva de Tratamento (UTI) ainda são escassos e são de grande valia para se agregar

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes 2207 - 1º andar, sala 02 da administração
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-000
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)2091-7960 Fax: (11)2091-7960 E-mail: cepfo@usp.br



Continuação do Parecer: 0.707.007

maiores informações a respeito da prevalência das espécies de leveduras, fatores relacionados a virulência e sensibilidade aos antifúngicos. O projeto é de importância não só para a comunidade científica, mas também para as instituições envolvidas neste trabalho. O hospital em estudo, necessita deste tipo de pesquisa para que se possa conhecer o perfil das leveduras colonizantes nas crianças. Assim, possibilita-se também o melhor conhecimento das leveduras presentes na mucosa oral. Em estudo realizado em diferente Hospital Público Infantil, pode-se observar que a colonização da mucosa oral é um fator de destaque para a candidemia (BATISTA et al, 2013). Salientamos que a linha de pesquisa da nossa orientadora – “Leveduras Patogênicas”

encontra-se bem estabelecida, somando mais de 35 anos, com inúmeros auxílios da FAPESP, publicações, apresentações em Congressos Nacionais e Internacionais, teses de mestrado, doutorado e pós-doc. Agora este laboratório está alocado na Faculdade de Odontologia da

USP. Assim este projeto vem agregar novos conhecimentos e novas abordagens aos estudos de leveduras na mucosa oral neste grupo tão especial de pacientes, crianças hospitalizadas e com diferentes patologias. Por meio deste estudo poderemos avaliar mais profundamente a colonização da mucosa oral como fator de risco para possível sepse fúngica, comunicando e fornecendo subsídios para o gerenciamento dos achados profissionais de saúde. Um protocolo dos achados micológicos será elaborado.

Portanto a Metodologia (modificada) proposta assim está descrita: O presente estudo será conduzido, de forma prospectiva, em crianças de 0 a 17 anos, internadas em Hospital Público Infantil, S.P., a partir de março de 2019. O referido Hospital, subordinado a Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, integrado ao SUS, possui alta complexidade, com 90 leitos, o que lhe confere, segundo COSTA (1998), o título de hospital terciário de médio porte. Este mesmo hospital, atende crianças com diversas patologias.

COLETA DE MATERIAL DAS CRIANÇAS:- Antes do início das coletas, os responsáveis pelas crianças serão orientados a preencher o “Termo de Consentimento” de livre participação na pesquisa. Nas crianças os seguintes dados serão avaliados: idade, sexo, peso, patologia e tempo de internação. As coletas serão realizadas na mucosa oral na internação e a cada 10 dias, durante o período de estadia no Hospital. Os materiais serão coletados com auxílio de “swabs” e, semeados em ágar Sabouraud dextrose (Difco, EUA) e CHROMagar Candida (BioMérieux, França). As culturas isoladas serão armazenadas para posterior análise laboratoriais.

PERFIL FENOTÍPICO DAS LEVEDURAS:- Método Tradicional- Os testes a serem empregados segundo a Monografia. “The Yeasts. A taxonomic study”: análise macro e micromorfológicas, formação de clamidoconídios, tubo germinativo e características fisiológicas (KURTZMAN et al,

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2207 - 1º andar, sala 02 da administração
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)2091-7960 **Fax:** (11)2091-7960 **E-mail:** cepto@usp.br



USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FOUSP



Continuação do Parecer 0.707.447

2011). Inicialmente todas as amostras de leveduras isoladas serão semeadas por espalhamento de alça no meio cromogênico CHROMagar®.

PROCEDIMENTO DE ANÁLISE DOS RESULTADOS:- Os dados serão tabulados e analisados com auxílio da planilha eletrônica Microsoft-Excel, versão 2010 e GraphPad Quickcalca online calculator. As variáveis a serem analisadas serão sexo, idade, tipo de patologia, presença ou ausência de leveduras e lesões micológicas.

FATORES RELACIONADOS À VIRULÊNCIA Proteínas (RUCHEL et al, 1982) MALDI-TOF:- Todas as amostras serão identificadas por espectrometria de massa. Assim, as cepas serão incubadas por 48 horas a 30°C em ágar Sabouraud dextrose e cinco colônias serão transferidas

para microtubos de 1,5mL por meio de alça bacteriológica. Após agitação rigorosa com 0,3mL de água destilada, 0,9mL de etanol será adicionado à cada amostra e então centrifugados a 20.000g por 2 minutos.

Após descarte do sobrenadante o sedimento será secado em ar ambiente. Após, 10µL do sedimento serão misturados com 50µL de ácido fórmico (70%), e volume igual de acetonitrila será adicionada a amostra. A mistura será então novamente centrifugada a 20.000g por 2 minutos e 1µL do sobrenadante será adicionado na placa de aço MALDI, que secará em ar ambiente. Em sequência serão adicionados 2µL da matriz (ácido ciano-4-hidróxido-cinnâmico em ácido acetonitrila-2,5% trifluoroacético a 50%), que secarão em ar ambiente e a análise será realizada em um sistema Microflex LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), em triplicata, para avaliar a qualidade e reprodutibilidade dos espectros. Por fim, os espectros no intervalo de massa $m/z = 2.000$ a 20.000 serão obtidos e analisados no software Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics) (Lima-Neto et al, 2014). Os resultados são expressos em logscore e, segundo o fabricante, valores de logscore entre 1,7 e 2,0 são aceitáveis para identificação do gênero, enquanto valores de logscore 2,0 são requeridos para uma identificação acurada da espécie.

TESTE de SENSIBILIDADE aos ANTIFUNGICOS – Método de Microdiluição em caldo segundo EUCAST (2020):- Serão utilizados os fármacos em pó, anfotericina B, fluconazol, nistatina e voriconazol para o preparo de soluções estoque (soluções mãe), mantidas congeladas a

-70°C. Soluções dos antifúngicos devem ser preparadas levando-se em consideração a potência do lote do pó do antifúngico que será utilizado. A ser calculada como segue: As soluções mãe (12.800 mg/L para todos os fármacos diluídos em DMSO) serão preparadas a partir da pesagem dos antifúngicos em balança analítica.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar - sala 02 da administração
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05508-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2061-7960 Fax: (11)2061-7960 E-mail: cepfo@usp.br



USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FOU SP



Continuação do Parecer: 5.707.617

Objetivo da Pesquisa:

Com os dados retirados do Arquivo:PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2041065_E4.pdf anexado em 28/10/22, a Hipótese e os Objetivos apresentados são:

Com a finalização do projeto, espera-se conhecer melhor a epidemiologia das leveduras na mucosa oral destas crianças. Assim esperamos contribuir com a adoção de medidas que possam minimizar o aparecimento dessas infecções no hospital de estudo. Os resultados dos testes de sensibilidade também poderão orientar o clínico para um tratamento mais adequado. Estes resultados redundarão na caracterização e elaboração de protocolo de comunicação e gerenciamento do fator de risco, no caso colonização da mucosa oral. Na sequência os resultados serão publicados em Revistas Científicas Internacionais e Nacionais, bem como em Congressos, Simpósios e outros eventos de divulgação científica.

Com esta pesquisa

algumas perguntas poderão ser respondidas como: a importância da colonização da mucosa oral para a evolução da sepsis; resistência aos antifúngicos; principais medidas para o gerenciamento destas septicemias.

Objetivo Primário:

Verificar a colonização por leveduras na mucosa oral de crianças internadas em Hospital Público Infantil: caracterização das leveduras, comunicação e gerenciamento dos achados no período de estudo. Análise de risco da colonização para possíveis casos de septicemia.

Objetivo Secundário:

1. Isolar as leveduras da mucosa oral de crianças hospitalizadas;
2. Identificar as leveduras, isoladas por métodos tradicionais: Análises macro e micro-morfológicas, formação de clamidoconídios, tubo germinativo e características fisiológicas (auxanograma e zimograma).
3. Cultivo em meio de Chromagar; purificação das cepas e diagnóstico presuntivo.
4. Caracterização das cepas pela técnica de espectrometria de massa MALDI-ToF.
5. Comparar os resultados obtidos para a identificação das leveduras (Métodos tradicionais; "Chromagar Candida" e MALDI ToF).
6. Fatores relacionados a virulência: pesquisa proteômica.
7. Determinar a sensibilidade/resistência das cepas isoladas pelo método de microdiluição em caldo aos antifúngicos: anfotericina B; nistatina; fluconazol; e voriconazol. A leitura dos antifúngicos foi realizada pelo método EUCAST.

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes 2227 - 1º andar, sala 03 de administração
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7960 E-mail: ocpto@usp.br



USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FOU SP



Continuação do Parecer: S. 307-017

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos, onde o participante da pesquisa poderá apresentar algum desconforto durante a coleta do material da mucosa oral, desconforto esse inerente ao exame. Como benefício, poder-se-á estudar a colonização da mucosa oral por leveduras, traçando assim um perfil epidemiológico, identificação das leveduras e parâmetros relacionados a sensibilidade aos antifúngicos, contribuindo para a prevenção de possíveis infecções fúngicas futuras.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este é um estudo sentinela, realizado no Brasil que tem como co-participante um hospital público de São Paulo - capital (Hospital Infantil Darcy Vargas), onde serão incluídos 60 participantes. É unicêntrico, prospectivo, não randomizado, realizado para obtenção do título de Doutorado. Tem como patrocinador principal CAPES. Não haverá armazenamento de amostras em banco de material biológico. Com previsão de encerramento para 30/01/2023.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Seguindo as orientações do CNS, resolução 466/12, todos os documentos obrigatórios foram adequadamente apresentados e as adequações realizadas nos documentos: Informações básicas do projeto; projeto detalhado; estando a emenda justificada.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Resalta-se que cabe ao pesquisador responsável encaminhar os relatórios parciais e final da pesquisa, por meio da Plataforma Brasil, via notificação do tipo "relatório" para que sejam devidamente apreciados no CEP, conforme Norma Operacional CNS nº 001/13, item XI.2.d.

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "EMENDA", por meio da Plataforma Brasil, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação (Norma Operacional 001/2013 – letra H).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_204108_S_É4.pdf	28/10/2022 09:53:18		Aceito

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2207 - 1º andar, sala 02 da administração
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7960 E-mail: cepfo@usp.br



USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FOUSP



Continuação do Parecer: 0.707.001

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoEMENDA27103023.pdf	28/10/2022 09:42:01	REGINA TEDEIRA BARBIERI RAMOS	Aceito
Outros	CARTAALTERAÇESEJUSTIFICATIVA.p df	28/04/2021 10:25:02	REGINA TEDEIRA BARBIERI RAMOS	Aceito
Outros	CARTAALTERAÇEES.pdf	05/02/2021 13:32:45	REGINA TEDEIRA BARBIERI RAMOS	Aceito
TÓCLE / Termo de Assentimento / Justificativa de Ausência	ASSENTIMENTO12a17ANOS.pdf	12/11/2019 17:52:55	REGINA TEDEIRA BARBIERI RAMOS	Aceito
TÓCLE / Termo de Assentimento / Justificativa de Ausência	ASSENTIMENTO6a12ANOS.pdf	12/11/2019 17:52:25	REGINA TEDEIRA BARBIERI RAMOS	Aceito
Outros	RESPOSTAS2.pdf	25/02/2019 20:38:15	REGINA TEDEIRA BARBIERI RAMOS	Aceito
Outros	Resposta.pdf	04/01/2019 12:39:04	REGINA TEDEIRA BARBIERI RAMOS	Aceito
Outros	anuencia1.pdf	14/11/2018 15:41:01	REGINA TEDEIRA BARBIERI RAMOS	Aceito
Outros	coparticipante.pdf	14/11/2018 09:51:53	REGINA TEDEIRA BARBIERI RAMOS	Aceito
Folha de Rosto	Folhadecosto.pdf	14/11/2018 09:21:23	REGINA TEDEIRA BARBIERI RAMOS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 08 de Novembro de 2022

Assinado por:
Alyne Simões Gonçalves
(Coordenador(a))

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar , sala 08 da administração
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7990 Fax: (11)3091-7990 E-mail: ceplo@usp.br

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Darcy Vargas (HIDV)



PARECER OFICIAL DA INSTITUIÇÃO

DO: COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA HIDV/SES

PARA: REGINA TEIXEIRA BARBIERI RAMOS / CLAUDETE RODRIGUES PAULA

CAAE: 0321128.2.0000.0075

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Darcy Vargas, analisou e autorizou a pesquisa "**Estudo Sentinela: Monitoramento da colonização fúngica de mucosa oral em crianças internadas em Hospital Público, São Paulo**" sob responsabilidade de **Regina Teixeira Barbieri Ramos e Claudete Rodrigues Paula**.

A referida pesquisa deverá ter acompanhamento deste CEP quanto à sua execução e finalização, segundo Resolução 196/96 e Resoluções Complementares CONEP/CNS/MS, devendo o responsável entregar relatório detalhado com os resultados e/ou objetivos alcançados dentro da proposta oferecida ao Comitê de Ética em Pesquisa HIDV, no prazo de 30 dias após o término dos trabalhos.

São Paulo, 07 de maio de 2019.

Dr. Sergio Antonio Bastos Sarubbo
Diretor Técnico de Saúde III
UGA III – Hospital Infantil Darcy Vargas

/tbv

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/HIDV

R. Dr. Serafíco de Assis Carvalho, 34, 6º Andar – Jd. Guadala | CEP 05614-040 | São Paulo, SP |
Fone: (11) 3723-3736 / 3712 | cep.darcyvargas@gmail.com

ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em Pesquisa - HIV



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
HOSPITAL INFANTIL DARCY VARGAS

Rua Dr. Sílvio de Jesus Cavalari, nº 34 - Morumbi
São Paulo - SP - CEP: 05508-900 - Fone: (11) 5072 - 3333

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA HIV/SIES
hiv@cep@saude.sp.gov.br



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

0000000

1. Dados de identificação do sujeito da pesquisa ou responsável legal

NOME:		RG:	
IDADE:	DATA DE NASCIMENTO:	SEXO: <input type="checkbox"/> MASC <input type="checkbox"/> FEM	
TEL.: ()			
RESPONSÁVEL:			
GRAU DE PARENTESCO: <input type="checkbox"/> MÃE <input type="checkbox"/> PAI <input type="checkbox"/> AVÔS <input type="checkbox"/> OUTROS: _____			
END.:			
Nº:	COMP.:	BAIRRO:	MUNIC.:

2. Dados sobre a Pesquisa

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA: Estudo sentinela: Monitoramento da colonização fúngica de mucosa oral em crianças internadas em Hospital Público, São Paulo.
PESQUISADOR: Regina Teixeira Barbieri Ramos
PROFISSÃO: Bióloga

3. Avaliação do Risco da Pesquisa

<input checked="" type="checkbox"/> Sem risco	<input type="checkbox"/> Risco Muito	<input type="checkbox"/> Risco Médio
<input type="checkbox"/> Risco Baixo	<input type="checkbox"/> Risco Maior	
(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como OPORTUNISTA (mediato ou tardio))		

4. Duração da Pesquisa

A duração da pesquisa é de quatro anos.

Observação: "Prestar assistência especializada e multidisciplinar, de forma humanizada, à saúde das crianças e da adolescência, promovendo o melhor desenvolvimento da criança sobrecuidada com as pesquisas, do Hospital Infantil Darcy Vargas (HIDV) e do Policlínico de Crianças e do Laboratório (PC/LC)."



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
HOSPITAL INFANTIL DARCY VARGAS

Rua Dr. Ernânio de Assis Carvalho, nº 310 - Morumbi
São Paulo - SP - CEP: 05616-000 - Fone: (11) 3073-3100

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA HIV/S&S
hiv-cen@saude.sp.gov.br



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

USP/02/08

5. Registro das explicações do pesquisador ao paciente ou seu representante legal sobre a pesquisa

Texto dissertativo contendo as informações abaixo:

- Justificativa e objetivo da pesquisa;
- Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação ~~do procedimento~~ que não são ~~experimentais~~;
- Desconfortos e riscos esperados;
- Benefícios que poderão ser obtidos;
- Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

8. Esclarecimentos dados pelo pesquisador sobre garantias do sujeito da pesquisa

Texto dissertativo contendo as informações abaixo:

- Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para diminuir eventuais ~~prejuízos~~;
- Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga ~~prejuízo~~ à continuidade da assistência;
- Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade;
- Disponibilidade de assistência no HIV, por ~~eventuais~~ danos à saúde, decorrentes da pesquisa;
- Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

7. Informações de nomes, endereços e telefones dos responsáveis pelo acompanhamento da pesquisa, para contato de intercorrências ~~clínicas~~ e reações adversas

O estudo será conduzido pela aluna de Doutorado e Pesquisadora Regina Teixeira Barbieri Ramos,



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
HOSPITAL INFANTIL DARCY VARGAS

Rua Dr. Antônio de Assis Carvalho, nº 24 - Morumbi
São Paulo - SP - CEP: 08160-000 | Fone: (11) 3033 - 3333



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA HIDV/SES
hivh-cem@saude.sp.gov.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

000000

que estará à disposição para esclarecimentos e prestar a devida assistência no decorrer da pesquisa no endereço Av. Prof. Linea Prestes, 2227, Cidade Universitária, São Paulo - SP ou pelo telefone 3091-7893, de segunda a sexta-feira das 8 às 17h (exceto feriados e recesso universitário), ou pelo e-mail regina@barbieri@usp.br a qualquer momento.

8. Observações complementares

9. Consentimento pós esclarecido

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, ____ de _____ de ____.

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Assinatura do Pesquisador (carimbo ou nome legível)