

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**Epidemiological survey of the pattern of colonization
and infection caused by species of the *Candida* genus
in Hospitals of the Lisbon area: emphasis on azole
resistance and emergence of non-conventional
species**

Catarina Ribeiro Mendonça

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2019

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**Epidemiological survey of the pattern of colonization
and infection caused by species of the Candida genus
in Hospitals of the Lisbon area: emphasis on azole
resistance and emergence of non-conventional
species**

Catarina Ribeiro Mendonça

**Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentada à
Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

**Orientador: Doutor Nuno Pereira Mira, Professor Auxiliar, Instituto
Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Dep. Bioengenharia**

**Co-Orientador: Doutora Maria Manuel Lopes, Professora Auxiliar,
Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Dep. Microbiologia e
Imunologia**

2019

Resumo

Até hoje já foram conduzidos em Portugal alguns estudos epidemiológicos focados na caracterização da candidemia invasiva, no entanto, pouco se sabe sobre qual o padrão de colonização das espécies do género *Candida* em nichos considerados não estéreis onde estas espécies podem existir como comensais. Estudos recentes têm demonstrado o papel importante que as populações comensais podem desenvolver enquanto focos de infeção invasiva. Nesse sentido, neste trabalho foi analisada a frequência de isolamentos de *Candida* spp. em mais de 1000 isolados recolhidos de amostras estéreis e não estéreis em 5 grandes centros hospitalares e num conjunto de Postos de Recolha da área de Lisboa. Para além da caracterização da frequência dos isolados das espécies nos diferentes produtos, foi analisada a suscetibilidade de um conjunto alargado destes isolados a 3 antifúngicos com relevância na prática clínica, anfotericina B, fluconazol e voriconazol. No geral, os resultados obtidos confirmam a elevada prevalência de *C. albicans* enquanto espécie colonizadora de amostras estéreis e não estéreis. Apesar disso, uma percentagem significativa de isolados (26 %) pertencentes a espécies *Candida* não-*albicans* foi observada, com ênfase para as espécies *C. glabrata* (14 %), *C. parapsilosis* (5 %) e *C. tropicalis* (4 %). Esta distribuição é consistente com os resultados reportados em estudos epidemiológicos desenvolvidos anteriormente em Portugal e ao redor do mundo. A prevalência de resistência aos antifúngicos observada foi baixa em todas as espécies (0,36 %) tendo sido possível identificar pelo menos 1 isolado de *C. glabrata*, recolhido de exsudado vaginal, resistente a fluconazol e voriconazol. Tentou-se verificar se este fenótipo de resistência estaria subjacente à existência de mutações de ganho de função na sequência do regulador transcricional CgPdr1 tendo-se identificado 3 mutações, nomeadamente, V91I, L98S e D243N.

Palavras-chave: candidose, candidemia, colonização por *Candida*, *Candida albicans*, espécies de *Candida* não-*albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, resistência aos antifúngicos, *Candida africana*.

Abstract

To date, some epidemiological studies focused on cases of invasive candidemia have been conducted in Portugal, however, little is known about what the pattern of colonization of species of the genus *Candida* in niches considered non-sterile where this species can exist as commensals. Recent studies have shown the important role that commensal population can develop as foci of invasive infections. In this sense, in this work it was examined the frequency of isolation of *Candida* spp. in more than 1000 isolates collected from sterile and non-sterile samples in 5 major hospital centers and in a set of Collection stations of the Lisbon area. Besides the characterization of the frequency of species isolates in the different products, it was also tested the susceptibility to 3 antifungals with relevance in the clinical practice, amphotericin B, fluconazol and voriconazol. In general, the results obtained confirmed the high prevalence of *C. albicans* while colonizer species in sterile and non-sterile samples. Nevertheless, a significant percentage of isolates (26 %) belonging to non-*Candida albicans* *Candida* species was also observed with emphasis on *C. glabrata* (14 %), *C. parapsilosis* (5 %) and *C. tropicalis* (4 %). This distribution is consistent with the results reported in other epidemiological surveys undertaken in Portugal and worldwide. The incidence of resistance to antifungals observed was low in every species (0,36 %) and it was possible to identify at least 1 *C. glabrata* isolate, from a vaginal niche, resistant to fluconazol and voriconazol. It was attempted to verify if this phenotype of resistance would be underlying the existence of gain of functions mutations in the transcriptional regulator *CgPDR1* sequence and 3 mutations were identified, namely, V91I, L98S e D243N.

Key words: candidiasis, candidemia; *Candida* colonization; *Candida albicans*; non-*Candida albicans* *Candida* species; *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, antifungal resistance, *Candida africana*.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer muito à Professora Doutora Maria Manuel Lopes pelo voto de confiança que me deu, para além de ter demonstrando uma grande disponibilidade que sempre revelou em ajudar-me, sem ela esta hipótese de desenvolver e concretizar um projeto na área da Micologia nunca teria sido possível.

Por outro lado, agradeço bastante ao meu supervisor Professor Doutor Nuno Mira que se revelou essencial, por me ter dado a oportunidade de fazer parte dos seus projetos científicos, por me ter aconselhado sempre que necessitei e por me ter motivado a ser cada vez melhor no trabalho que estava a desenvolver.

Especial agradecimento à Dra. Vitória Rodrigues por me terem disponibilizado o acesso aos isolados clínicos usados neste estudo.

Estou igualmente grata a todos os colegas do Instituto Superior Técnico que me ajudaram na integração, que se revelaram importantes para o sucesso desta etapa académica na minha vida, especialmente à Sara Salazar, que me aturou todos os momentos e me apoiou imenso no trabalho de laboratório, ao João Lucas e à Inês Fonseca que estiveram sempre disponível para me ajudar e ouvir os meus desabafos.

Por fim, agradeço imensamente há minha família e aos meus amigos pela força e apoio que sempre me deram ao longo destes últimos meses, sem eles teria sido muito mais difícil.

Abreviaturas

<i>C. africana</i>	<i>Candida africana</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. dubliniensis</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
<i>C. famata</i>	<i>Candida famata</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. guilliermondii</i>	<i>Candida guilliermondii</i>
<i>C. kefyr</i>	<i>Candida kefyr</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>C. lusitaniae</i>	<i>Candida lusitaniae</i>
<i>C. nivariensis</i>	<i>Candida nivariensis</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>C. rugosa</i>	<i>Candida rugosa</i>
<i>C. thermophila</i>	<i>Candida thermophila</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O _{530 nm}	Densidade Ótica a 530 nm
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight
RPM	Rotações por minuto
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>T. asteroides</i>	<i>Trichosporon asahii</i>
YPD	Yeast Peptone Dextrose

Índice

1. Corpo do Trabalho	10
1.1. Introdução	10
1.2. Objetivo.....	12
2. Materiais e Métodos.....	14
2.1. Estirpes e meios de cultura	14
2.2. Soluções de Antifúngicos	14
2.3. Determinação da suscetibilidade a antifúngicos de isolados de <i>C. glabrata</i> em microplacas de 96 poços	15
2.4. Crescimento <i>C. albicans</i> em microplacas de 96 poços.....	16
2.5. Amplificação e sequenciação do gene <i>CgPDR1</i>	17
2.6. Identificação de <i>C. africana</i> de entre o conjunto de isolados de <i>C. albicans</i> disponíveis	18
3. Resultados e Discussão	19
3.1. Distribuição da frequência de isolamento das diferentes espécies de <i>Candida</i> nos isolados recolhidos.....	19
3.2. Prevalência de <i>C. africana</i> no conjunto de isolados identificados como <i>C. albicans</i>	24
3.3. Avaliação da suscetibilidade a antifúngicos	25
3.4. Procura de mutações de ganho de função no gene <i>CgPDR1</i>	29
4. Conclusão.....	30
Referências Bibliográficas	32
Anexos	39
A1. Distribuição dos produtos a partir dos quais se obtiveram os isolados em estudo	39
A2. Distribuição detalhada dos produtos a partir dos quais se isolaram as quatro principais espécies <i>Candida</i>	40
A3. Distribuição detalhada das espécies recolhidas por Hospital/Posto de Recolha.....	41
A4. Valor de MIC obtidos por método EUCAST nos isolados deste estudo – Anfotericina B	

A5. Valor de MIC obtidos por método EUCAST nos isolados deste estudo – Fluconazol	43
A6. Valor de MIC obtidos por método EUCAST nos isolados deste estudo – Voriconazol ..	44
A7. Tabela detalhada dos resultados dos testes de avaliação de Suscetibilidade a antifúngicos para <i>C. albicans</i>	45
A8. Tabela detalhada dos resultados dos testes de avaliação de Suscetibilidade a antifúngicos para <i>C. glabrata</i>	58
A9. Gráficos de Distribuição de MIC's provenientes da base de dados EUCAST.	63

Índice de Figuras

Figura 1 – Frequência das espécies de <i>Candida</i> isoladas a partir da totalidade de amostras consideradas.....	20
Figura 2 – Frequência (%) das espécies de leveduras isoladas a partir de amostras provenientes de produtos estéreis/não estéreis.....	21
Figura 3 – Frequência (%) das espécies de leveduras isoladas a partir da de amostras provenientes produtos de estéreis.....	22
Figura 4 – Frequência (%) das espécies de leveduras isoladas a partir da de amostras provenientes produtos de não estéreis.....	22
Figura 5 – Frequência (%) das espécies de leveduras isoladas nos diferentes hospitais.....	23
Figura 6 – Distribuição de MIC's para Anfotericina B segundo os testes de suscetibilidade efetuados.....	25
Figura 7 – Distribuição de MIC's para Fluconazol segundo os testes de suscetibilidade efetuados.....	26
Figura 8 – Distribuição de MIC's de Voriconazol segundo os testes de suscetibilidade efetuados.....	26
Figura 9 – Resultados obtidos no <i>profiling</i> fenotípico de alguns isolados (voriconazol).....	28
Figura 10 – Resultados obtidos no <i>profiling</i> fenotípico de alguns isolados (fluconazol).....	28

Figura 11 – Alinhamento da sequência de CgPDR1 obtida a partir do isolado 218 com a sequência da estirpe de referência CBS138.....29

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Mistura de reação de amplificação do gene CgPdr1.....17

Tabela 2 – Condições definidas no termociclador para amplificação do DNA de levedura...18

Tabela 3 – Sequência nucleotídica dos primers usados.....18

Tabela 4 – Frequência das diferentes espécies no total de isolados recolhidos.....19

Tabela 5 – Alteração da sequência de aminoácidos do fator de transcrição CgPdr1 codificados pelo isolado 218 quando comparado com a estirpe de referência CBS138.....30

1. Corpo do Trabalho

1.1. Introdução

O género *Candida* constitui a causa mais comum de infeções fúngicas no ser humano¹. Este fungo faz parte da microbiota do organismo humano, podendo ser encontrado na pele e nas mucosas (p.e. exsudado vaginal, mucosa oral e trato gastro-intestinal)²⁻⁵.

Durante as últimas décadas as candidoses (nome comum dado às infeções causadas por espécies do género *Candida*) e candidemias, presença destas leveduras no sangue, têm aumentado a sua prevalência ao redor do Mundo, inclusive em Portugal⁶. Este aumento é um problema de saúde pública crítico, pelas elevadas taxas de morbidade e letalidade associadas, especialmente quando as infeções são causadas por espécies de *Candida* não-*albicans*^{7,8,9}. O aumento da prevalência de infeções causadas por *Candida* relaciona-se com aumento do uso generalizado de dispositivos médicos intra-vasculares, da utilização de antibióticos e principalmente com o aumento do número de doentes imunocomprometidos, tais como, os sujeitos a quimioterapia, os transplantados e os indivíduos portadores de Vírus da Imunodeficiência Humana¹⁰⁻¹². A redução da atividade do sistema imune tem também sido apontada como uma das causas que explica como é que colonização de populações comensais de *C. albicans* e *C. glabrata* pode progredir para infeções superficiais e, nos casos mais graves, para infeções sistémicas^{11; 13}.

A nível mundial, a prevalência de *C. albicans* continua a ser a mais alta de todas as espécies do género *Candida*, no entanto, ao longo dos anos a predominância desta espécie como agente etiológico no desenvolvimento, quer de infeções invasivas, quer de infeções superficiais, tem vindo a diminuir, denotando-se um aumento significativo das espécies não-*albicans*^{11, 15-17}. Dentro destas espécies *Candida* não-*albicans*, apesar de se observarem variações ao longo dos anos e nas diferentes regiões do Mundo, frequentemente *C. glabrata* é o segundo agente mais relevante, seguida de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*^{11, 15-18}. Especificamente, na Europa, América do Norte, América Latina e Ásia Pacífico, observa-se que *C. albicans* é a espécie mais isolada, sendo a sua prevalência inferior a 50 % do total de isolados analisados (com exceção da Europa onde se observam prevalências superiores)¹⁵. A prevalência de *C. glabrata* tem aumentado, sendo a primeira espécie *Candida* não-*albicans* na Europa, na América do Norte e na região Ásia Pacífico, sendo ultrapassada por *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, na América Latina¹⁵ e por *C. parapsilosis* na Austrália²⁰.

Recentemente, tem sido descrito o aparecimento de *C. africana*, uma subespécie de *C. albicans*, que ao longo dos anos têm vindo a ser confundida e mal identificada como *C.*

*albicans*³⁷. Esta subespécie foi detetada pela primeira vez em 1995 em África no trato genital feminino sendo este até hoje o local onde esta levedura foi maioritariamente isolada³⁷⁻⁴⁰, havendo apenas um reporte de isolamento numa hemocultura no Chile⁴¹. Para além de ser isolado no continente africano, existem relatos de isolados clínicos de *C. africana* na Alemanha³⁸, na Itália³⁹, no Chile⁴¹, na Arábia Saudita⁴², no Japão⁴³ e no Reino Unido⁴⁴. Em Portugal a prevalência desta levedura ainda não foi relatada. *C. africana*, tal como *C. albicans*, apresenta formação de tubos germinativos em soro, no entanto, esta não apresenta crescimento de clamidósporos, e não tem a capacidade de assimilar açúcares como N-acetilglucosamina e glucosamina por ser do serótipo B³⁷.

Em Portugal *C. albicans* também é a espécie mais frequentemente identificada e a responsável pelo maior número de candidoses^{4,6,8,20,22-27}. Em vários estudos epidemiológicos realizados em diferentes estabelecimentos de saúde do país, *C. albicans* e *C. glabrata* são consideradas responsáveis por 40 % e 10 %, respetivamente, dos casos de candidemia,^{20; 22}. No Hospital de S. João, no Porto, foi desenvolvido um estudo epidemiológico onde se observou que *C. glabrata* era apenas a quarta espécie de *Candida* mais recuperada dos isolados recolhidos de doentes com candidemia, sendo antecedida por *C. parapsilosis* e por *C. tropicalis*⁶. Noutro estudo desenvolvido com isolados recolhidos a partir do Hospital de S. Marcos, em Braga, e, noutro estabelecimento de saúde também localizado em Braga, a prevalência de *C. glabrata* foi também baixa uma vez que apenas representou 4 % dos casos de candidemia, aparecendo depois de *C. tropicalis* (5,6 %) ²⁴. Apesar das variações, é claro o aumento da prevalência de infeções causadas por espécies *Candida* não-*albicans* em Portugal^{11, 15-18}.

O aumento na prevalência de espécies não-*albicans* tem sido acompanhado por um aumento no isolamento de estirpes resistentes a antifúngicos, em particular ao fluconazol, o fármaco de primeira linha utilizado tanto em profilaxia como no tratamento ativo da candidose^{15, 28-31}. O mesmo tipo de observação tem sido feita nos estudos conduzidos à escala Mundial^{15,18,22}. Ao passo que a resistência a fluconazol entre os isolados de *C. albicans* é relativamente incomum em todas as regiões analisadas, no caso de *C. glabrata* observou-se uma elevada resistência em todas essas regiões, com exceção da América Latina onde a espécie que se verificou ser mais resistente foi *C. parapsilosis*^{15,18,22}. Excetuando *C. glabrata*, a resistência observada ao voriconazol nas 4 regiões analisadas foi igualmente baixa¹⁸. De entre as espécies de *Candida* que apresentaram uma baixa sensibilidade ao fluconazol, mais de 80 % apresentou suscetibilidade ao voriconazol, no entanto, o oposto não se verifica uma vez que todas as amostras resistentes ao voriconazol também o eram para o fluconazol^{16, 32}.

Portugal apresenta-se como um dos países nos quais a suscetibilidade ao fluconazol e ao voriconazol são das mais elevadas para *C. glabrata*^{15,16}.

No que concerne estudos epidemiológicos anteriormente desenvolvidos em Portugal^{6,7;23;33} os resultados mostram que a prevalência de resistência a anfotericina B é muito baixa, com registo de apenas 3 isolados que resistentes, dois dos quais *C. glabrata* e um *C. krusei*⁷. Mais recentemente, observaram-se percentagens de resistência de *C. glabrata* ao fluconazol na ordem de 6,9 %¹⁸, confirmando os resultados obtidos em estudos anteriores²². Segundo um estudo realizado por Pfaller, a variação de suscetibilidade ao fluconazol dependeu do local de onde se recolhiam os isolados com os isolados obtidos a partir do trato genital revelaram-se menos suscetíveis comparativamente a isolados provenientes do sangue e de outros produtos estéreis onde se denotou maior sensibilidade¹⁶. A maior parte dos estudos realizados até agora (e isso também é verdade nos estudos conduzidos em Portugal) não se tem concentrado nesta população comensal de isolados, deixando por isso por caracterizar quais os níveis de prevalência de resistência subjacentes a essas populações.

Uma das características das espécies *Candida* não-*albicans* é a elevada resistência a antifúngicos, especialmente ao azóis²⁹⁻³¹, o que tem sido apontado como uma causa para o aumento de prevalência observado. Dentro das espécies não-*albicans* *C. glabrata* é aquela parece apresentar maiores níveis de tolerância¹⁵, sendo esta característica atribuível à notável plasticidade do genoma desta espécie que facilita o desenvolvimento rápido de respostas adaptativas³⁴. Entre os mecanismos pelos quais os isolados de *C. glabrata* desenvolvem resistência a azóis, a aquisição de mutações de ganho de funções na região codificante do regulador transcricional *CgPDR1*, o principal controlador da resposta a fármacos em leveduras patogénicas, tem sido o mais descrito³⁵. Estas mutações levam a que a proteína CgPdr1 esteja constitutivamente ativa, mesmo quando as células não se encontram na presença de fármacos. Entre outras respostas, estes isolados que expressam alelos ganho-de-função de CgPdr1, apresentam uma elevada expressão do gene *CgCDR1*, que codifica um transportador de múltiplos fármacos da superfamília ABC (ATP-binding cassette) que se pensa ser responsável pela diminuição intracelular dos azóis em *C. glabrata*³⁶.

1.2. Objetivo

Até aos dias de hoje grande parte dos estudos epidemiológicos efetuados em Portugal, centralizados nas espécies *Candida*, têm focado a sua análise em isolados recolhidos de produtos estéreis de doentes com candidemia dando pouca importância aos isolados

recolhidos de produtos não estéreis onde estas leveduras habitam como comensais. Tendo em conta este aspeto este trabalho experimental focou-se num conjunto de isolados comensais maioritariamente recolhidos de produtos não estéreis identificados como pertencente ao género *Candida* e que foram recolhidos num conjunto de hospitais da zona da grande Lisboa (totalizando 1060 isolados). O trabalho dividiu-se essencialmente em 3 etapas, tendo-se realizado uma análise relativa à etiologia das diferentes espécies de *Candida* partindo dos isolados recolhidos, uma análise de resistência a antifúngicos entre as populações comensais por ser reconhecido o potencial que estas populações podem ter no desenvolvimento de infeções invasivas e ainda uma análise aos isolados de *C. albicans* na tentativa de detetar *C. africana* uma vez que esta é uma levedura fracamente estudada em Portugal.

2. Materiais e Métodos

2.1. Estirpes e meios de cultura

Neste trabalho foi usado um conjunto de 1060 isolados recolhidos em diferentes hospitais e postos de recolha na zona da Grande Lisboa, entre outubro de 2018 e abril de 2019. Além destes isolados foram usadas as estirpes de referência *C. albicans* SC5314 e *C. glabrata* CBS138. Dos isolados recolhidos foram avaliados no que concerne aos perfis de suscetibilidade a antifúngicos: *C. albicans* (n=417) e *C. glabrata* (n=137). Os isolados e as estirpes de referência, após repicagem, foram criopreservados a -80°C em meio YPD suplementado com glicerol.

O crescimento dos isolados e das estirpes de referência foi feito a uma temperatura de 30°C, com uma agitação orbital de 200 rpm, em meio YPD (Yeast Peptone Dextrose) líquido que contém 20 g/L de glucose (Merck), 20 g/L de peptona bacteriológica (Difco), 10 g/L de extrato de levedura (Difco). Este meio foi submetido a autoclavagem (121°C, 15 minutos e 1 atm).

Nos ensaios de suscetibilidade dos isolados aos antifúngicos foi usado o meio RPMI 2x concentrado que contém 36 g/L de glucose (Merck), 0,3 g/L - glutamina (Merck), 69.06 g/L de MOPS (Ácido 3 – (N – morfolino) propanesulfónico, SERVA) e, 20.8 g/L de meio RPMI - 1640 sintético (Sigma). Componentes do meio RPMI – 1640 encontram-se discriminados em EUCAST E. Dis 7.1 ⁴⁶. O meio RPMI 2x concentrado foi filtrado através de um filtro com tamanho de poro de 0.22 µm e conservado a 4°C até uso posterior.

No que diz respeito à identificação de *C. africana* foi utilizado o meio MMB (minimum medium broth) que contém 5 g/L de N-acetilglucosamina (Sigma), 1,7 g/L de YNB (Difco) e 2,67 g/L de NH₄.sulfato (Merck). O meio MMB utilizado como meio de crescimento das placas controlo da identificação de *C. africana* é composto por 20 g/L de glucose (Merck), ,7 g/L de YNB (Difco) e 2,67 g/L de NH₄.sulfato (Merck). Os meios foram submetidos a autoclavagem (121°C, 15 minutos e 1 atm), exceto a N-acetilglucosamina que foi adicionada posteriormente usando uma solução stock devidamente filtrada com um filtro de 0.22 µm.

2.2. Soluções de Antifúngicos

As soluções stock de antifúngicos foram preparadas a partir de antifúngicos em pó e usando o DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma) como solvente. Os antifúngicos testados foram

anfotericina B (Sigma), fluconazol (Sigma), e voriconazol (Pfizer). Após preparação foram armazenados a -20°C.

Foram preparadas as seguintes soluções stock de antifúngicos: solução 1 - anfotericina B de 1,6 g/L, solução 2 – fluconazol de 12,8 g/L, e, a solução 3 – voriconazol de 0,8 g/L.

2.3. Determinação da suscetibilidade a antifúngicos de isolados de *C. glabrata* em microplacas de 96 poços

Para o estudo da suscetibilidade dos isolados correspondentes a *C. glabrata* usou-se o método de microdiluição recomendado pela EUCAST para a determinação do valor de MIC⁴⁶. Resumidamente, as 10 primeiras colunas da microplaca de 96 poços contêm 100 µl RPMI 2x concentrado com concentrações sucessivas decrescentes de antifúngico, a 11ª coluna contêm 100 µl RPMI 2x concentrado sem antifúngico, sendo esta a coluna utilizada como controlo e, a última coluna 100 µl RPMI 2x concentrado sem antifúngico e no final não será inoculado com isolado ou estirpe de referência, sendo assim o branco. Com este *setup* experimental para *C. glabrata* o intervalo de concentração de anfotericina B nas diferentes colunas foi de 8 mg/L a 0,015 mg/L. No que concerne aos azóis, o intervalo de concentração de fluconazol foi de 64 mg/L a 0,12 mg/L e o de voriconazol 4 mg/L a 0,008 mg/L. Para obter a suspensão celular a inocular nas placas contendo os diferentes antifúngicos os isolados foram cultivados durante cerca de 17h em meio YPD a 30°C e com uma agitação orbital de 200 rpm, em tubos de 5 mL. Dilui-se a suspensão celular em H₂O desionizada de maneira a obter uma D.O._{530nm} 0.0125 (valor de referência recomendado pela EUCAST para o teste de suscetibilidade a antifúngicos em isolados de *Candida*) após adição de 100µl na placa de 96 poços previamente construída, Após inoculação as placas de 96 poços contendo os antifúngicos foram incubadas a 37°C, sem agitação, durante 24 horas, de acordo com a metodologia recomendada pela EUCAST⁴⁶ Ao fim de 24h as células foram ressuspendidas e a D.O._{530nm} lida num leitor de microplacas. Os isolados que apresentaram um controlo anormal, ou seja, com valores de D.O. inferiores a 1,5, não foram considerados para posterior classificação quanto à suscetibilidade aos antifúngicos em avaliação neste trabalho. O valor MIC definido para cada isolado foi identificado nos poços onde a D.O._{530nm} lida foi superior a 50 % da D.O. no poço controlo.

2.4. Crescimento *C. albicans* em microplacas de 96 poços

Para o estudo da suscetibilidade dos isolados correspondentes a *C. albicans* usou-se um ensaio de crescimento em microplacas de 96 poços onde apenas se avaliou a capacidade dos isolados crescerem ou não na presença duma concentração de antifúngico igual à definida pela EUCAST como “resistance breakpoint”. Para tal, em RPMI 2x concentrado foi adicionado do stock de antifúngicos 2x a concentração de *breakpoint* de cada antifúngico (anfotericina B = 1 mg/L, fluconazol = 4 mg/L, voriconazol = 0,125 mg/L), e 100 µL foram pipetados para cada um dos 96 poços, aos quais se adicionou posteriormente 80 µL água desionizada estéril. A estes 180 µL (80 água + 100 RPMI 2x concentrado + antifúngico) foram adicionados 20 µL da suspensão celular preparada no dia anterior. Além das placas contendo os antifúngicos foi também inoculada uma placa contendo apenas meio RPMI 2x concentrado sem adição de antifúngico mais 80 µL de água desionizada estéril para controlo do crescimento das estirpes. A suspensão celular foi cultivada em microplacas de 96 poços durante cerca de 17h em meio YPD a 30°C e com uma agitação orbital de 200 rpm. 15 dos 96 poços permanecessem em branco (funcionando como controlos negativos) e os restantes 81 poços funcionassem como *poços úteis* ocupados cada um deles com um isolado diferente. No dia seguinte retiraram-se 20 µL da suspensão de células obtida para uma nova placa de 96 poços, aos quais se juntaram 180 µL de água desionizada estéril. Desta última, foram usados 20 µL de suspensão celular de forma a poder inocular as placas contendo antifúngicos com uma D.O._{530nm} final de ~0.0125, o valor de referência recomendado pela EUCAST ⁴⁶ para o teste de suscetibilidade a antifúngicos em isolados de *Candida*.

Após inoculação as placas de 96 poços contendo os antifúngicos foram incubadas a 37°C, sem agitação, durante 24 horas, de acordo com a metodologia recomendada pela EUCAST ⁴⁶. Ao fim de 24h as células foram ressuspensas e a D.O._{530nm} lida num leitor de microplacas. Os isolados que apresentaram um controlo anormal, ou seja, com valores de D.O. inferiores a 1,5, não foram considerados para posterior classificação quanto à suscetibilidade aos antifúngicos em avaliação neste trabalho.

No caso do aparecimento do *C. albicans* resistente, utiliza-se o método tradicional EUCAST que foi descrito no ponto 2.3.1., adaptando os intervalos de concentração para a espécie, sendo que o de anfotericina B de 8 mg/L a 0,015 mg/L, o de fluconazol foi de 16 mg/L a 0,03 mg/L e o de voriconazol 0,5 mg/L a 0,001 mg/L.

2.5. Amplificação e sequenciação do gene *CgPDRI*

A sequenciação do gene *CgPDRI* foi realizada na existência de resistência aos antifúngicos em isolado de *C. glabrata*, sendo a sequência obtida e comparada com a estirpe de referência CBS138. Para realizar a sequenciação foi necessário obter o DNA genómico do isolado em questão. Assim sendo, adicionou-se uma pequena quantidade de biomassa do isolado resistente num tubo com 100 µL de *glass beads* com 0.5 mm e 200 µL de buffer de lise (Tris 50 mM, EDTA 50 mM, NaCl 250 mM, SDS 0.3 %). O tubo foi ao vortéx durante 2 min a velocidade máxima e incubado a 65°C durante 1 hora. De seguida, colocou-se o tubo em gelo durante 2 minutos. A suspensão de células lisadas foi centrifugada a 13000 rpm durante 15 min a 4°C. Após a centrifugação guardou-se o sobrenadante ao qual foram adicionados 20 µL de NaAC 3 M (pH 4.8) mais 400 µL de etanol frio para induzir a precipitação do DNA, sendo a amostra colocada a -20 °C durante pelo menos 30 minutos. Posteriormente voltou-se a centrifugar a 13000 rpm, durante 20 min a 4 °C. O *pellet* obtido foi então lavado com 500 µL de etanol 70 % e centrifugou-se de novo a 13000 rpm durante 8 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* seco em speed vacuum. O DNA foi ressuspensionado a 30 µL de água desionizada. O DNA genómico foi então utilizado como *template* para amplificar o gene *CgPDRI*, por PCR. Na tabela 1 encontra-se a mistura de reação de amplificação do gene e na tabela 2 encontram-se as condições definidas no termociclador. Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 3. A sequenciação foi posteriormente realizada pela STABVIDA, por serviço pago, recorrendo ao método de Sanger.

Tabela 1 – Mistura de reação de amplificação do gene *CgPDRI*.

Componente	Volume por amostra
HF buffer	5 µl
dNTP's	0,5 µl
<i>CgPDRI</i> Fw	0,5 µl
<i>CgPDRI</i> Rev	0,5 µl
Template DNA	1 µl
Mg ²⁺	0,9 µl
DMSO	0,5 µl
Phusion	0,1 µl
ddH ₂ O	16 µl

Tabela 2 – Condições definidas no termociclador para amplificação do DNA de levedura.

Tempo	Temperatura	
30 sec	98 °C	
10 sec	98 °C	X 30
20 s	54 °C	
1 min 30 s	72 °C	
7 min	72 °C	
∞	4 °C	

Tabela 3 – Sequência nucleotídica dos primers usados.

Primer	Sequência 5' 3'
CgPdr1 Rev	GAC AGT GTG CAT AGC CTG
CgPdr1 Fw	CTT CCA TTA CTT CGT ACC C

2.6. Identificação de *C. africana* de entre o conjunto de isolados de *C. albicans* disponíveis

Para a identificação de *C. africana* no conjunto de isolados descritos como *C. albicans* usou-se um ensaio de crescimento em microplacas de 96 poços. Para tal usou-se um *setup* semelhante ao usado no teste de antifúngicos para *C. albicans*. Na preparação do teste, a cada poço foi adicionado 100 µL de MMB (minimum medium broth), em que se substituiu a fonte de carbono de glucose por N-acetilglucosamina³⁷, 80 µL de água e 20 µL da suspensão celular. Para obter a suspensão celular a inocular nas placas contendo o meio MMB alterado os isolados foram cultivados durante cerca de 17h em meio YPD a 30°C e com uma agitação orbital de 200 rpm, em microplacas de 96 poços. No dia seguinte retiraram-se 20 µL da suspensão de células obtida para uma nova placa de 96 poços, aos quais se juntaram 180 µL de água desionizada estéril. Desta última, foram usados 20 µL de suspensão celular de forma a poder inocular as placas contendo antifúngicos com uma D.O._{530nm} de 0.0125. Posteriormente à adição da suspensão, as microplacas de 96 poços foram mantidas a 30°C e com uma agitação orbital de 200 rpm. Ao fim de 24h as células foram ressuspensas e a D.O._{530nm} lida num leitor de microplacas. Além das placas contendo MMB alterado foi também inoculada uma placa contendo MMB normal para controlo do crescimento das estirpes.

3. Resultados e Discussão

3.1. Distribuição da frequência de isolamento das diferentes espécies de *Candida* nos isolados recolhidos

Neste estudo foram examinados 1060 isolados, provenientes de hospitais e centros hospitalares da zona de Lisboa recolhidas entre outubro de 2018 e abril de 2019. A primeira análise efetuada prendeu-se com a identificação das espécies mais frequentemente isoladas estando os resultados sumarizados na Tabela 4 e analisados por frequência de espécies de *Candida* isoladas a partir da totalidade de amostras na Figura 1. A identificação dos diferentes isolados foi feita com base em informações fornecidas pelos diferentes hospitais sendo que em todos se recorreu ao método de MALDI-TOF.

Tabela 4 – Frequência das diferentes espécies no total de isolados recolhidos.

Espécies de leveduras	Nº de isolados recolhidos
<i>C. albicans</i>	764
<i>C. glabrata</i>	141
<i>C. parapsilosis</i>	52
<i>C. tropicalis</i>	37
<i>C. krusei</i>	12
<i>C. lusitaniae</i>	9
<i>C. kefyr</i>	6
<i>C. rugosa</i>	3
<i>C. dubliniensis</i>	2
<i>C. famata</i>	1
<i>C. guilliermondii</i>	1
<i>C. nivariensis</i>	1
<i>C. thermophila</i>	1
<i>S. cerevisiae</i>	16
<i>C. neoformans</i>	1
<i>Saprochaete clavata</i>	1
<i>Trichosporon asteroides</i>	1
Não Identificadas	11

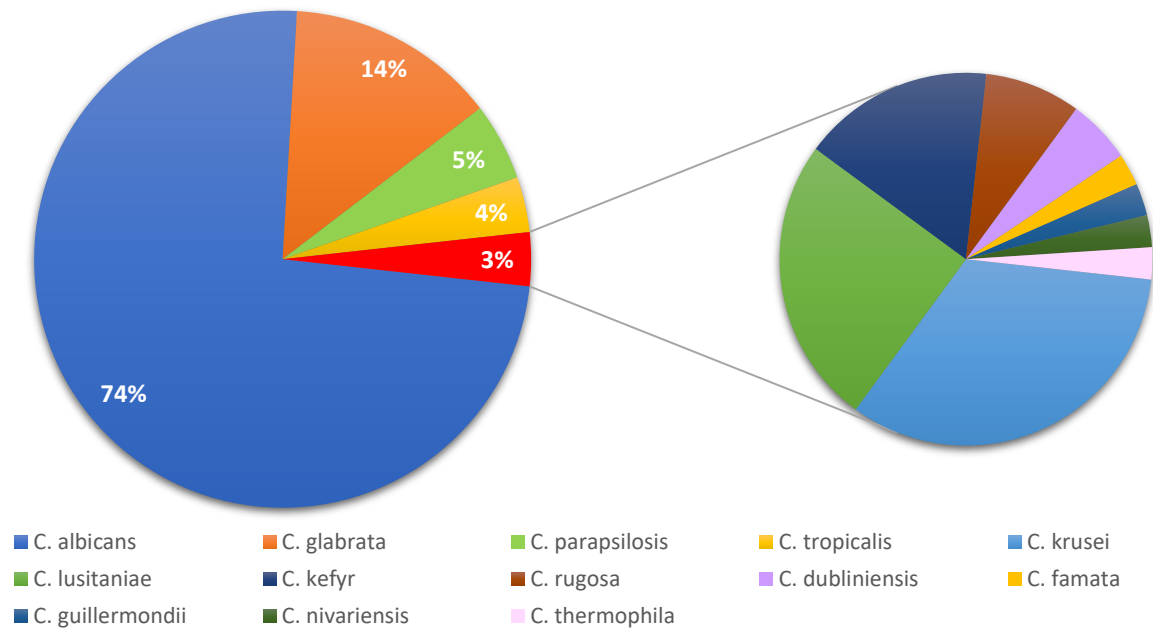


Figura 1 – Frequência das espécies de *Candida* isoladas a partir da totalidade de amostras consideradas.

De entre o conjunto de isolados recolhidos, identificaram-se 13 espécies de *Candida* diferentes, no entanto, dos 1060 isolados, 19 foram identificados como espécie não pertencentes ao género *Candida*, nomeadamente *C. neoformans* (n=1), *Saprochaete clavata* (n=1), *Trichosporon asteroides* (n=1) e, mais frequentemente, *Saccharomyces cerevisiae* (n=16). *S. cerevisiae* foi isolado a partir de produtos não estéreis como exsudados vaginais e fezes, apesar de não ser uma espécie que seja habitualmente associada à colonização no Homem, têm sido reportados casos de infeção fúngica causados por esta levedura⁴⁷⁻⁵¹.

Observa-se que a prevalência das espécies de *Candida* isoladas a partir da totalidade das amostras consideradas se encontra de acordo com o que tem vindo a ser descrito noutros estudos reportando uma elevada prevalência no isolamento de *C. albicans* (74 %), o que é concordante também com os estudos epidemiológicos realizados em Portugal^{4,6,8,20,22-27}. As espécies *C. glabrata* (14 %), *C. parapsilosis* (5 %) e *C. tropicalis* (4 %) apresentam uma distribuição coincidente com aquela que tem sido descrita para a frequência de isolamento de espécies *Candida* não-*albicans* em estudos anteriores^{11, 15-18,51}. No que toca às espécies de *Candida* menos frequentemente isoladas, cuja distribuição correspondeu a 3 % da totalidade, é de realçar que *C. krusei* apresenta-se sistematicamente como quarta espécie *Candida* não-*albicans*, esta é uma espécie que é habitualmente identificada neste género de estudos e que é preocupante pelo seu alto nível de patogenicidade e elevada resistência a antifúngicos^{15-18,22}.

Tanto *C. lusitaniae* como *C. kefyr* foram maioritariamente isoladas a partir de exsudados vaginais, no entanto, tal como *S. cerevisiae*, estas leveduras não são habitualmente associadas à colonização do Homem, apesar de também terem sido identificadas noutros estudos como causadoras de candidemias^{20,22,51,52}. Consistente com as baixas frequências de isolamento descritas noutros estudos^{22,51,52}, também aqui se observou uma baixa frequência no isolamento de *C. thermophila*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. nivariensis* e *C. dubliniensis*.

Todas estas leveduras referidas como menos frequentes revelam algum índice de patogenicidade em vários estudos, bem como capacidade de desenvolver resistência a azóis^{18,52,53,55} mas também à anfotericina B como é caso de *C. lusitaniae*^{53,62} e de *C. rugosa*^{53,56}, sendo portanto relevante estudar de futuro estudar mais aprofundadamente estes isolados.

Dos 1030 isolados de espécies do género *Candida*, 42 são provenientes de produtos estéreis (como sangue ou líquido ascítico) e 989 de produtos não estéreis, no Anexo 1 encontra-se também a distribuição dos produtos a partir dos quais se obtiveram os isolados em estudo. Como se pode observar na Figura 1, em termos da distribuição por espécies verifica-se que *C. albicans* ocupa o primeiro lugar de espécie mais isolada, com uma prevalência de cerca de 74 % em ambas os tipos de amostras. Em relação aos produtos não estéreis *C. glabrata* (14 %) é a segunda espécie *Candida* mais prevalente, seguida de *C. parapsilosis* (5 %) e *C. tropicalis* (4 %). O mesmo não se observa nos produtos estéreis onde *C. parapsilosis* (12 %) ultrapassa a prevalência de *C. glabrata* (10 %) e *C. tropicalis* (2 %).

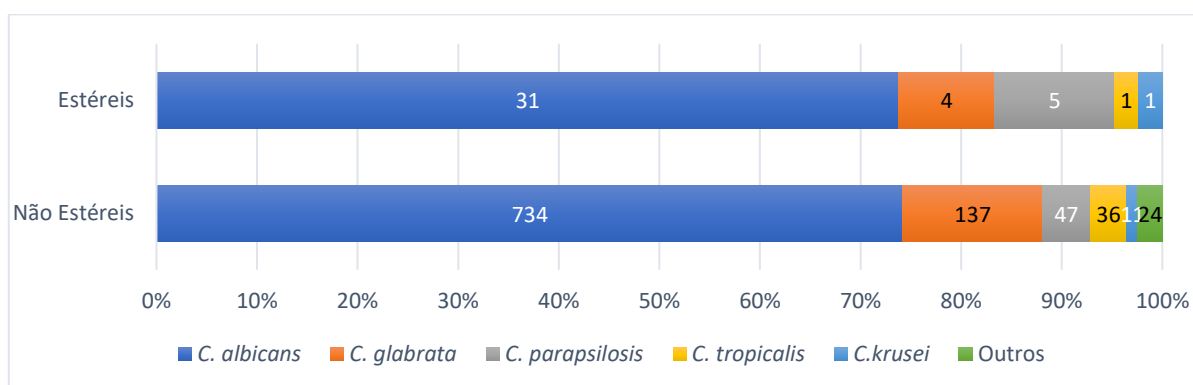


Figura 2 – Frequência (%) das espécies de leveduras isoladas a partir de amostras provenientes de produtos estéreis/não estéreis.

As Figuras 3 e 4 apresentam a distribuição da prevalência por espécie nos diferentes tipos de amostras analisados, estéreis (Figura 3) ou não estéreis (Figura 4).

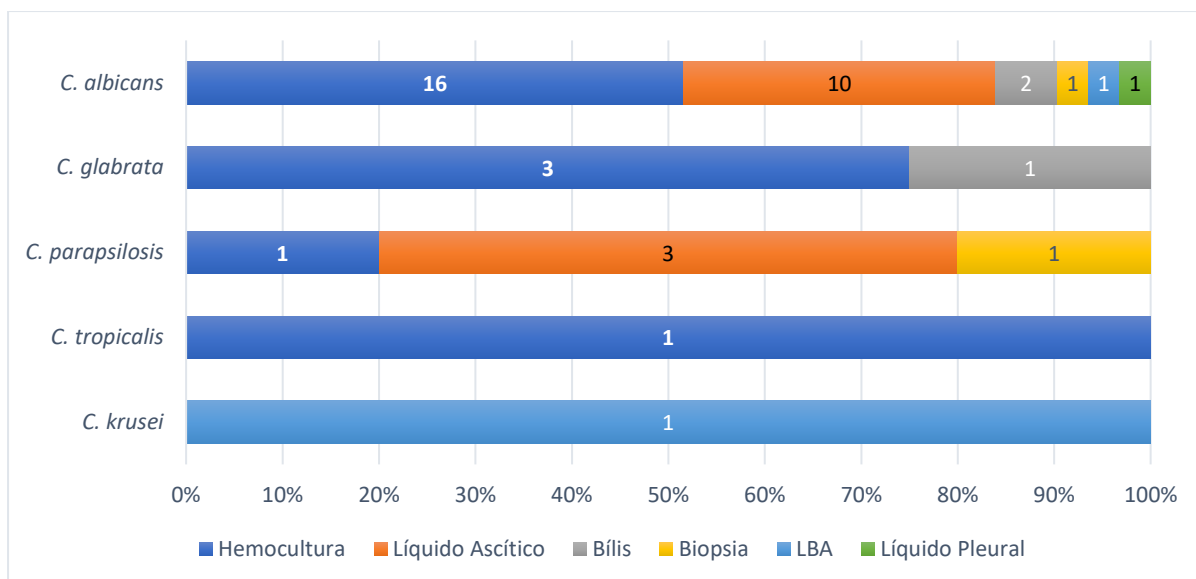


Figura 3 – Frequência (%) das espécies de leveduras isoladas a partir da de amostras provenientes produtos de estéreis.

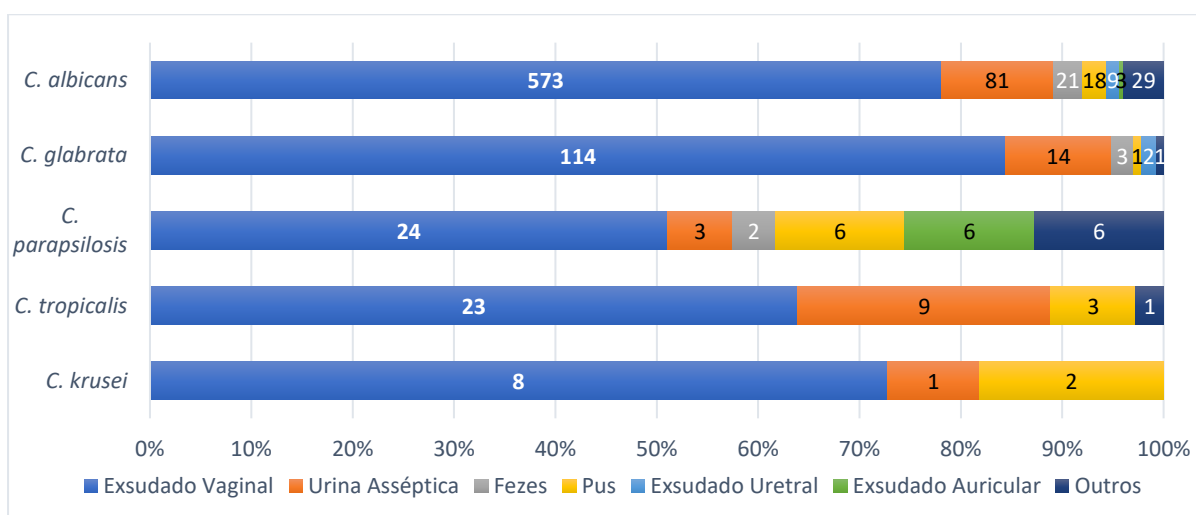


Figura 4 – Frequência (%) das espécies de leveduras isoladas a partir da de amostras provenientes produtos de não estéreis.

Os resultados obtidos mostram que os isolados de *C. albicans* foram principalmente recuperados a partir de amostras de exsudados vaginais, de urina assética, de fezes, de pus e de hemocultura. No caso de *C. glabrata* os principais locais de isolamento foram exsudados vaginais e urina assética, referindo ainda que no caso dos produtos estéreis foram recolhidos três isolados provenientes de hemoculturas. Um aspecto notável desta distribuição é o facto de ter sido possível recuperar *C. parapsilosis* de doze produtos diferentes, ao passo que no caso de *C. glabrata* obteve-se menor diversidade nos isolamentos conforme explorado no Anexo 2. Obteve-se uma elevada prevalência de isolamento de *C. tropicalis* em amostras de

urina asséptica, o que é consistente com o papel descrito para esta levedura na colonização do trato urinário ⁶³.

Tendo em conta a Figura 3 observa-se ainda que *C. albicans* constitui a espécie mais frequentemente isolada nos produtos estéreis, seguida de *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Esta distribuição é concordante com a distribuição que tem sido reportada nos estudos epidemiológicos feitos e que se concentraram essencialmente em amostras de sangue^{6,7,20,23}. No entanto, focando a análise nos isolados provenientes de hemocultura, é *C. glabrata* a primeira espécie *Candida* não-*albicans*.

Em seguida foi analisada a distribuição de espécies isoladas nos maiores centros hospitalares examinados e nos postos de recolha, sendo estes últimos avaliados como um todo, estando estes resultados apresentados no gráfico da Figura 5, nos quais se abordou a frequência das espécies. Para esta análise apenas foram consideradas as espécies de *Candida* mais associadas a infeções, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Sendo assim a recolha em cada um destes foi de 211 isolados no Hospital 1, 114 no Hospital 2, 99 no Hospital 3, 74 no Hospital 4, 66 no Hospital 5 e ainda 467 nos Postos de Recolha. Os dados recolhidos para esta análise encontram-se detalhados na tabela do Anexo 3.

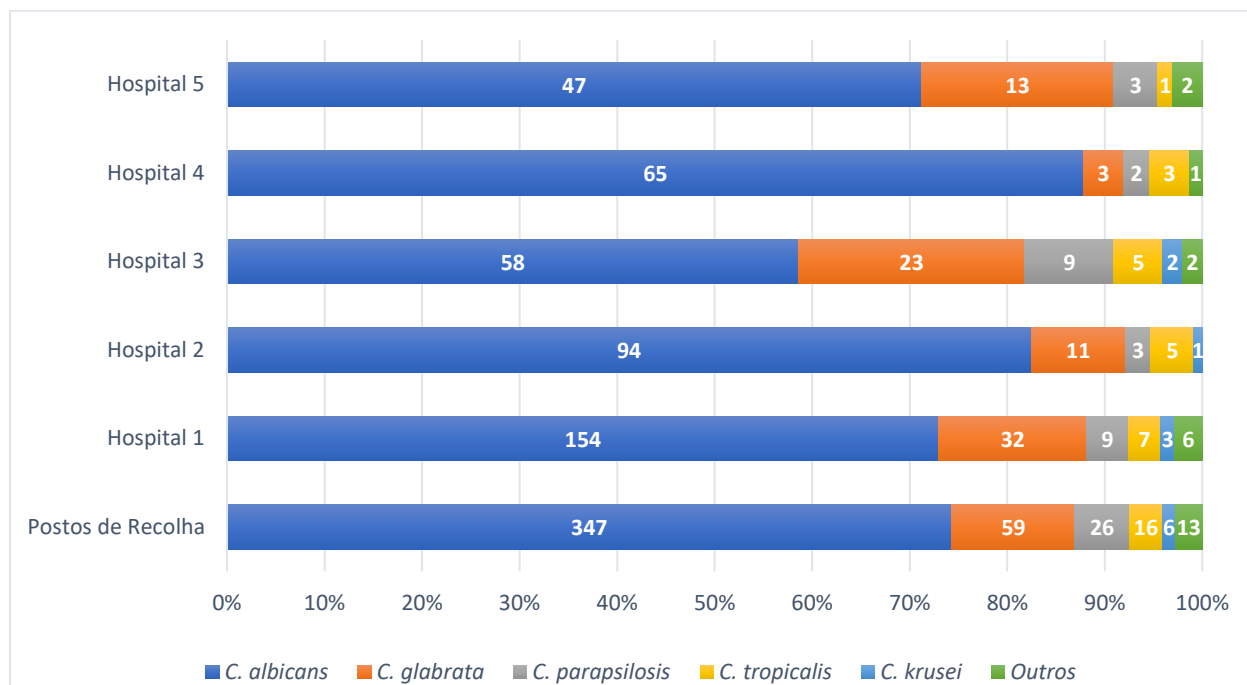


Figura 5 – Frequência (%) das espécies de leveduras isoladas nos diferentes hospitais.

A frequência de recolha de amostras de *C. albicans* corresponde a mais de 70 % em todos os hospitais, chegando aos 91 % no caso do hospital 2. O hospital 5 é uma exceção,

pois apresentou a frequência mais baixa, com *C. albicans* a corresponder apenas a 57 % dos isolados recolhidos. Apesar de variações a nível da frequência, *C. glabrata* foi a espécie *Candida* não-*albicans* mais isolada em todos os hospitais, sendo que no Hospital 4 correspondeu apenas 4 % das espécies isoladas, enquanto no Hospital 1 e 2 e nos Postos de Recolha apresentou uma prevalência de mais de 10 % e ainda no Hospital 3 e 5 correspondeu a mais de 20 %. Nos diferentes hospitais observam-se variações no isolamento de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, referindo-se os Hospitais 2 e 4 onde a distribuição de *C. tropicalis* foi superior à de *C. parapsilosis*. Nos hospitais onde se identificou *C. krusei* obteve-se o resultado esperado, ou seja, foi a quarta espécie *Candida* não-*albicans* mais prevalente. Relativamente às restantes espécies *Candida* não-*albicans*, todas elas apresentaram uma frequência relativamente baixa. É de referir ainda que em mais de metade dos hospitais (1, 2 e 3) se encontram as espécies de *Candida* com maior relevância no que se refere ao aumento da prevalência de espécies *Candida* não-*albicans* e que, a nível geral, é no Hospital 1, no Hospital 3 e nos Postos de Recolha que se observa a maior concordância com a distribuição total das espécies observada na Figura 1.

3.2. Prevalência de *C. africana* no conjunto de isolados identificados como *C. albicans*

A tentativa de identificação de isolados desta subespécie de *C. albicans* foi realizada para o conjunto de *C. albicans* recolhidas neste ensaio entre outubro de 2018 e abril de 2019, perfazendo um total de 764 amostras analisadas. Para tal, os isolados foram crescidos em meio MMB tendo N-acetilglucosamina como única fonte de carbono, uma vez que, *C. africana*, ao contrário de *C. albicans*, não apresenta crescimento na presença deste substrato³⁷. Os resultados obtidos na identificação dos isolados recolhidos entre outubro e abril, indicam a presença de vinte e duas estirpes *C. africana*, correspondendo a uma percentagem de 2,88 %, que a comparar com o estudo realizado no Reino Unido⁴⁴ (1,8 %) é ligeiramente mais alta. De entre as *C. africana* identificadas verificaram-se vinte provenientes de exsudados vaginais, o que é concordante com os estudos anteriormente realizados a nível desta levedura. No entanto, detetou-se um isolado de *C. africana* proveniente do trato gastrointestinal, nomeadamente fezes, e ainda um isolado proveniente de urina assética, neste último caso podendo corresponder na mesma a uma colonização vaginal caso o doente de onde o isolado foi recolhido fosse uma mulher.

3.3. Avaliação da suscetibilidade a antifúngicos

A avaliação da suscetibilidade a antifúngicos dos isolados concentrou-se apenas nos isolados das espécies *C. albicans* (n=417) e *C. glabrata* (n=137) e focalizando a resistência a anfotericina B, voriconazol e fluconazol. No caso dos isolados de *C. glabrata* foram efetivamente determinados os MIC de cada isolado e os isolados classificados em sensíveis ou resistentes conforme as determinações recomendadas pela EUCAST, sendo que a concentração de *breakpoint* de resistência para *C. glabrata* é 1 mg/L para anfotericina B, 4 mg/L para fluconazol e 2 mg/L para voriconazol. Para *C. albicans*, dado o elevado número de isolados envolvidos, apenas foi feito um *profiling* fenotípico genérico em que se avaliou a capacidade dos isolados crescerem na presença da concentração de *breakpoint* de resistência de cada antifúngico (anfotericina B = 1 mg/L, fluconazol = 4 mg/L, voriconazol = 0,125 mg/L). As figuras seguintes mostram a distribuição de MICs dos isolados sendo que os dados usados para a realização destes gráficos se encontram nos Anexos 4, 5 e 6, as barras brancas correspondem a isolados resistentes por serem concentrações superiores ao *breakpoint* de resistência. As informações acerca de cada isolado testado, seja de *C. albicans* como de *C. glabrata* encontram-se detalhadas nos Anexos 7 e 8

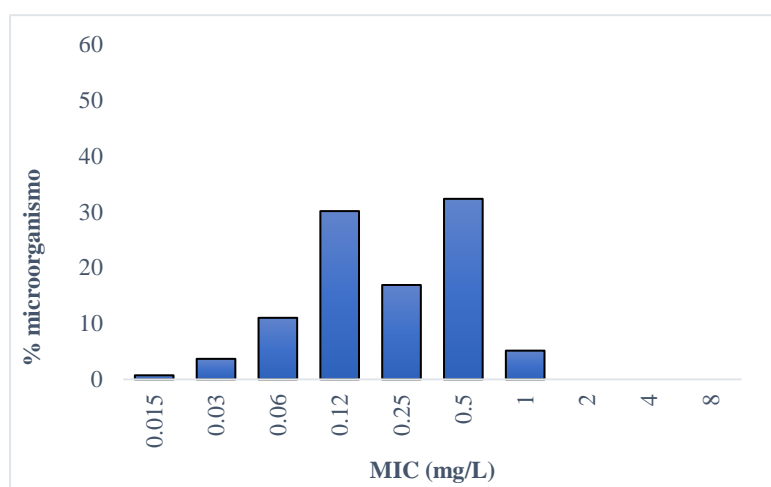


Figura 6 – Distribuição de MIC's para Anfotericina B segundo os testes de suscetibilidade efetuados.

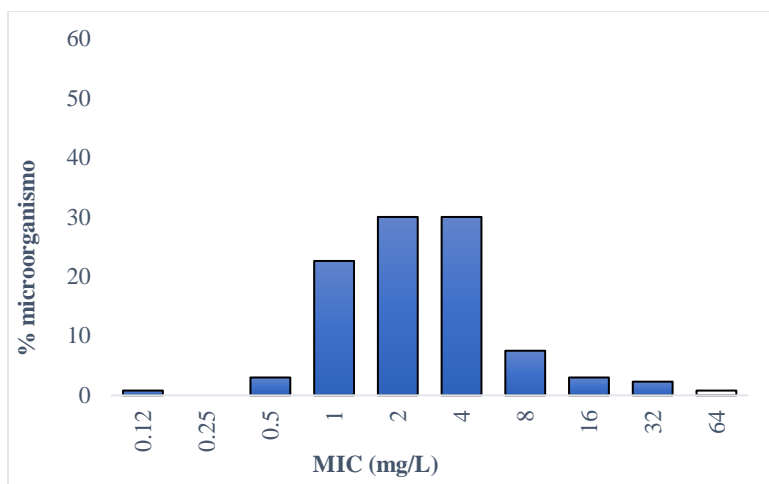


Figura 7 – Distribuição de MIC's para Fluconazol segundo os testes de suscetibilidade efetuados.

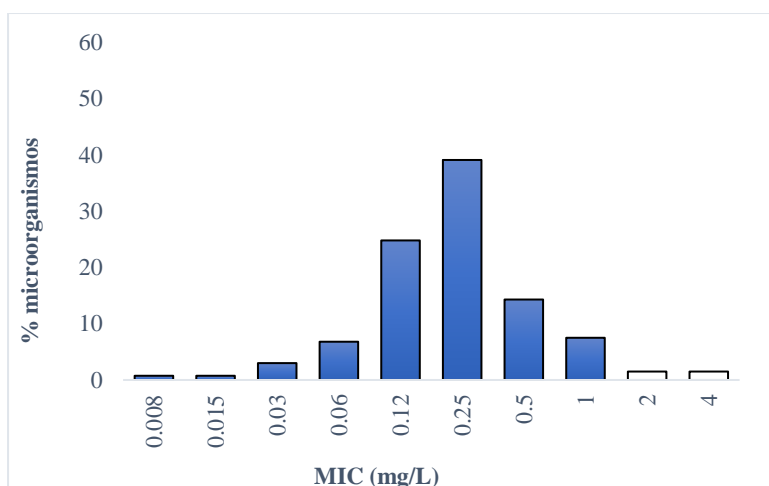


Figura 8 – Distribuição de MIC's de Voriconazol segundo os testes de suscetibilidade efetuados.

Pode observar-se, no Figura 6, que no caso da anfotericina B esta apresenta variações ligeiramente distintas daquelas relatadas pelas EUCAST, cujo gráfico publicado se encontra no Anexo 9 sendo o perfil normal dos isolados, pois enquanto nesta última se relata que maior parte dos isolados têm um valor MIC igual a 0,12 mg/L, neste estudo a maioria apresentou um valor MIC igual a 0,5 mg/L. Será preciso verificar com a análise de um número maior de isolados se esta característica é da população de isolados Portugueses da região de Lisboa, ou se se deve a algum tipo de enviesamento dos dados. No caso do fluconazol a distribuição MIC obtida neste estudo, que se demonstra na Figura 7, apresenta valores abaixo do comum, sendo que a maioria dos isolados apresentaram um valor MIC

distribuído igualmente por 2 mg/L e 4 mg/L, com 1 mg/L em terceiro, no entanto, o mesmo não se observa na base de dados da EUCAST, como se pode observar no Anexo 9, onde a maioria dos isolados se encontram distribuídos por 8 mg/L, 16 mg/L e 4 mg/L (ordem decrescente). Os dados obtidos para voriconazol, apresentados na Figura 8, quando comparados com os valores da EUCAST (cujo gráfico se encontra no Anexo 9), são também ligeiramente diferentes, pois na base de dados observa-se uma maioria de isolados com valor MIC igual a 0,12 mg/L, seguido de 0,25 mg/L, neste estudo o observado foi o inverso, com isolados com um valor MIC igual a 0,25 mg/L em primeiro lugar.

Após a avaliação dos testes de suscetibilidade obteve-se um isolado (218) o qual foi considerado resistente a fluconazol por apresentar um MIC de 64 mg/L, acima do *breakpoint* de referência que são 32 mg/L. Este mesmo isolado, proveniente de um exsudado vaginal, apresentou resistência cruzada por se revelar também resistente a voriconazol. No entanto, no caso do voriconazol obtiveram-se mais 3 isolados resistentes (31, 457, 458), sendo que um foi isolado a partir de exsudado faríngeo e os outros dois de exsudados vaginais. Este resultado de aparente resistência apenas a voriconazol e não a fluconazol é incomum uma vez que se observa que a maioria dos isolados são resistentes aos 2 azóis ou apenas a fluconazol. Será preciso reavaliar novamente os MICs destes isolados a fluconazol para melhor confirmar os dados e, caso se confirme a resistência exclusiva a voriconazol, serão precisos estudos aprofundados para elucidar qual será o mecanismo de resistência subjacente.

No caso de *C. albicans*, nas Figuras 9 e 10 mostra-se um exemplo dos resultados obtidos no *profiling* fenotípico efetuado de onde foi possível recuperar apenas 1 isolado com capacidade de crescimento na concentração de *breakpoint* de resistência de voriconazol e fluconazol, respetivamente. Este isolado de *C. albicans* foi isolado a partir de uma amostra de fezes. No sentido de confirmar a possível resistência deste isolado, realizou-se o método tradicional EUCAST, determinando-se a concentração MIC. Os resultados obtidos foram 0,5 mg/L para voriconazol e 16 mg/L para fluconazol, ambas acima do *breakpoint* de referência definido pela EUCAST (0,125 mg/L para voriconazol e 4 mg/L para fluconazol).

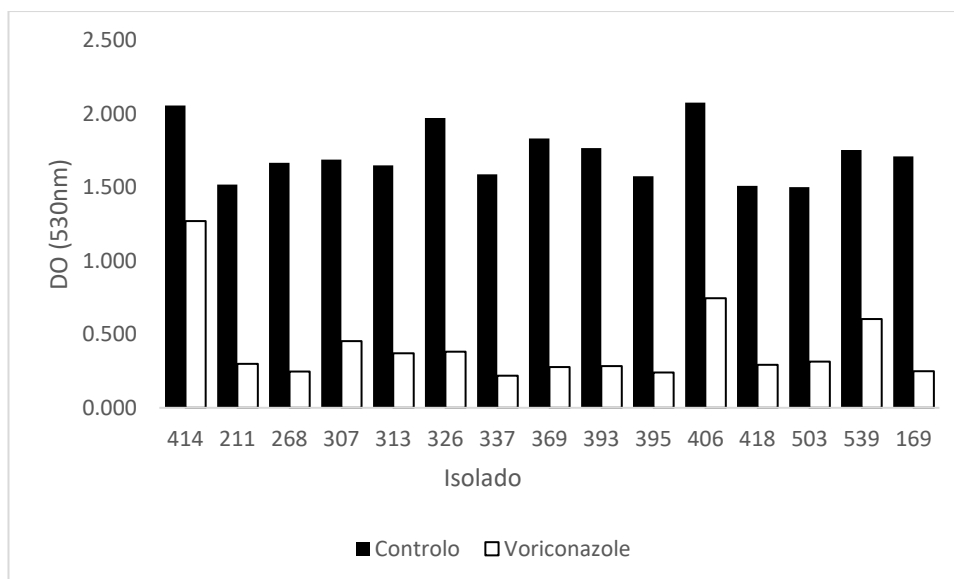


Figura 9 – Resultados obtidos no *profiling* fenotípico de alguns isolados (voriconazol).

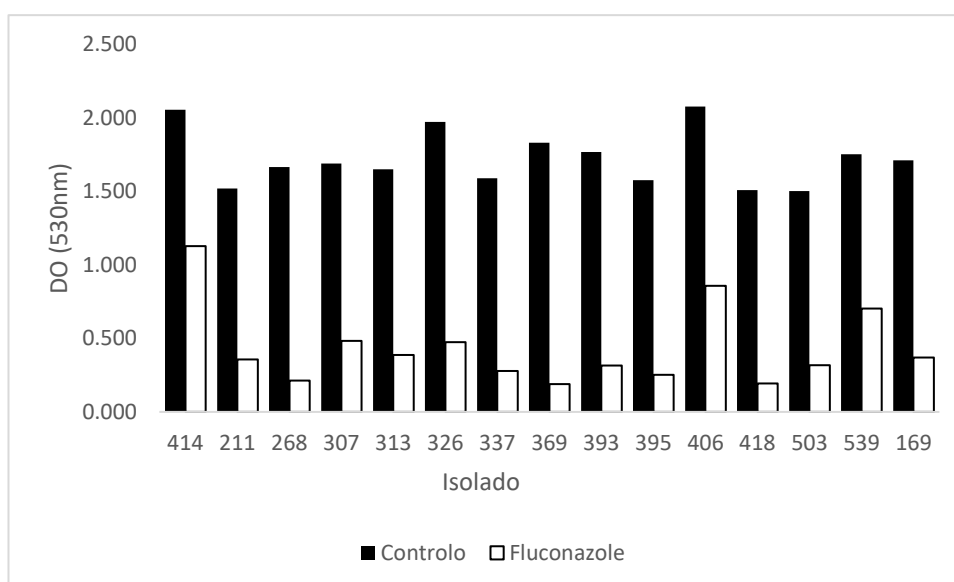


Figura 10 – Resultados obtidos no *profiling* fenotípico de alguns isolados (fluconazol).

A análise da suscetibilidade a antifúngicos dos isolados examinados revelou que apenas um dos isolados de espécie *C. glabrata* era resistente ao fluconazol e voriconazol obtendo-se uma percentagem de 0,7 % de prevalência de resistência, encontrando-se abaixo dos estudos que tem sido reportado noutros estudos epidemiológicos realizados em Portugal^{6,7,15} como a nível Mundial^{16,29,30,66}. No caso de *C. albicans* foi detetado um isolado com resistência cruzada aos azóis, obtendo-se uma prevalência de resistência de apenas 0,2 %, que tal como *C. glabrata* é bastante inferior tendo em conta análises anteriormente realizadas noutros estudos publicados^{6,7,15,16,29,30,66}.

3.4. Procura de mutações de ganho de função no gene *CgPDR1*

Na tentativa de perceber qual o mecanismo molecular subjacente à resistência do isolado *C. glabrata* 218 foi sequenciado o gene *CgPdr1* desta estirpe e comparada a sua sequência com a da estirpe de referência CBS138, através do Clustal Omega. O resultado dessa comparação está na Figura 11 e as substituições de aminoácidos estão representadas com um retângulo vermelho.

CBS138_PDR1	MQTLETTSKSNPGEVKAQKPSTRRTKVGKACDSCRRAKIKCNGLKPCPSCTIYGCECTYT	60
218_PDR1	MQTLETTSKSNPGEVKAQKPSTRRTKVGKACDSCRRAKIKCNGLKPCPSCTIYGCECTYT	60
CBS138_PDR1	DAKSTKNLKSNDAGKSKPTGRVSKNKETTRVVDKDIRHLEQQYVFINANIHVGRFRFSENI	120
218_PDR1	DAKSTKNLKSNDAGKSKPTGRVSKNKETTRVVDKDIRHLEQQYVFINANIHVGRFRFSENI	120
CBS138_PDR1	LNGYPQCGAPQNNVGNPLAVNTQCHRGLSETPMSSTFKESNLRDORLLQSSDODDMRNG	180
218_PDR1	LNGYPQCGAPQNNVGNPLAVNTQCHRGLSETPMSSTFKESNLRDORLLQSSDODDMRNG	180
CBS138_PDR1	DSEERDLKGSSENVKSKDNKSDPLIYKDDTHIESTVNKLTQAVNELKSLQNAAPSSIKS	240
218_PDR1	DSEERDLKGSSENVKSKDNKSDPLIYKDDTHIESTVNKLTQAVNELKSLQNAAPSSIKS	240
CBS138_PDR1	SINAIELQLRNILDNWKPEVDFEKAKINESATTKSLETNLLRNKYTNHVHLTRFRIWIDY	300
218_PDR1	SINAIELQLRNILDNWKPEVDFEKAKINESATTKSLETNLLRNKYTNHVHLTRFRIWIDY	300
CBS138_PDR1	KNANKNNHFMGECGFLAESFFASINQPLVDELFGLYSQVEAFSLQGLGVCVHLYEPYMKT	360
218_PDR1	KNANKNNHFMGECGFLAESFFASINQPLVDELFGLYSQVEAFSLQGLGVCVHLYEPYMKT	360
CBS138_PDR1	EEAIKMKETLYIILRFIDICVHINEESISIANPLETYLRKKHLMPTPTPRSSYGSQ	420
218_PDR1	EEAIKMKETLYIILRFIDICVHINEESISIANPLETYLRKKHLMPTPTPRSSYGSQ	420
CBS138_PDR1	SASTKSLVSKIIERIQQPFIESVTNVSSSSTIRSSRRVKNNVWIAEHVYKAKILCYERL	480
218_PDR1	SASTKSLVSKIIERIQQPFIESVTNVSSSSTIRSSRRVKNNVWIAEHVYKAKILCYERL	480
CBS138_PDR1	RFHCHRKIRRRTKWNSCVHIFVSGRNALSIMLLSDVIQFLINDYIHGTSVASSRTACS	540
218_PDR1	RFHCHRKIRRRTKWNSCVHIFVSGRNALSIMLLSDVIQFLINDYIHGTSVASSRTACS	540
CBS138_PDR1	RRILWFKGLESCCKCKNGFPPLGLVLRRLRVDCKEAATHVEVIQLKSQYEEGFFCDDCY	600
218_PDR1	RRILWFKGLESCCKCKNGFPPLGLVLRRLRVDCKEAATHVEVIQLKSQYEEGFFCDDCY	600
CBS138_PDR1	CQLFITDFKLWLSGGGVSRYKSKANGSCVFRCSNFCPLIRVGPYNSYQVSKIFICIHYS	660
218_PDR1	CQLFITDFKLWLSGGGVSRYKSKANGSCVFRCSNFCPLIRVGPYNSYQVSKIFICIHYS	660
CBS138_PDR1	KFRETADIKKPIINGNCGWYSLYRDIIGNQKANKCTMGYICRGDQRNQRYSQIYFELI	720
218_PDR1	KFRETADIKKPIINGNCGWYSLYRDIIGNQKANKCTMGYICRGDQRNQRYSQIYFELI	720
CBS138_PDR1	SQIQANQYGRQFNCTNGETKIRLANISHEGASQTIALESNENYPKYQRLFNCNNVRILC	780
218_PDR1	SQIQANQYGRQFNCTNGETKIRLANISHEGASQTIALESNENYPKYQRLFNCNNVRILC	780
CBS138_PDR1	TIMSVFSYADFPYCEEYNGCQDDGCSIKISPRNVFAECQSMQPCRSYIQRFFIFFLYYD	840
218_PDR1	TIMSVFSYADFPYCEEYNGCQDDGCSIKISPRNVFAECQSMQPCRSYIQRFFIFFLYYD	840
CBS138_PDR1	NFKIDDNRRIYANRIDEGRVYEVFSMPPCRSTSDASRSKLLLIFFIVTADIEIWFYVVIQKN	900
218_PDR1	NFKIDDNRRIYANRIDEGRVYEVFSMPPCRSTSDASRSKLLLIFFIVTADIEIWFYVVIQKN	900
CBS138_PDR1	SRRNDGLQLRPQFGLRGHKVQWIVQNAFLYQCLRYHHRFCQCEESFNGVGEGKFNYTNCI	960
218_PDR1	SRRNDGLQLRPQFGLRGHKVQWIVQNAFLYQCLRYHHRFCQCEESFNGVGEGKFNYTNCI	960
CBS138_PDR1	SLIGLKESNAVGRQCSISRGLYTNFCLRAHNGDQRSIPSLCKWIGSANHLFGNFRVCQ	1020
218_PDR1	SLIGLKESNAVGRQCSISRGLYTNFCLRAHNGDQRSIPSLCKWIGSANHLFGNFRVCQ	1020
CBS138_PDR1	GRFETLPMGPIFCLLV	1036
218_PDR1	GRFETLPMGPIFCLLV	1036

Figura 11 – Alinhamento da sequência de *CgPDR1* obtida a partir do isolado 218 com a sequência da estirpe de referência CBS138.

Tabela 5 – Alteração da sequência de aminoácidos do fator de transcrição CgPdr1 codificados pelo isolado 218 quando comparado com a estirpe de referência CBS138.

	5	10	35	91	98	143	173	243	274	376	392	555	558
CBS138	E	S	R	V	L	T	D	D	K	R	I	E	G
218				I	S			N					

Na Tabela 5 pode observar-se as 3 mutações encontradas, V91I, L98S e D243N. Estas não são atribuíveis à resistência uma vez que são observadas tanto em isolados sensíveis como em resistentes³⁵. Dessa forma, os resultados sugerem que este isolado não codifica um alelo ganho de função do *CgPdr1* pelo que ficam por esclarecer quais os mecanismos moleculares subjacentes ao seu fenótipo de resistência.

4. Conclusão

Neste trabalho foi possível observar que à semelhança do que se tem observado noutros centros clínicos em Portugal, também nos centros hospitalares examinados neste trabalho *C. albicans* foi a espécie mais predominantemente isolada. Tal como reportado noutros estudos realizados em Portugal e no Mundo *C. albicans* é a estirpe mais frequentemente isolado, podendo atingir frequências de isolamento superiores a 70%. Observou-se também uma elevada prevalência de isolamentos de espécies *Candida* não-*albicans*, com ênfase para *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. A análise da distribuição das espécies isoladas nos diferentes hospitais e postos de recolha foi, na sua grande parte, idêntica ao que sugere um padrão comum de colonização e de infeção das espécies de *Candida*.

A análise da suscetibilidade a antifúngicos dos isolados examinados revelou que apenas um dos isolados de espécie *C. glabrata* era resistente ao fluconazol e voriconazol obtendo-se uma percentagem de 0,7 % de prevalência de resistência, encontrando-se abaixo dos estudos que tem sido reportado noutros estudos epidemiológicos realizados em Portugal. Significativamente, a resistência deste isolado não pode ser correlacionada com a codificação de uma variante ganho de função no regulador CgPdr1, mecanismo que tem sido amplamente descrito como mediando a resistência da maior parte dos isolados. Foi também identificado um isolado de *C. albicans* resistente a ambos os azóis uma vez que apresentou um crescimento robusto na presença da concentração superiores ao *breakpoint* de resistência.

Ambos os isolados foram recolhidos a partir de produtos não estéreis e que se apresentam como colonizadores do Homem, reforçando assim a importância do estudo das leveduras comensais, pois para além de revelarem resistência, no caso de uma situação em que estas evoluíssem para uma situação de candidemia, seja por uma diminuição do sistema autoimune, seria bastante mais problemática a eliminação destas leveduras.

Referências Bibliográficas

1. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, 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): 503-535.
2. Lim CS-Y, Rosli R, Seow HF, Chong PP. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012, 31: 21–31.
3. Ellepola AN, Samaranayake LP. Inhalational and topical steroids, and oral candidosis: a mini review. *Oral Dis*. 2001, 7(4): 211-6.
4. Lalla RV, Latortue MC, Hong CH, et al., A systematic review of oral fungal infections in patients receiving cancer therapy. *Support Care Cancer* 2010, 18(8): 985-92.
5. Chatzivasileiou P, Vyzantiadis TA, Vaginal yeast colonisation: From a potential harmless condition to clinical implications and management approaches-A literature review. *Mycoses* 2019, 62(8): 638-50.
6. Costa-De-Oliveira S, Pina-Vaz C, Mendonça D, Gonçalves Rodrigues, A. A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2008, 27: 365-74.
7. Faria-Ramos I, Neves-Maia J, Ricardo E, et al. Species distribution and in vitro antifungal susceptibility profiles of yeast isolates from invasive infections during a Portuguese multicenter survey. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2014, 33: 2241-47.
8. Meis J, Petrou M, Bille J, Ellis D, Gibbs D. A global evaluation of the susceptibility of *Candida* species to fluconazol by disk diffusion. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 2000, 36: 215–23.
9. Gangneux JP, Cornet M, Bailly S, Fradin C, Féger C, Timsit JF, et al. Clinical Impact of Antifungal Susceptibility, Biofilm Formation and Mannoside Expression of *Candida* Yeasts on the Outcome of Invasive Candidiasis in ICU: An Ancillary Study on the Prospective AmarCAND2 Cohort. *Front Microbiol*. 2018, 9: Article 2907.
10. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2012, 36: 288–305.
11. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJS.

- Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, 2013, 62(1): 10-24.
12. Sabino R, Veríssimo C, Brandão J, Martins C, Alves D, Pais C, et al, Serious fungal infections in Portugal. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017, 36(7): 1345-52
 13. Bondaryk, M., Kurzątkowski, W. & Staniszevska, M. Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: Mode of action and resistance development. *Postep. Dermatologii i Alergol*. 2013, 30(5): 293-301.
 14. Hasan F, Xess I, Wang X, Jain N, Fries BC. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes Infect*. 2009, 11(8-9): 753-61.
 15. Pfaller MA, Diekema DJ, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN. Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* Species From 1997–2016. *OFID* 2019, 6(Suppl 1): S79-94
 16. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazol and voriconazol as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol*. 2010, 48(4): 1366-77.
 17. Vaezi A, Fakhim H, Khodavaisy S, Alizadeh A, Nazeri M, Soleimani A, Boekhout T, Badali H, Epidemiological and mycological characteristics of candidemia in Iran: a Systematic review and meta-analysis. *Journoul de Mycologie Médicale*. 2017, 27(2): 146-52.
 18. Castanheira M, Messer SA, Jones RN, Farrell DJ, Pfaller MA. Activity of echinocandins and triazoles against a contemporary (2012) worldwide collection of yeast and moulds collected from invasive infections. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2014, 44(4): 320-6.
 19. Lockhart SR. Current Epidemiology of *Candida* Infection. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2014, 36(17): 131-6.
 20. Paulo C, Mourão C, Veiga PM, Rocha G, Alves AF, Querol A, et al. Retrospective analysis of clinical yeast isolates in a hospital in the centre of Portugal: spectrum and revision of the identification procedures. *Med. Mycol*. 2009, 47(8): 836-44.

21. Ryan P, Motherway C, Powell J, Elsaka A, Sheikh AA, Jahangir A, et al. Candidemia in an Irish intensive care unit (ICU) setting between 2004 and 2018 reflects increased incidence of *Candida glabrata*. *J Hosp Infect*. 2019, 102(3): 347-50.
22. Pfaller MA, Diekema DJ, Twelve years of fluconazol in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazol susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin Microbiol Infect*. 2004, 10(Suppl 1): S11-23
23. Sabino R, Verissimo C, Brandão J, Alves C, Parada H, Rosado L, et al., Epidemiology of candidemia in oncology patients: a 6-year survey in a Portuguese central hospital. *Med Mycol*. 2010, 48(2): 346-54.
24. Correia A, Sampaio P, Almeida J, Pais C. Study of molecular epidemiology of candidiasis in Portugal by PCR fingerprinting of *Candida* clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 2004, 42(12): 5899-903.
25. Cavaleiro I, Proença L, Félix S, Salema-Oom M. Prevalence of yeast other than *Candida albicans* in denture wearers. *J Prosthodont*. 2013, 22(5): 351-7.
26. Liebowitz LD, Ashbee HR, Evans EG, Chong Y, Mallatova N, Zaidi M, et al. A two year global evaluation of the susceptibility of *Candida* species to fluconazol by disk diffusion. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001, 40(1-2): 27-33.
27. Lopes M, Barros R, Peres I, Serelha M, Neto MT, Cabrita J, et al., Surveillance of nosocomial fungal infections in a Portuguese paediatric hospital: incidence and risk factors. *Journal de Mycologie Médical*. 2006, 16(4): 212-19.
28. Fidel PL, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin. Microbiol. Rev*. 1999, 12(1): 80-96.
29. Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Sheehan D. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazol and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist Updat*, 2010. 13(6): 180-95.
30. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Messer SA, Tendolkar S, Diekema J., Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for posaconazole and voriconazol and *Candida spp.* as determined by 24-hour CLSI broth microdilution. *J Clin Microbiol*, 2011. 49(2): 630-7.

31. Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Canton E, Castanheira M, Cuenca-Estrella M, Diekema J, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine, and itraconazole and *Candida spp.* as determined by CLSI broth microdilution. *J Clin Microbiol*, 2012. 50(6): 20406.
32. El-Houssaini HH, Elnabawy OM, Nasser HA, Elkathib EF, Correlation between antifungal resistance and virulence factors in *Candida albicans* recovered from vaginal specimens. *Microbial Pathogenesis*. 2019, 128:13-19.
33. Costa-de-Oliveira S, Sousa I, Correia A, Sampaio P, Pais C, Rodrigues AG, et al. Genetic relatedness and antifungal susceptibility profile of *Candida albicans* isolates from fungaemia patients. *Med. Mycol.* 2011, 49(3): 248-52.
34. Carrete L, Ksiezopolska E, Gómez-Molero E, Angoulvant A, Bader O, Fairhead C, et al., Genome Comparisons of *Candida glabrata* Serial Clinical Isolates Reveal Patterns of Genetic Variation in Infecting Clonal Populations. *Front Microbiol*, 2019, 10: 112.
35. Ferrari S, Ischer F, Calabrese D, Posteraro B, Sanguinetti M, Fadda G, et al., Gain of function mutations in CgPDR1 of *Candida glabrata* not only mediate antifungal resistance but also enhance virulence. *PLoS Pathog*, 2009. 5(1): e1000268.
36. Whaley SG, Zhang Q, Caudle KE, Rogers PD. Relative Contribution of the ABC Transporters Cdr1, Pdh1, and Snq2 to Azole Resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018. 62(10): e01070-18
37. Romeo O, Criseo G. *Candida africana* and its closest relatives. *Mycoses*. 2010, 54(6): 475-86.
38. Tietz HJ, Hopp M, Schmalreck A, Sterry W, Czaika V. *Candida africana* sp. nov., a new human pathogen or a variant of *Candida albicans*?. *Mycoses*. 2001, 44(11-12): 437-45.
39. Alonso-Vargas R, Elorduy L, Eraso E, Cano FJ, Guarro J, Pontón J, et al. Isolation of *Candida africana*, probable atypical strains of *Candida albicans*, from a patients with vaginitis. *Med Mycol*. 2008, 46(2): 167-70.
40. Romeo O, Criseo G. Molecular epidemiology of *Candida albicans* and its closely related yeasts *Candida dubliniensis* and *Candida africana*. *J Clin Microbiol*. 2009, 47(1): 212-14.

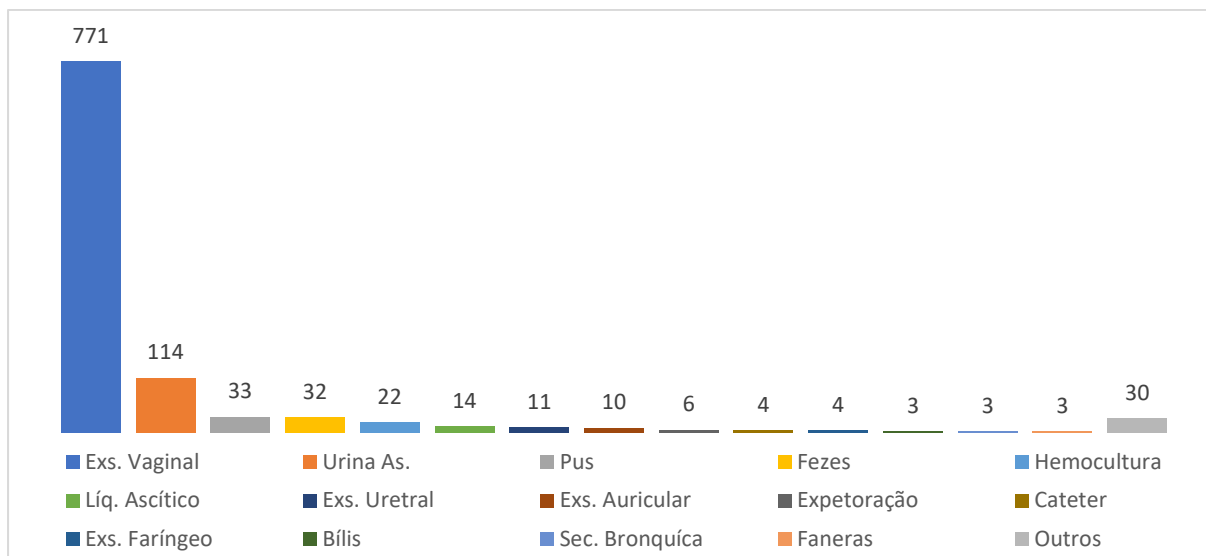
41. Odds FC, Bounoux ME, Shaw DJ, Bain JM, Davidson AD, Diogo D, et al. Molecular phylogenetics of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2007, 6(6): 1041-52.
42. Al-Hedaithy SS, Fotedar R. Recovery and studies on chlamydospore-negative *Candida albicans* isolated from clinical specimens. *Med Mycol*. 2002, 40(3): 301-16.
43. Asakura K, Iwaguchi S, Homma M, Sukai T, Higashide K, Tanaka K. Electrophoretic karyotypes of clinically isolated yeasts of *Candida albicans* and *C. glabrata*. *J Gen Microbiol*. 1991, 137(11): 2531-38.
44. Borman AM., Szekely A, Linton CJ, Palmer MD, Brown P, Johnson EM. Epidemiology, Antifungal Susceptibility, and Pathogenicity of *Candida africana* Isolates from the United Kingdom. *J Clin Microbiol*. 2013, 51(3): 967-72.
45. Kurzai, O. Human Fungal Pathogens. *The Mycota, Vol.XII*. (Springer, 2014).
46. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), R.-T., J. L., Barchiest F, Bille J, Chryssanthou E, Cuenta-Estrella M, Denning D, Donnelly JP, Dupont B, Fegeler W, Moore C, Richardson M, Verweij PE. EUCAST discussion document E.Dis 7.1: Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect*. 2003, 9: 1-8.
47. Murphy A, Kavanagh K. Emergence of *Saccharomyces cerevisiae* as a human pathogen: Implications for biotechnology. *Enzyme and Microbial Technology*. 1999, 25(7): 551-7.
48. Goldstein A, McCusker JH, Development of *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Pathogen: A System for the Genetic Identification of Gene Products Required for Survival in the Mammalian Host Environment. *Genetics*. 2001, 159(2) 499-513.
49. McCusker, J.H., *Saccharomyces cerevisiae*: an Emerging and Model Pathogenic Fungus. *Molecular Principles of Fungal Pathogenesis*. 2006, 18: 245-59.
50. Pérez-Torrado R, Querol A, Opportunistic Strains of *Saccharomyces cerevisiae*: A Potential Risk Sold in Food Products. *Front Microbiol*. 2016, 6: 1522. doi: 10.3389/fmicb.2015.01522

51. Borman AM, Linton CJ, Miles SJ, Johnson EM. Molecular Identification of Pathogenic Fungi, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008, 61(suppl 1): i7-i12.
52. Taj-Aldeen, SJ, Kolecka A, Boesten R, Alolaqi A, Almaslamani M, Chandra P, et al, Epidemiology of candidemia in Qatar, the Middle East: performance of MALDI-TOF MS for the identification of *Candida* species, species distribution, outcome, and susceptibility pattern. *Infection*. 2014, 42(2): 393-404.
53. Krcmery V, Barnes AJ. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect*. 2002, 50(4): 243-60.
54. Shin KS, Shin YK, Yoon JH, Park YH, *Candida thermophila* sp. nov., a novel thermophilic yeast isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2001, 51(Pt 6): 2167-70.
55. Pfaller MA, Diekema DJ, Colombo AL, Kibbler C, Ng KP, Gibbs DL, et al. *Candida rugosa*, an Emerging Fungal Pathogen with Resistance to Azoles: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program. *J Clin Microbiol*. 2006, 44(10): 3578–82.
56. Colombo AL, Melo AS, Crespo Rosas RF, Salomão R, Briones M, Hollis RJ, et al. Outbreak of *Candida rugosa* candidemia: an emerging pathogen that may be refractory to amphotericin B therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003, 46(4): 253-57.
57. Desnos-Olliver M, Ragon M, Robert V, Raoux D, Gantier JC, 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.
58. Borman AM, Petch R, Linton CJ, Palmer MD, Bridge PD, Johnson EM. *Candida nivariensis*, an Emerging Pathogenic Fungus with Multidrug Resistance to Antifungal Agents. *J Clin Microbiol*. 2008, 46(3): 933-8.
59. Lockhart SR, Messer SA, Gherna M, Bishop JA, Merz WG, Pfaller MA, et al. Identification of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a Large Global Collection of *Candida glabrata* Isolates: Comparison to the Literature. *J Clin Microbiol*. 2009, 47(4): 1216-17.

60. Shin-ichi F, Yasuko S, Tikako O, Yumi O, Hideaki T, Kazunori Y, et al. Catheter-Related Fungemia Due to Fluconazol-Resistant *Candida nivariensis*. *J Clin Microbiol.* 2007, 45(10): 3459-61.
61. Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ, *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: Why Is *C. albicans* More Pathogenic?. *International Journal of Microbiology.* 2012. doi:10.1155/2012/205921
62. Blinkhorn RB, Adelstein D, Spagnuolo PJ, Emergence of a New Opportunistic Pathogen, *Candida lusitanae*. *J Clin Microbiol.* 1989, 27(7): 236-40.
63. Rho J, Shin JH, Song JW, Park MR, Kee SJ, Jang SJ, et al. Molecular investigation of two consecutive nosocomial clusters of *Candida tropicalis* candiduria using pulsed-field gel electrophoresis. *J Microbiol.* 2004, 42(2): 80-6.
64. Panackal AA, Gribskov JL, Staab JF, Kirby KA, Rinaldi M, Marr KA. Clinical Significance of Azole Antifungal Drug Cross-Resistance in *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol.* 2006, 44(5): 1740-43.
65. Espinel-Ingroff A. Standardized disk diffusion method for yeasts. *Clin. Microbiol. Newsl.* 2007, 29(13): 97-100.
66. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN. In Vitro Activities of Caspofungin Compared with Those of Fluconazol and Itraconazole against 3,959 Clinical Isolates of *Candida* spp., Including 157 Fluconazol-Resistant Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2003, 47(3): 1068-71.

Anexos

A1. Distribuição dos produtos a partir dos quais se obtiveram os isolados em estudo



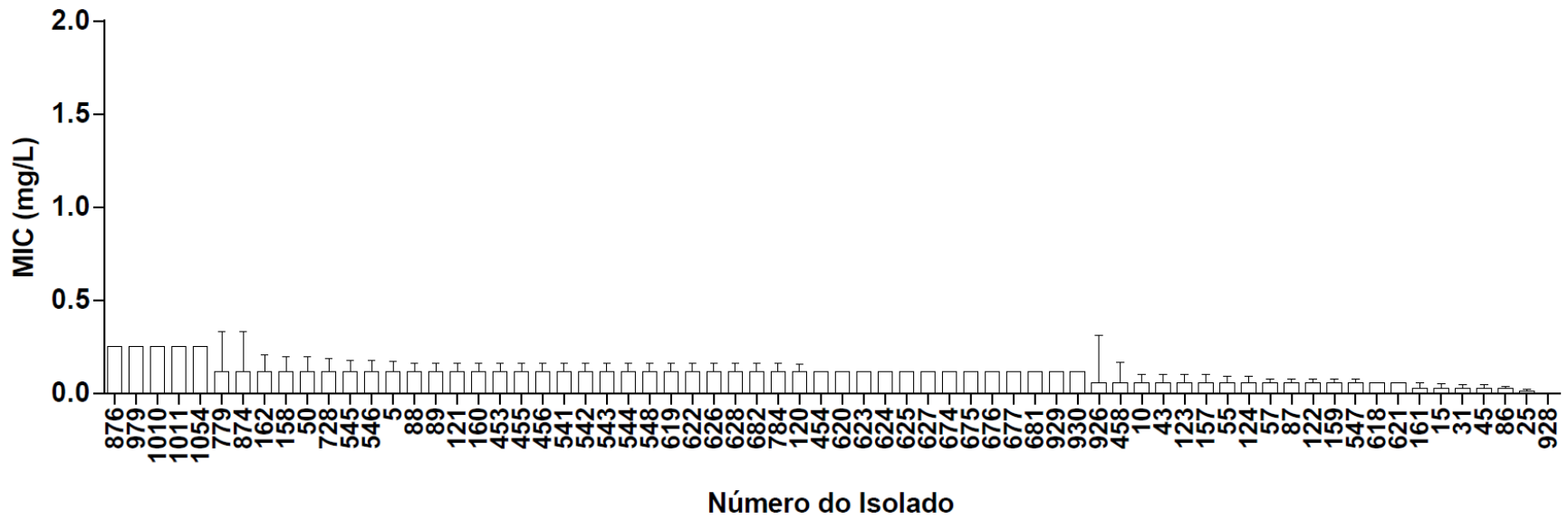
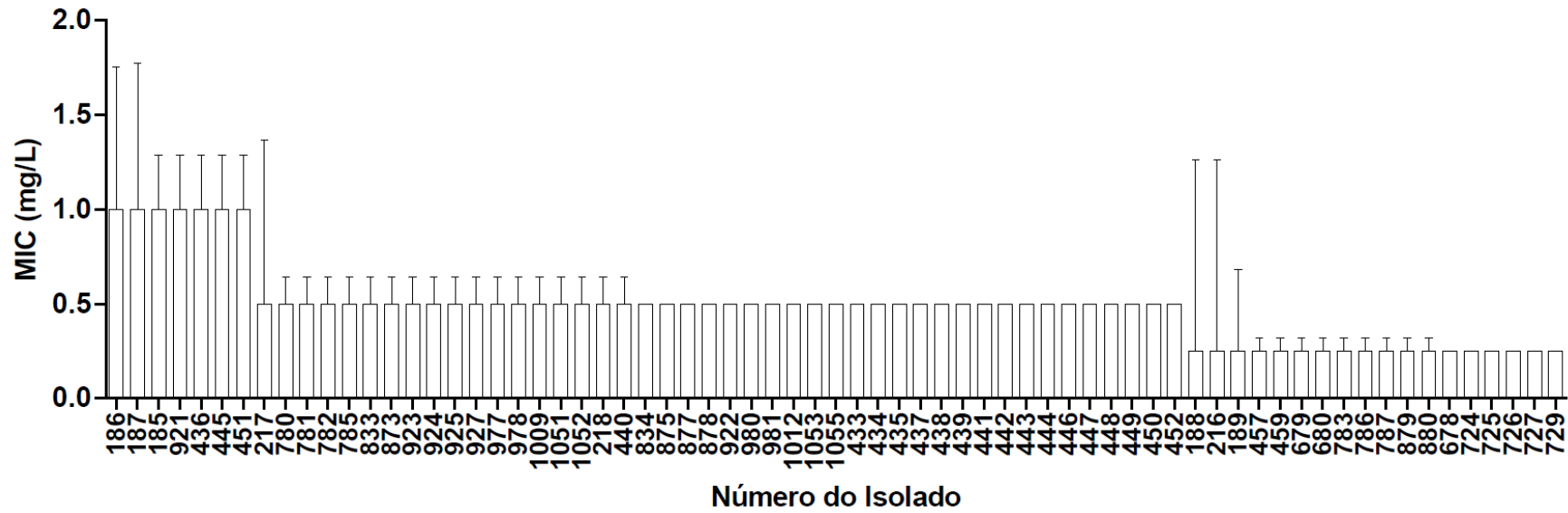
A2. Distribuição detalhada dos produtos a partir dos quais se isolaram as quatro principais espécies *Candida*.

Produto	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
Exsudado Vaginal	573	114	24	23
Urina Asséptica	81	14	3	9
Fezes	21	3	2	-
Pus	18	1	6	3
Hemocultura	16	3	1	1
Líquido ascítico	10	-	3	-
Exsudado Uretral	9	2	-	-
Expetoração	6	-	-	-
Exsudado Auricular	3	-	6	-
Exsudado Faríngeo	3	1	-	-
Secreção Bronquica	3	-	-	-
Cateter	3	-	-	-
Bílis	2	1	-	-
Biopsia	1	-	1	-
LBA	1	-	-	-
Líquido Pleural	1	-	-	-
Lesão Pele Genital	1	-	-	-
Faneras	-	-	2	-
Exsudado do dedo do pé	-	-	1	-
Lesão do dedo da mão	-	-	1	-
Lesão da unha da mão	-	-	1	-
Exsudado do Tubo do PEG	-	-	-	1
Outro Produto	13	-	1	-

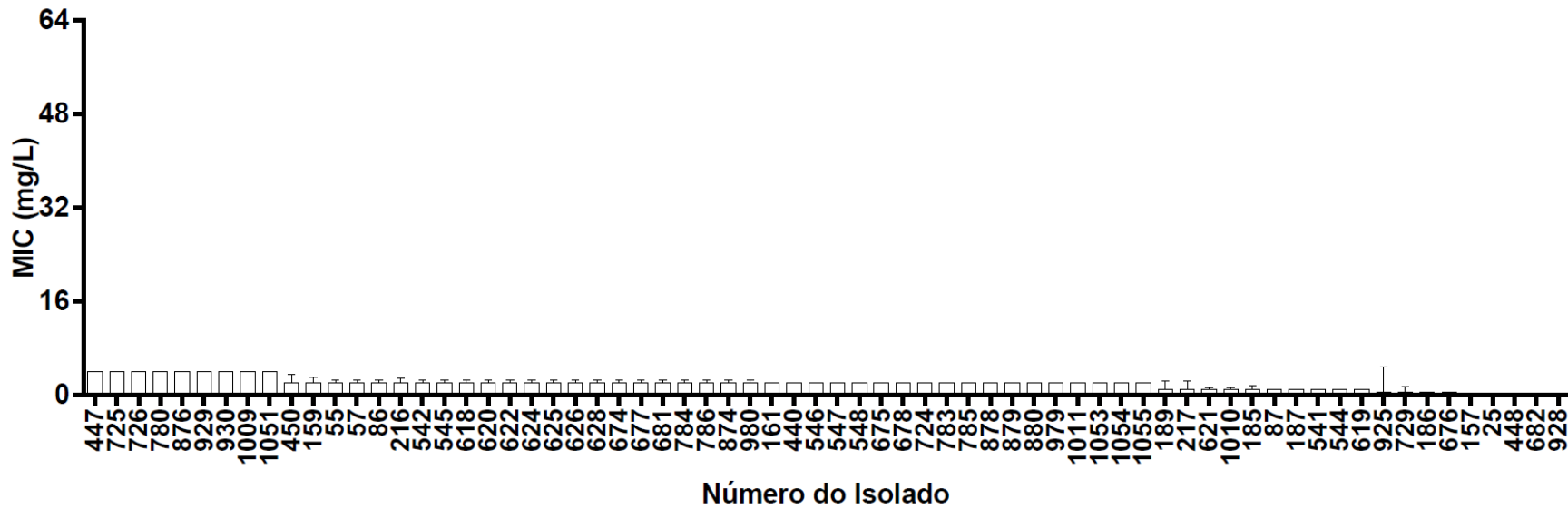
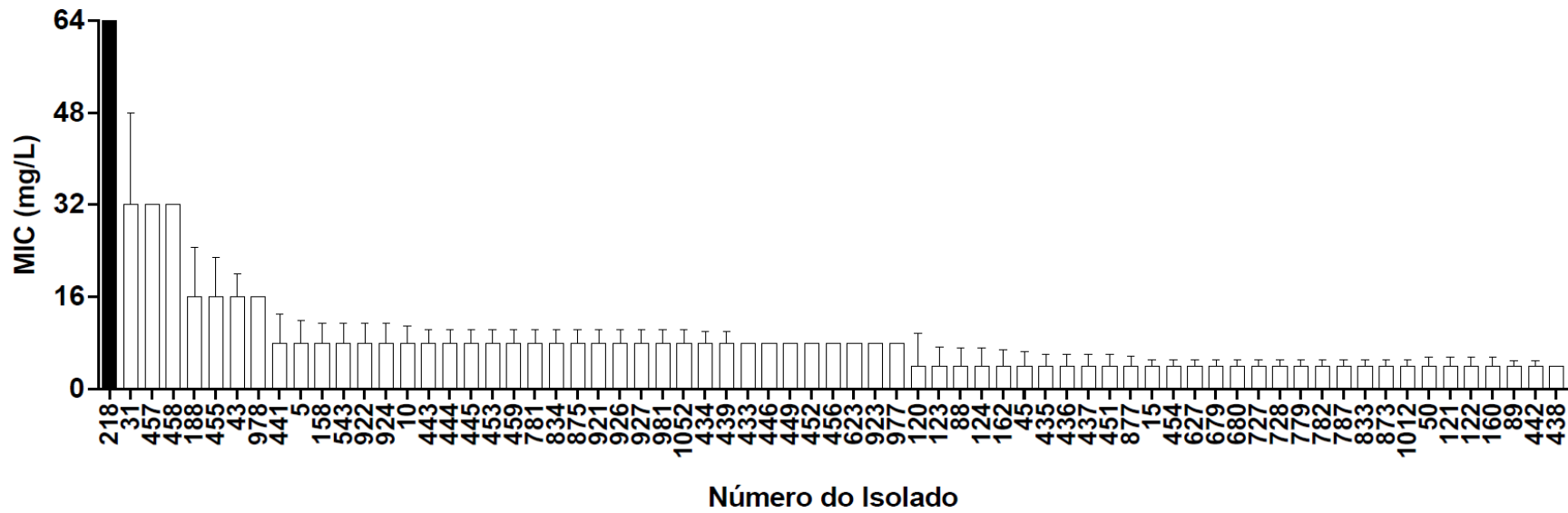
A.3. Distribuição detalhada das espécies recolhidas por Hospital/Posto de Recolha.

	Posto de Recolha	Hospital 1	Hospital 2	Hospital 3	Hospital 4	Hospital 5
<i>C. albicans</i>	347	154	94	58	65	47
<i>C. glabrata</i>	59	32	11	23	3	13
<i>C. parapsilosis</i>	26	9	3	9	2	3
<i>C. tropicallis</i>	16	7	5	5	3	1
<i>C. krusei</i>	6	3	1	2	-	-
<i>C. lusitaniae</i>	5	2	-	2	-	-
<i>C. kefyr</i>	3	2	-	-	-	1
<i>C. rugosa</i>	2	1	-	-	-	-
<i>C. dubliniensis</i>	1	1	-	-	-	-
<i>C. famata</i>	1	-	-	-	-	-
<i>C. guillermondii</i>	1	-	-	-	-	-
<i>C. thermophilla</i>	-	-	-	-	1	-
<i>C. nivariensis</i>	-	-	-	-	-	1
Total	467	211	114	99	74	66

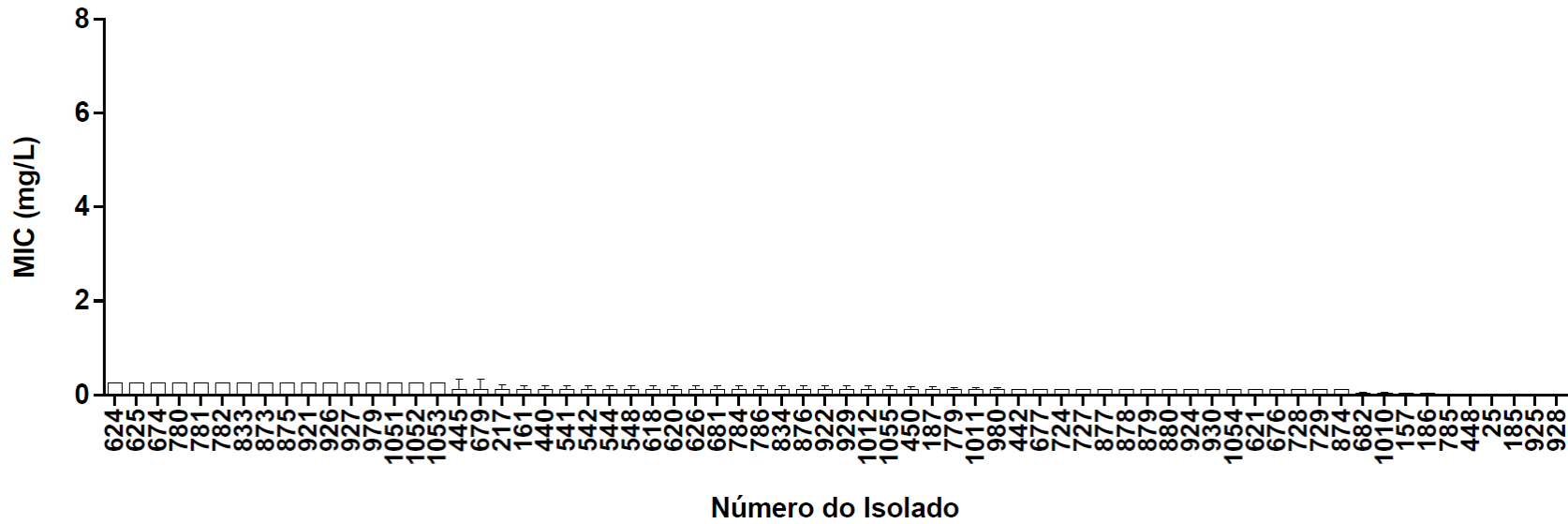
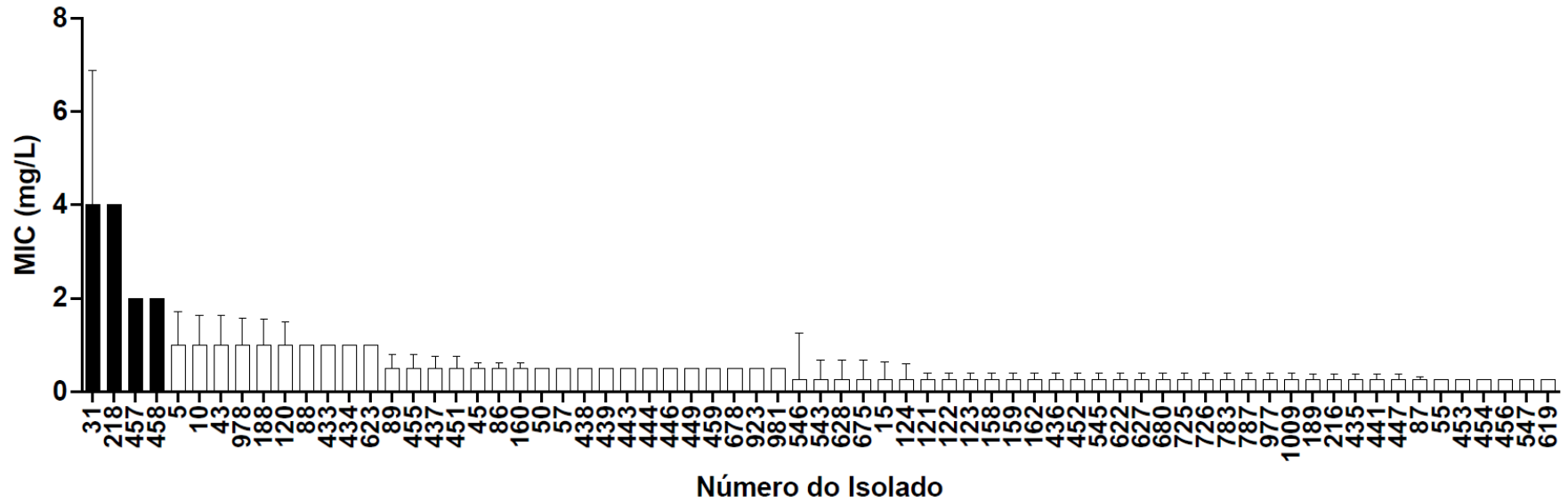
A4. Valor de MIC obtidos por método EUCAST nos isolados deste estudo – Anfotericina B



A5. Valor de MIC obtidos por método EUCAST nos isolados deste estudo – Fluconazol



A6. Valor de MIC obtidos por método EUCAST nos isolados deste estudo – Voriconazol



A7. Tabela detalhada dos resultados dos testes de avaliação de suscetibilidade a antifúngicos para *C. albicans*

Nº de coleção	Produto	Hospital	Anf. B	Flu.	Vc.
2	Líquido ascítico	Hospital 3	S	S	S
6	Líquido ascítico	Hospital 3	S	S	S
7	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
8	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
9	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
11	Urina Assética	Hospital 3	S	S	S
12	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
13	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
14	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
16	Urina Assética	Hospital 4	S	S	S
17	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
18	Pus	Hospital 3	S	S	S
19	Pus	Hospital 4	S	S	S
20	Urina Assética	Hospital 4	S	S	S
21	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
22	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
23	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
24	Exsudado Vaginal	Hospital 5	S	S	S
26	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
28	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
29	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
30	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
32	Exsudado Uretral	Posto de Recolha	S	S	S
33	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
34	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
35	Exsudado Vaginal	Hospital 5	S	S	S
36	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
37	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
38	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
39	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
41	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
42	Exsudado Vaginal	Hospital 5	S	S	S

44	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
46	Pus	Hospital 2	S	S	S
49	Exsudado Vaginal	Hospital 4	S	S	S
51	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
52	Urina Assética	Hospital 3	S	S	S
53	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
54	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
56	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
58	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
59	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
60	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
61	Urina Assética	Hospital 4	S	S	S
62	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
63	Urina Assética	Hospital 3	S	S	S
64	Fezes	Hospital 5	S	S	S
65	Líq. Bronqueoalveolar	Hospital 4	S	S	S
66	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
67	Exsudado Vaginal	Hospital 5	S	S	S
68	Fezes	Posto de Recolha	S	S	S
69	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
70	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
71	Exsudado Vaginal	Hospital 5	S	S	S
72	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
73	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
74	Urina assética	Hospital 3	S	S	S
75	Exsudado Vaginal	Hospital 3	S	S	S
76	Fezes	Posto de Recolha	S	S	S
77	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
78	Fezes	Posto de Recolha	S	S	S
79	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
80	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
81	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
82	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
83	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S

84	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
85	Exsudado Vaginal	Hospital 5	S	S	S
96	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
97	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
98	Exsudado Vaginal	Hospital 5	S	S	S
99	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
100	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
101	Cateter	Hospital 4	S	S	S
102	Exsudado Vaginal	Hospital 4	S	S	S
103	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
104	Exsudado Vaginal	Hospital 5	S	S	S
105	Exsudado Vaginal	Hospital 4	S	S	S
106	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
107	Exsudado Vaginal	Hospital 4	S	S	S
108	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
109	Urina Assética	Hospital 4	S	S	S
110	Urina Assética	Hospital 4	S	S	S
111	Pus	Posto de Recolha	S	S	S
112	Hemocultura	Hospital 4	S	S	S
113	Hemocultura	Hospital 4	S	S	S
114	Hemocultura	Hospital 4	S	S	S
129	Outro Produto	Hospital 3	S	S	S
130	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
131	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
132	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
133	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
134	Urina Assética	Hospital 4	S	S	S
135	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
136	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
137	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
138	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
139	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
140	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
141	Exsudado Vaginal	Hospital 5	S	S	S
142	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S

143	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
144	Fezes	Hospital 5	S	S	S
145	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
146	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
147	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
148	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
149	Exsudado Vaginal	Hospital 5	S	S	S
150	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
151	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
152	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
153	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
154	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
155	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
156	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
169	Urina Assética	Posto de Recolha	S	S	S
170	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
171	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
172	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
173	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
174	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
175	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
176	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
177	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
178	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
179	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
180	Exsudado Vaginal	Hospital 5	S	S	S
181	Exsudado Faríngeo	Posto de Recolha	S	S	S
182	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
183	Urina Assética	Hospital 4	S	S	S
184	Urina Assética	Hospital 4	S	S	S
191	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
192	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
193	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
194	Exsudado Vaginal	Hospital 3	S	S	S
195	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S

196	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
197	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
198	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
199	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
200	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
201	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
202	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
203	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
204	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
205	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
206	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
207	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
208	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
209	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
210	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
211	Fezes	Posto de Recolha	S	S	S
212	Fezes	Posto de Recolha	S	S	S
213	Exsudado Uretral	Hospital 4	S	S	S
214	Líquido Ascítico	Hospital 3	S	S	S
215	Urina Assética	Hospital 3	S	S	S
249	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
250	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
251	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
252	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
253	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
254	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
255	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
256	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
257	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
258	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
259	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
260	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
261	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
262	Exsudado Vaginal	Hospital 3	S	S	S
263	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S

264	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
265	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
266	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
267	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
268	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
269	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
270	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
271	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
272	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
273	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
274	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
275	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
276	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
277	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
278	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
279	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
280	Exsudado Vaginal	Hospital 3	S	S	S
281	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
282	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
283	Exsudado Vaginal	Hospital 3	S	S	S
284	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
285	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
286	Exsudado Vaginal	Hospital 4	S	S	S
287	Exsudado Vaginal	Hospital 5	S	S	S
288	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
289	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
290	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
291	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
292	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
293	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
294	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
295	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
296	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
297	Exsudado Vaginal	Hospital 5	S	S	S
298	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S

299	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
300	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
301	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
302	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
303	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
304	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
305	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
306	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
307	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
308	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
309	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
310	Exsudado Vaginal	Hospital 5	S	S	S
311	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
312	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
313	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
314	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
315	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
316	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
317	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
318	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
319	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
320	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
321	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
322	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
323	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
324	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
325	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
326	Exsudado Vaginal	Hospital 3	S	S	S
327	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
328	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
329	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
330	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
331	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
332	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
333	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S

334	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
335	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
336	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
337	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
338	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
339	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
340	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
341	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
342	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
343	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
344	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
345	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
346	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
347	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
348	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
349	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
350	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
351	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
352	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
353	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
354	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
355	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
356	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
357	Exsudado Vaginal	Hospital 5	S	S	S
358	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
359	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
360	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
361	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
362	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
363	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
364	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
365	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
366	Exsudado Vaginal	Hospital 5	S	S	S
367	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
368	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S

369	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
370	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
371	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
372	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
373	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
374	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
375	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
376	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
377	Exsudado Vaginal	Hospital 3	S	S	S
378	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
379	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
380	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
381	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
382	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
383	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
384	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
385	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
386	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
387	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
388	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
389	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
390	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
391	Urina Assética	Hospital 5	S	S	S
392	Urina Assética	Hospital 3	S	S	S
393	Urina Assética	Hospital 3	S	S	S
394	Urina Assética	Hospital 4	S	S	S
395	Urina Assética	Hospital 3	S	S	S
396	Urina Assética	Hospital 1	S	S	S
397	Urina Assética	Posto de Recolha	S	S	S
398	Urina Assética	Posto de Recolha	S	S	S
399	Urina Assética	Hospital 4	S	S	S
400	Urina Assética	Hospital 3	S	S	S
401	Urina Assética	Hospital 3	S	S	S
402	Urina Assética	Hospital 1	S	S	S
403	Urina Assética	Hospital 4	S	S	S

404	Urina Assética	Hospital 1	S	S	S
405	Urina Assética	Hospital 4	S	S	S
406	Urina Assética	Hospital 4	S	S	S
407	Exsudado Auricular	Hospital 1	S	S	S
408	Exsudado Auricular	Posto de Recolha	S	S	S
409	Exsudado Auricular	Posto de Recolha	S	S	S
410	Exsudado Faríngeo	Posto de Recolha	S	S	S
411	Exsudado Faríngeo	Posto de Recolha	S	S	S
412	Expetoração	Posto de Recolha	S	S	S
413	Secreção Bronquica	Hospital 3	S	S	S
414	Fezes	Posto de Recolha	S	R	R
415	Fezes	Posto de Recolha	S	S	S
416	Pus	Hospital 3	S	S	S
417	Pus	Posto de Recolha	S	S	S
418	Pus	Posto de Recolha	S	S	S
419	Bílis	Posto de Recolha	S	S	S
420	Líquido Ascítico	Posto de Recolha	S	S	S
421	Líquido Ascítico	Hospital 4	S	S	S
422	Líquido Ascítico	Posto de Recolha	S	S	S
423	Outro Produto	Posto de Recolha	S	S	S
424	Outro Produto	Hospital 2	S	S	S
425	Outro Produto	Hospital 1	S	S	S
426	Outro Produto	Posto de Recolha	S	S	S
427	Cateter	Hospital 5	S	S	S
428	Líquido Pleural	Hospital 4	S	S	S
429	Outro Produto	Posto de Recolha	S	S	S
430	Hemocultura	Hospital 3	S	S	S
431	Hemocultura	Hospital 5	S	S	S
496	Hemocultura	Hospital 1	S	S	S
497	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
498	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
499	Exsudado Vaginal	Hospital 3	S	S	S
500	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
501	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
502	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S

503	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
504	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
505	Exsudado Vaginal	Hospital 3	S	S	S
506	Exsudado Vaginal	Hospital 3	S	S	S
507	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
508	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
509	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
510	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
511	Exsudado Vaginal	Hospital 5	S	S	S
512	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
513	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
514	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
515	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
516	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
517	Exsudado Vaginal	Hospital 4	S	S	S
518	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
519	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
520	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
521	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
522	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
523	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
524	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
525	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
526	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
527	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
528	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
529	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
530	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
531	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
532	Urina Assética	Hospital 4	S	S	S
533	Urina Assética	Hospital 2	S	S	S
534	Urina Assética	Hospital 2	S	S	S
535	Urina Assética	Hospital 1	S	S	S
536	Urina Assética	Hospital 4	S	S	S
537	Urina Assética	Hospital 3	S	S	S

538	Fezes	Posto de Recolha	S	S	S
539	Outro Produto	Posto de Recolha	S	S	S
540	Hemocultura	Hospital 2	S	S	S
551	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
552	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
553	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
554	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
555	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
556	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
557	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S
558	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
559	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
560	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
561	Exsudado Vaginal	Hospital 5	S	S	S
562	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
563	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
564	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
565	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
566	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
567	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
568	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
569	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
570	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
571	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
572	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
573	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
574	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
575	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
576	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
577	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
578	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
579	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
580	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
581	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S
582	Exsudado Vaginal	Hospital 2	S	S	S

583	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	S	S	S
584	Exsudado Vaginal	Hospital 1	S	S	S

Legenda:

Anf. B – anfotericina B

Flu – fluconazol

Vc – voriconazol

S – sensível

R – resistente

A8. Tabela detalhada dos resultados dos testes de avaliação de suscetibilidade a antifúngicos para *C. glabrata*

Nº de coleção	Produto	Hospital	Anf. B	Flu	Vc
5	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
10	Exsudado Vaginal	Hospital 2	SDD	SDD	SDD
15	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
25	Exsudado Vaginal	Hospital 4	SDD	SDD	SDD
31	Exsudado Faríngeo	Hospital 5	SDD	SDD	R
43	Exsudado Vaginal	Hospital 2	SDD	SDD	SDD
45	Exsudado Uretral	Hospital 3	SDD	SDD	SDD
50	Exsudado Uretral	Hospital 3	SDD	SDD	SDD
55	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
57	Exsudado Vaginal	Hospital 2	SDD	SDD	SDD
86	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
87	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
88	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
89	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
120	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
121	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
122	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
123	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
124	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
157	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
158	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
159	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
160	Exsudado Vaginal	Hospital 3	SDD	SDD	SDD
161	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
162	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
185	Pus	Hospital 3	SDD	SDD	SDD
186	Exsudado Vaginal	Hospital 3	SDD	SDD	SDD
187	Exsudado Vaginal	Hospital 5	SDD	SDD	SDD
188	Exsudado Vaginal	Hospital 5	SDD	SDD	SDD
189	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
216	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
217	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD

218	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	R	R
433	Exsudado Vaginal	Hospital 5	SDD	SDD	SDD
434	Exsudado Vaginal	Hospital 5	SDD	SDD	SDD
435	Exsudado Vaginal	Hospital 2	SDD	SDD	SDD
436	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
437	Exsudado Vaginal	Hospital 2	SDD	SDD	SDD
438	Exsudado Vaginal	Hospital 2	SDD	SDD	SDD
439	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
440	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
441	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
442	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
443	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
444	Exsudado Vaginal	Hospital 5	SDD	SDD	SDD
445	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
446	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
447	Bílis	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
448	Fezes	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
449	Urina Assética	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
450	Exsudado Vaginal	Hospital 3	SDD	SDD	SDD
451	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
452	Exsudado Vaginal	Hospital 5	SDD	SDD	SDD
453	Exsudado Vaginal	Hospital 5	SDD	SDD	SDD
454	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
455	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
456	Exsudado Vaginal	Hospital 2	SDD	SDD	SDD
457	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	R
458	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	R
459	Fezes	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
541	Exsudado Vaginal	Hospital 2	SDD	SDD	SDD
542	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
543	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
544	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
545	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
546	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
547	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD

548	Exsudado Vaginal	Hospital 2	SDD	SDD	SDD
618	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
619	Exsudado Vaginal	Hospital 5	SDD	SDD	SDD
620	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
621	Exsudado Vaginal	Hospital 3	SDD	SDD	SDD
622	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
623	Exsudado Vaginal	Hospital 2	SDD	SDD	SDD
624	Exsudado Vaginal	Hospital 3	SDD	SDD	SDD
625	Hemocultura	Hospital 3	SDD	SDD	SDD
626	Urina Assética	Hospital 3	SDD	SDD	SDD
627	Urina Assética	Hospital 3	SDD	SDD	SDD
628	Urina Assética	Hospital 3	SDD	SDD	SDD
674	Exsudado Vaginal	Hospital 5	SDD	SDD	SDD
675	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
676	Exsudado Vaginal	Hospital 5	SDD	SDD	SDD
677	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
678	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
679	Exsudado Vaginal	Hospital 3	SDD	SDD	SDD
680	Urina Assética	Hospital 4	SDD	SDD	SDD
681	Urina Assética	Hospital 4	SDD	SDD	SDD
682	Urina Assética	Hospital 3	SDD	SDD	SDD
724	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
725	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
726	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
727	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
728	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
729	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
779	Exsudado Vaginal	Hospital 2	SDD	SDD	SDD
780	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
781	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
782	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
783	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
784	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
785	Urina Assética	Hospital 3	SDD	SDD	SDD
786	Urina Assética	Hospital 3	SDD	SDD	SDD

787	Urina Assética	Hospital 3	SDD	SDD	SDD
833	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
834	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
873	Exsudado Vaginal	Hospital 3	SDD	SDD	SDD
874	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
875	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
876	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
877	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
878	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
879	Fezes	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
880	Urina Assética	Hospital 3	SDD	SDD	SDD
921	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
922	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
923	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
924	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
925	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
926	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
927	Urina Assética	Hospital 3	SDD	SDD	SDD
928	Urina Assética	Hospital 3	SDD	SDD	SDD
929	Pus	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
930	Hemocultura	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
977	Urina Assética	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
978	Urina Assética	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
979	Urina Assética	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
980	Urina Assética	Hospital 5	SDD	SDD	SDD
981	Hemocultura	Hospital 3	SDD	SDD	SDD
1009	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
1010	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
1011	Exsudado Vaginal	Hospital 5	SDD	SDD	SDD
1012	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
1051	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
1052	Exsudado Vaginal	Hospital 1	SDD	SDD	SDD
1053	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
1054	Exsudado Vaginal	Posto de Recolha	SDD	SDD	SDD
1055	Urina Assética	Hospital 3	SDD	SDD	SDD

Legenda:

Anf. B – anfotericina B

Flu – fluconazol

Vc – voriconazol

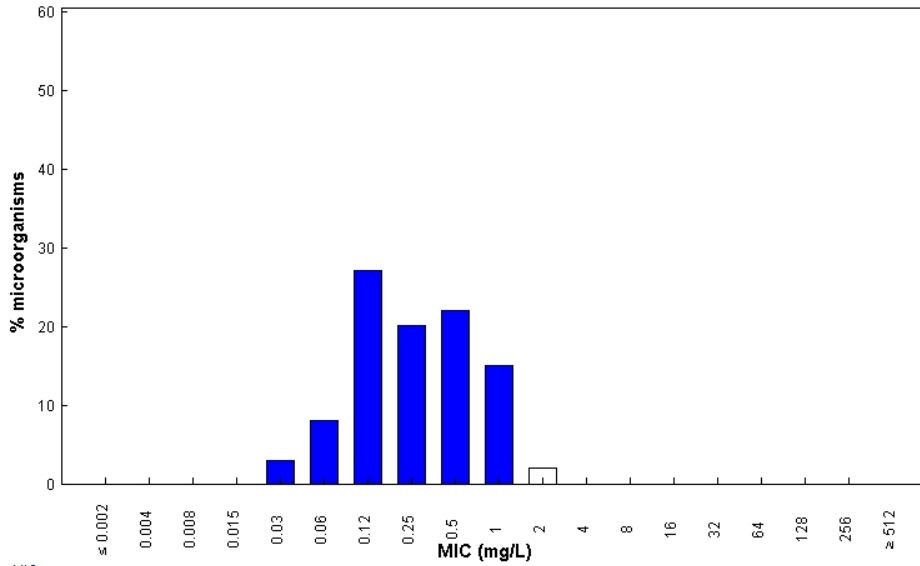
R – resistente

SDD – suscetível dose dependente

A9. Gráficos de distribuição de MIC's provenientes da base de dados EUCAST.

Amphotericin B / *Candida glabrata* EUCAST
International MIC Distribution - Reference Database 2019-10-21

MIC distributions include collated data from multiple sources, geographical areas and time periods and can never be used to infer rates of resistance

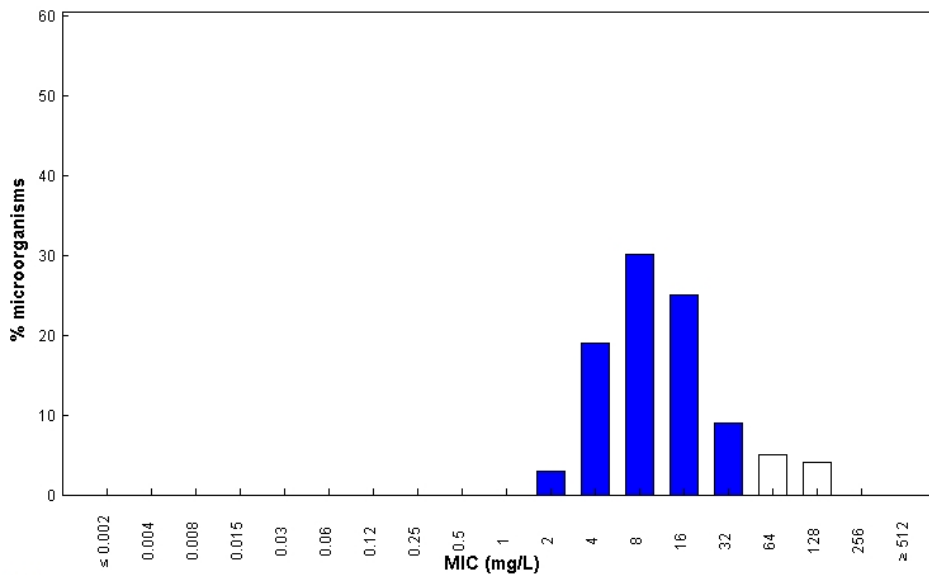


MIC
Epidemiological cut-off (ECOFF): 1 mg/L
Wildtype (WT) organisms: ≤ 1 mg/L

459 observations (10 data sources)

Fluconazole / *Candida glabrata* EUCAST
International MIC Distribution - Reference Database 2019-10-21

MIC distributions include collated data from multiple sources, geographical areas and time periods and can never be used to infer rates of resistance

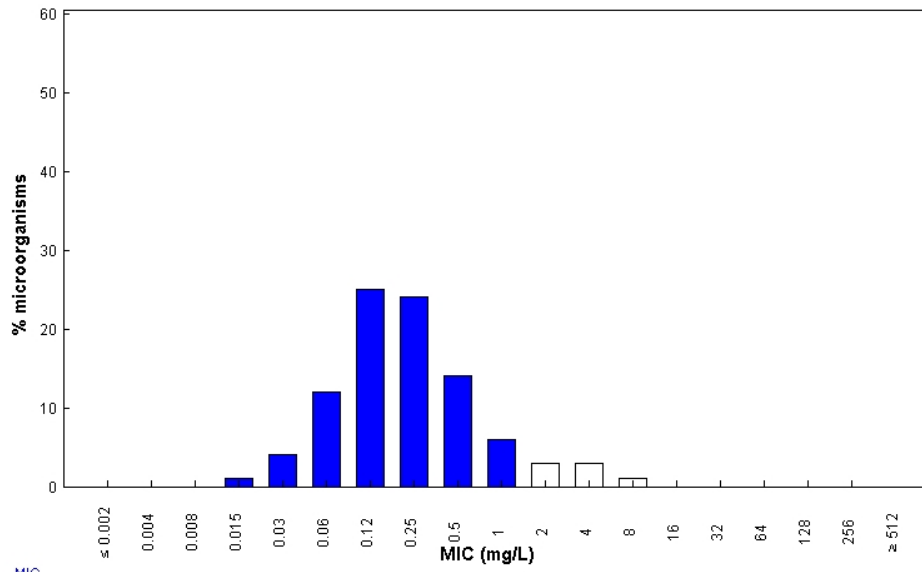


MIC
Epidemiological cut-off (ECOFF): 32 mg/L
Wildtype (WT) organisms: ≤ 32 mg/L

898 observations (12 data sources)

Voriconazole / *Candida glabrata* EUCAST
International MIC Distribution - Reference Database 2019-10-21

MIC distributions include collated data from multiple sources, geographical areas and time periods and can never be used to infer rates of resistance



MIC
Epidemiological cut-off (ECOFF): 1 mg/L
Wildtype (WT) organisms: ≤ 1 mg/L

5907 observations (5 data sources)