



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**EMERGÊNCIA DA INFECÇÃO FÚNGICA NAS UNIDADES DE  
CUIDADOS INTENSIVOS**

Trabalho submetido por  
**Inês Maria Ferreira Jorge**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**novembro de 2017**





**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**EMERGÊNCIA DA INFECÇÃO FÚNGICA NAS UNIDADES DE  
CUIDADOS INTENSIVOS**

Trabalho submetido por  
**Inês Maria Ferreira Jorge**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
Mestre Teresa Nascimento

**novembro de 2017**



## **Agradecimentos**

Aos meus pais. Pelos valores que sempre me inculcaram e fazem de mim a pessoa que sou hoje. Primeiramente quero agradecer-lhes todas as oportunidades que sempre me proporcionaram ao longo da vida, destacando a oportunidade de tirar o curso que desde criança ambicionei. Por nunca, em momento algum duvidarem de mim e por toda a força que sempre me transmitiram nos momentos mais frágeis que passei no decorrer do curso e em especial, na elaboração desta monografia.

Ao meu irmão, que amo mais que tudo e que me deu toda a força possível para que não desistisse e que lutasse pelos meus objetivos.

Ao meu namorado José, que nunca duvidou de mim e me deu muita força nesta etapa da minha vida. Um obrigado nunca será suficiente para lhe agradecer o seu apoio incansável, a todos os níveis.

À minha avó Alice, que apesar da distância sempre me deu força e me lembrou do quanto é importante lutar pelos nossos sonhos, mesmo que para isso tenhamos de batalhar muito.

Às minhas amigas de infância que estiveram presentes nos momentos mais importantes da minha vida, e que nunca duvidaram de mim.

À Cíntia, que sempre se demonstrou disponível e me ajudou em tudo o que conseguiu.

Às minhas amigas de faculdade que me acompanharam em todas as etapas boas e menos boas e me proporcionaram um excelente percurso nestes 5 anos. Sei que posso contar sempre com elas.

Por fim, à minha orientadora um muito obrigado, por toda a ajuda, confiança e disponibilidade, que me permitiram a entrega desta monografia.



## Resumo

As infeções fúngicas invasivas, ocorrendo em menor número que as bacterianas, são responsáveis por taxas de mortalidade e morbidade elevadas, tendo sido observadas a nível dos cuidados hospitalares, em particular nas unidades de cuidados intensivos, onde ganham maior destaque e preocupação. Fatores inerentes a estas unidades, como ventilação mecânica, intervenções cirúrgicas, nutrição parentérica total e tratamento prolongado com antibióticos são algumas das condições predisponentes. *Candida albicans* continua a ser o agente patogénico mais isolado, no entanto tem surgido uma modificação da epidemiologia, que dá agora um maior peso às espécies não-*albicans* face ao demonstrado em décadas anteriores. Para além destas leveduras, fungos filamentosos como *Aspergillus* e *Mucorales* têm sido associados a infeções fúngicas, assim como as leveduras pertencentes ao género *Cryptococcus*. Algumas das dificuldades na gestão do controlo destas infeções passam pela identificação dos agentes etiológicos, pelo que foram desenvolvidos métodos inovadores com base em técnicas moleculares, na deteção de constituintes da parede celular fúngica, entre outros, visto terem melhor sensibilidade e não serem invasivos. No entanto, os métodos tradicionais como a cultura não deixam de ser fundamentais, pelo que continuam a ser usados como método padrão no diagnóstico. Atualmente o tratamento antifúngico é limitado a quatro classes: polienos, azóis, equinocandinas e análogos da pirimidina, contudo têm surgido novas moléculas com resultados promissores nos ensaios clínicos decorrentes. Estas quatro classes podem ainda ser utilizadas noutras abordagens como o tratamento profilático, preventivo e empírico, assim como numa combinação entre si. É importante a implementação das medidas preventivas, pois muitas das infeções ocorrem por falhas técnicas a nível dos dispositivos médicos e dos próprios profissionais de saúde.

**Palavras-chave:** Infeções fúngicas invasivas; Unidades de cuidados intensivos; Diagnóstico, Tratamento



## **Abstract**

Invasive fungal infections, while occurring in less frequency as those of bacterial type, are responsible for high mortality and morbidity rates, being registered at nosocomial level, especially in intensive care units, where they gain notoriety and instigate special care. Inherent to ICU are factors such as mechanical assisted ventilation, surgical interventions, parenteral nutrition and prolonged exposure to antibiotics. *Candida albicans* isolates are still the more prevalent pathological agents, although an epidemiological change is now giving more emphasis to non-*albicans* species than that given in previous decades. In addition to the upper mentioned yeasts, filamentous fungi as *Aspergillus* e *Mucorales* are being associated with fungal infections, so are the yeasts in the *Cryptococcus* genre. Some of the difficulties in the control management of these infections arise from the identification of etiological agents, being developed for that purpose, innovative methods based in molecular techniques, that are used in the detection of fungal cell wall constituents, among other applications, being both more sensitive and non-invasive. In spite of all the above, traditional methods, such as culture based approach, are not to be despised, keep being used as a standard method in diagnosis. These four classes can also be used in other approaches, such as prophylactic treatment, preventive and empirical, as well as in a combination between them. Nowadays, antifungal treatment is limited to four classes: polyenes, azoles, echinocandins, and pyrimidine analogues, although new molecules with promising results in clinical trials on course have been emerging. It is of great importance the implementation of preventive measures, as many of the infections occur due to technical failures of medical equipment as well as from health professionals themselves.

**Keywords:** Invasive fungal infections; Intensive care units; Diagnostic; Treatment



## Índice Geral

Índice de Figuras .....	6
Índice de Tabelas .....	7
Lista de Abreviaturas.....	9
1.Introdução.....	11
2.Fatores de Risco .....	13
3. Etiologia .....	15
3.1 <i>Candida</i> spp .....	15
3.2 <i>Aspergillus</i> spp.....	23
3.3 <i>Mucorales</i> spp.....	28
3.4 <i>Cryptococcus</i> spp .....	32
4.Meios de diagnóstico.....	37
4.1Métodos Convencionais.....	37
4.2Métodos não convencionais .....	40
5.Tratamento Antifúngico .....	48
5.1 Classes terapêuticas dos antifúngicos.....	48
Polienos.....	50
Azóis .....	51
Equinocandinas .....	53
Análogos da pirimidina .....	55
5.2 Resistências adquiridas às várias classes antifúngicas .....	55
5.3 Outras abordagens de tratamento .....	57
5.4Combinação de terapêuticas.....	59
5.5 Opções terapêuticas futuras.....	61
6. Medidas preventivas .....	67
7. Conclusão .....	69
8. Bibliografia.....	71

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Distribuição das espécies de <i>Candida</i> numa UCI em França. ....	18
<b>Figura 2:</b> Mecanismos de patogénese da <i>C. albicans</i> . ....	20
<b>Figura 3:</b> Ciclo da infeção por <i>A. fumigatus</i> . ....	25
<b>Figura 4:</b> Patogénese da mucormicose. ....	30
<b>Figura 5:</b> Incidência da meningite criptocócica a nível global.....	34
<b>Figura 6:</b> Demonstração do teste para a deteção do antígeno criptocócico.....	44
<b>Figura 7:</b> Descoberta de novos antifúngicos. ....	48
<b>Figura 8:</b> Diferentes classes terapêuticas e respetivos alvos.. ....	49
<b>Figura 9:</b> Cronologia entre diagnóstico e tratamento nas IFI. ....	59

## Índice de Tabelas

Tabela 1:Fatores de risco das infecções fúngicas nas UCI .	13
Tabela 2:Fatores de risco para aquisição de IFI e respetiva pontuação.....	14
Tabela 3:Espécies de <i>Candida</i> potencialmente patogénicas .....	16
Tabela 4: Fatores predisponentes de infeção das <i>Candida</i> não <i>albicans</i> .....	17
Tabela 5:Fatores de risco para candidíase invasiva em adultos e prematuros.....	22
Tabela 6:Fatores de risco em pacientes das UCI.....	27
Tabela 7:Localização da infeção e fatores predisponentes.....	31
Tabela 8:Propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos vários azóis .....	53
Tabela 9:Propriedades farmacocinéticas das equinocandinas. ....	54
Tabela 10:Espécies fúngicas e respetivas resistências aos fármacos..	57
Tabela 11:Fármacos em desenvolvimento para as infecções fúngicas. ....	65



## **Lista de Abreviaturas**

**ABPA:** Aspergilose Broncopulmonar alérgica

**AmB:** Anfotericina B

**AI:** Aspergilose Invasiva

**API:** Aspergilose Pulmonar Invasiva

**CI:** Candidíase Invasiva

**CMI:** Concentração Mínima inibitória

**CVC:** Cateter Venoso Central

**DGS:** Direção Geral de Saúde

**DPOC:** Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica

**EORTC/MSG:** *European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group*

**FDA:** *Food and Drug Administration*

**FLC:** Fluconazol

**GPI:** Glicosilfosfatidilinositol

**GXM:** glucuronoxilomanano

**GXMGal:** glucuronoxilomanogalactano

**HEPA:** High Efficiency Particulate Arrestance

**IDSA:** *Infectious Diseases Society of America*

**IFI:** Infeção Fúngica Invasiva

**IN:** Infeção Nosocomial

**KOH:** Hidróxido de Potássio

**LBA:** Lavado broncoalveolar

**LFD:** *Lateral Flow Device*

**LLA:** leucemia linfoblástica aguda

**LMA:** leucemia mieloide aguda

**MALDI-TOF:** *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight*

**OMS:** Organização Mundial de Saúde

**PCR:** *Polimerase Chain Reaction*

**PNA-FISH:** *Peptide Nucleic Acid Fluorescence in situ Hybridization*

**POCT:** *point of care testing*

**PRRs:** *pattern recognition receptors*

**SIDA:** Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

**SNC:** Sistema Nervoso Central

**TC:** Tomografia Computorizada

**TLRs-** *Toll-like receptors*

**UCI:** Unidade de Cuidados Intensivos

**UCIN:** Unidade de Cuidados Intensivos Neonatais

## 1.Introdução

As infecções nosocomiais (IN) ou “infecções adquiridas nos cuidados de saúde” sempre foram um problema para a saúde pública, porém nos últimos anos, estas têm assumido um papel mais relevante. Entende-se por IN, as infecções que podem ser locais ou sistêmicas que resultam de uma reação adversa na presença de um agente infeccioso ou das suas toxinas, que não existiam nem se encontravam em incubação no momento de admissão nas unidades de cuidados de saúde (Ducel, Fabry, & Nicolle, 2002). Os avanços tecnológicos a nível da Medicina trouxeram grandes benefícios como o aumento da sobrevivência dos pacientes, mas consequentemente uma maior incidência de infecções oportunistas fúngicas (Paramythiotou, Frantzeskaki, Flevari, Armaganidis, & Dimopoulos, 2014).

As IN representam um problema de saúde pública global, na medida em que atingem um número elevado de indivíduos e estão associadas a taxas elevadas de mortalidade e morbidade. Para além disso compreendem um elevado encargo financeiro, especialmente pelo aumento de recursos hospitalares como o prolongamento do tempo de hospitalização, testes de diagnóstico complementares, medicamentos utilizados e tempo dos profissionais de saúde despendido (Direção Geral de Saúde, 2003).

São vários os microrganismos responsáveis pelas IN, tais como as bactérias, os vírus e os fungos. É nestes últimos que me vou focar, na medida em que as infecções fúngicas têm ganho um maior destaque, especialmente nas unidades de cuidados intensivos (UCI). Apesar de as infecções fúngicas serem menos frequentes que as bacterianas, estão associadas a uma mortalidade elevada sendo de extrema importância o estudo aprofundado das mesmas (Garbee, Pierce, & Manning, 2017).

O número de espécies fúngicas ronda cerca de 1,5 milhões, mas somente 300 são consideradas patogénicas e causadoras de doença. Estas podem ocorrer quando há exposição a fontes contaminantes presentes no ar e superfícies. As infecções fúngicas nosocomiais apresentam uma origem oportunista. O que pode diferenciar é o seu envolvimento, podendo ser local ou invasivo, que é determinado pelo estado imunitário do hospedeiro. Se se tratar de um indivíduo imunocompetente, o seu sistema imunitário está ativo pelo que permite a sua defesa aquando a invasão. Contrariamente se houver

algum compromisso da imunidade, o indivíduo tem predisposição para contrair infecção fúngica invasiva (IFI) (Raquel Sabino & Martins, sd).

O aumento da ocorrência das infecções fúngicas a nível dos cuidados hospitalares deve-se a falhas pré-existentes nestes como condições subótimas do ambiente hospitalar, produtos médicos contaminados, transmissão através mãos dos profissionais de saúde e maior recorrência de processos invasivos. Os indivíduos que se encontram nas UCI são ainda mais suscetíveis devido ao seu estado clínico subjacente e menores defesas adquiridas por tempo de hospitalização prolongada, falha das suas barreiras naturais e tratamentos prolongados com antibióticos (Benedict, Richardson, Vallabhaneni, Jackson, & Chiller, 2017; Paramythiotou et al., 2014).

Face à enorme incidência de IFI e problemáticas associadas, a *European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group* (EORTC/MSG) implementou e definiu um método padrão para a classificação das IFI, de forma a tornar os estudos clínicos de igual reprodutibilidade e consistência. Estas podem ser classificadas em prováveis, possíveis e provadas. Os parâmetros que se têm em conta são os fatores clínicos, microbiológicos e inerentes ao hospedeiro. Uma infecção é denominada provável quando há a presença de fatores de risco, características clínicas e evidências micológicas; por outro lado, a presença de elementos fúngicos na cultura ou nos tecidos lesionados é considerada uma infecção provada. Por sua vez, uma infecção é denominada de possível quando há a presença de fator clínico e fator de hospedeiro, sem a presença de evidências micológicas (Pauw et al., 2008).

Outra medida importante e que deve ser reforçada é o controlo da vigilância epidemiológica das IFI a nível global, pois nem todos os países têm em vigor esta metodologia. Este controlo é crucial e pode revelar-se importante a nível da caracterização dos pacientes de risco e nas áreas críticas hospitalares, para que sejam adotadas as melhores estratégias com o objetivo de diminuir as falhas existentes nos programas de controlo de infeção, e com isso a diminuição das IFI (Direção Geral de Saúde, 2003)

## 2.Fatores de Risco

Existem inúmeros fatores que podem potencializar a aquisição de infecções oportunistas nas unidades de cuidados intensivos. Geralmente os doentes das UCI são pacientes mais suscetíveis ao desenvolvimento de complicações devido às seguintes condições: colocação de dispositivos invasivos; processos de monitorização, as próprias doenças subjacentes e até a contaminação cruzada que pode ocorrer com outros pacientes ou com os profissionais de saúde. A tabela seguinte (Tabela 1) representa os fatores de risco de adquirir IFI nas UCI pelos indivíduos com determinadas condições clínicas.

**Tabela 1:** Fatores de risco das infecções fúngicas nas UCI (Adaptado de Kerwat, Rolfes, & Wulf, 2011).

Pacientes adultos	Recetores de transplante de órgãos sólidos	Pacientes com neoplasias
Colonização por <i>Candida</i>	Infeção por Citomegalovírus	Quimioterapia recente
Diabetes <i>mellitus</i>	Medicação imunossupressora	Neutropenia: duração e gravidade
Insuficiência Renal	Corticosteroides	Danos na mucosa
Hemodiálise	Receção de mais de um órgão	Infeção vírica concomitante
Pancreatite	Rejeição crónica ou aguda	<b>Recetores de transplantes de células hematopoiéticas</b>
Pontuação APACHE II elevada	Idade avançada do doador	
Ventilação mecânica prolongada		Histórico de infeção fúngica invasiva
Cateter venoso central ou urinário		Atraso no enxerto
Internamento prolongado nas UCI		Doença subjacente
Antibacterianos com amplo espectro de ação		
Nutrição parentérica total		
Intervenção cirúrgica		
Queimaduras		

**Legenda:** APACHE II: *Acute Physiology And Chronic Health Evaluation*

De forma a identificar quais os fatores característicos das UCI para a aquisição de IFI foi desenvolvido por Liao, Zhong, Xu, & Li (2013) um sistema que classifica os doentes em três níveis de risco, conforme a presença dos sete parâmetros definidos. Os fatores de risco e as pontuações correspondentes estão apresentadas em seguida (Tabela 2). Este

sistema pode ser bastante útil e ajudar na decisão clínica para o início da terapia profilática/ empírica.

**Tabela 2:**Fatores de risco para aquisição de IFI e respetiva pontuação. (Adaptado de Liao, Zhong, Xu, & Li, 2013).

Fator de Risco	Pontuação	Níveis Risco
Diabetes <i>Mellitus</i>	5	Baixo $\leq 8$
Cirurgia gastrointestinal	5	
Neoplasias hematológicas	4	Médio 9-13
Antibióticos amplo espectro (> 4dias)	4	
Cateter venoso central	3	Alto $\geq 14$
Nutrição parentérica total	3	
Ventilação mecânica (<2dias)	2	
	Total: 26	

### 3. Etiologia

As infecções fúngicas podem ser classificadas em dois grupos, consoante o local de origem do organismo, que pode ser intrínseca (próprio hospedeiro) ou extrínseca (meio ambiente).

Algumas das espécies fúngicas fazem parte da flora comensal dos hospedeiros como é o caso das leveduras *Candida* e *Malassezia furfur*. Por outro lado, existem fungos que são isolados a partir do meio ambiente, como é o caso das leveduras *Cryptococcus*, dos fungos dimórficos e dos fungos filamentosos *Aspergillus* e *Mucorales* (Casadevall & Pirofski, 2004). Neste trabalho vou concentrar-me nos géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* e *Mucorales* visto serem todos fungos oportunistas e isolados frequentemente nas UCI (Paramythiotou et al., 2014).

#### 3.1 *Candida* spp

As espécies do género *Candida*, taxonomicamente fazem parte da Filo *Ascomycetes*, da Classe *Blastomycetes*, da Família *Cryptococcaceae*. Estas estão amplamente distribuídas, podendo ser encontradas no solo, em alimentos e na água. Têm a capacidade de degradar proteínas e carboidratos de forma a obter carbono e nitrogénio, que são cruciais para o seu desenvolvimento. Para além disso têm a capacidade de se reproduzirem de forma sexual ou assexual (através dos conídios), assim como de adaptação podendo habitar em ambientes com oxigénio ou em situações de anaerobiose (Giolo & Svidzinski, 2010).

Relativamente à sua morfologia, as espécies de *Candida* são leveduras unicelulares de forma oval, elíptica ou cilíndrica, cujo tamanho varia entre 3-5 µm (López-Martínez, 2010).

O género *Candida* abrange bastantes espécies, cerca de 150, que se caracterizam como comensais ou patogénicas. Destas, 15 têm um papel infeccioso e encontram-se identificadas na Tabela 3. Por sua vez, destas 15 espécies, há 5 que se destacam por serem as mais comuns nas infecções fúngicas e são as seguintes: *Candida albicans*, complexo *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, complexo *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*

(Colombo, de Almeida Júnior, Slavin, Chen, & Sorrell, 2017; Yapar, 2014). Para além das espécies anteriormente mencionadas surgiu uma nova espécie : *C. auris* que foi isolada pela primeira vez em 2009 e que se tem revelado muito patogénica e multirresistente (Lockhart et al., 2017).

**Tabela 3:** Espécies de *Candida* potencialmente patogénicas (Adaptado de Yapar, 2014).

<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida lusitanae</i>	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Candida kefyr</i>
<i>Candida lipolytica</i>	<i>Candida famata</i>	<i>Candida inconspicua</i>	<i>Candida rugosa</i>	<i>Candida norvegensis</i>

- Epidemiologia

O género *Candida* é o principal responsável pelas IFI, em especial nas UCI, sendo que *C. albicans* é a espécie mais isolada, representando cerca de 40-60% dos casos (Epelbaum & Chasan, 2017). Atualmente, *C. albicans* é a nível global, a causa maioritária de candidemia, porém tem sofrido um decréscimo para as espécies não-*albicans* que têm vindo a aumentar progressivamente. Esta crescente modificação na epidemiologia da *Candida* deve-se, em parte, ao recurso de azóis (especialmente ao fluconazol) quer em profilaxia, quer em tratamento. Sem esquecer que a distribuição geográfica e ambiental, a condição médica subjacente, o tipo de paciente, a exposição a agentes antimicrobianos e a própria instituição hospitalar têm um papel determinante nestas modificações (Bassetti et al., 2017; Raquel Sabino & Martins, 2016).

A distribuição epidemiológica de *Candida* não é uniforme, havendo alterações consoante as diversas áreas geográficas. A nível europeu, *C. albicans* varia entre 47-100%, enquanto que na América do Norte e Sul entre 40-69,2%. Por sua vez, na Ásia são as espécies não-*albicans* que apresentam maior incidência com uma média de 75% dos casos. Na Austrália não há discrepância entre as espécies *albicans* e não-*albicans*, estando distribuídas de forma semelhante (Caggiano et al., 2017). Esta distribuição das várias espécies de *Candida* é muito importante, na medida em que estas, podem sugerir diferentes abordagens a nível de tratamento, visto que há diferentes perfis de suscetibilidade (Kullberg & Arendrup, 2015).

Dentro das espécies não-*albicans*, as três mais frequentes são: complexo *C. parapsilosis*, complexo *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Estas três espécies em especial estão muito correlacionadas com o tipo de paciente e patologia subjacente. Em norma, a *C. parapsilosis* está associada a infeções em recém-nascidos e crianças, em recetores de transplantes e em pacientes que recebem nutrição parentérica; por sua vez a *C. glabrata* é a principal responsável pela doença nos idosos e em indivíduos neoplásicos. Por sua vez, a *C. tropicalis* está relacionada com indivíduos neutropénicos e com leucemia (Yapar, 2014). Os fatores predisponentes de infeção das *Candida* não-*albicans* estão detalhados na Tabela 4.

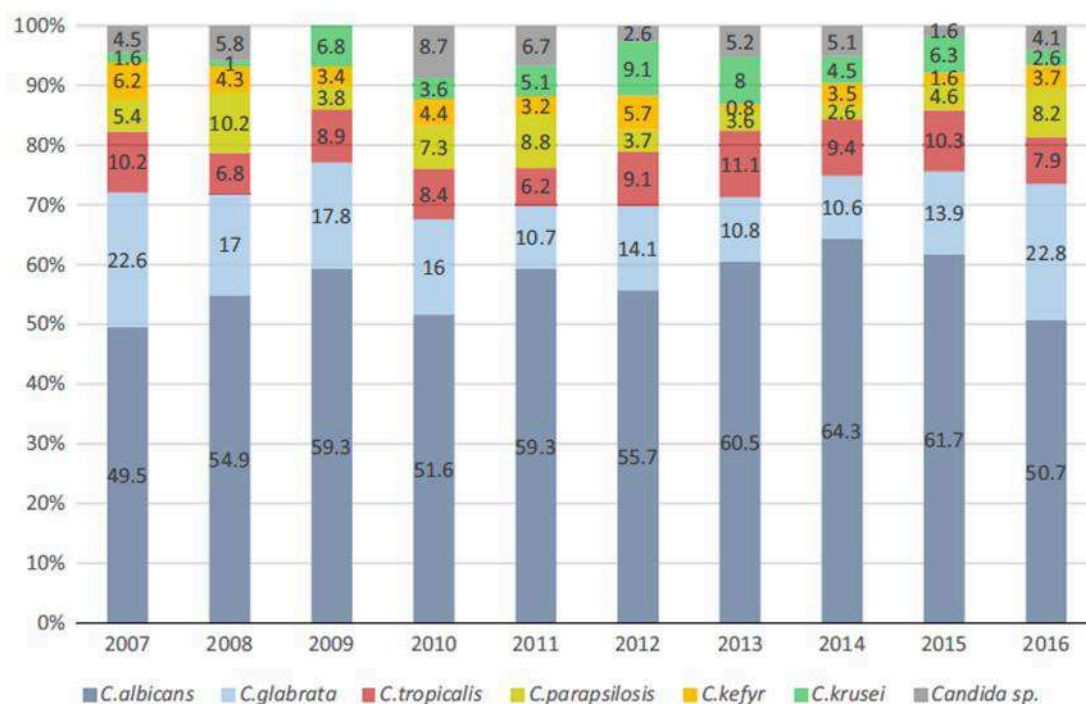
**Tabela 4:** Fatores predisponentes de infeção das *Candida* não *albicans* (Adaptado de Paramythiotou et al, 2014).

<i>C. glabrata</i>	Mais comum em pacientes idosos Variação geográfica Associados a antibióticos específicos (piperacilina/tazobactam, vancomicina) Comum em pacientes com nutrição parentérica total e cateter venoso central Transplante de órgãos sólidos Exposição ao fluconazol
<i>C. parapsilosis</i>	Surtos nosocomiais (hospitalares) Formação de biofilmes nos cateteres venosos centrais Dispositivos implantados Nutrição Parentérica Total Menos suscetível a equinocandinas Mais comum em crianças
<i>C. tropicalis</i>	Neutropenia Neoplasias malignas hematológicas
<i>C. krusei</i>	Utilização de piperacilina/tazobactam, vancomicina Resistência inata ao fluconazol Doenças hematológicas Neutropenia Cirurgia gastrointestinal recente Exposição ao fluconazol
<i>C. guilliermondii</i>	Cateteres intravasculares Recetores de medula óssea

A candidemia é a forma mais comum das infeções provocadas por *Candida*, pelo que o estudo da sua incidência é importante. Esta foi estudada e analisada na população em geral, nos vários setores dos cuidados hospitalares e em diversas áreas geográficas do

mundo. As razões dadas para a existência de tanta variabilidade entre os estudos consistem essencialmente nas áreas geográficas estudadas, população abordada, recursos hospitalares, programas de treino, a altura em que o estudo decorreu e as metodologias adotadas (Pfaller & Diekema, 2007). A nível das UCI a candidíase invasiva (CI) é a forma mais predominante. A taxa de incidência nas UCI é cerca de 5-10 vezes superior quando comparada com os serviços médicos e cirúrgicos (Schmiedel & Zimmerli, 2016).

De acordo com um estudo de 10 anos realizado em França, numa UCI, que decorreu entre 2007 e 2016, conclui-se que o género *Candida* foi o mais isolado como esperado. Das 244 infeções registadas, 44% eram infeções intra-abdominais e 22% eram candidemias, sendo que esta última apresentou uma incidência de 4,49 por 1000 admissões hospitalares (Sasso et al., 2017).



**Figura 1:** Distribuição das espécies de *Candida* numa UCI em França (Adaptado de Sasso et al., 2017).

Como se pode observar na Figura 1, *C. albicans* continua a ser a espécie mais isolada, no entanto, as *Candida* não-*albicans* têm ganho maior destaque. Esta alteração da epidemiologia das infeções por *Candida* é atribuída em parte ao uso disseminado de fluconazol na profilaxia e tratamento (Raquel Sabino & Martins, s.d.).

O cenário numa Unidade de Cuidados Intensivos Neonatais (UCIN) não é muito diferente dos resultados encontrados nas outras UCI. Num estudo realizado por Caggiano et al., (2017) numa UCIN durante 9 anos em Itália onde estudaram a epidemiologia de *Candida*, concluíram que a incidência das candidemias era de 3 em cada 100 admissões. A espécie mais isolada foi a *C. parapsilosis* o que vai ao encontro de esta ser a espécie mais prevalente em recém-nascidos e crianças, como referido anteriormente. Os resultados deste estudo apresentam uma incidência de 3%, que é superior aos estudos realizados na Europa (1,1-1,3%), mas inferior aos resultados da Ásia (4-7,7%).

Em Portugal os estudos são muito escassos visto que não há obrigatoriedade em notificar, não existindo dados organizados acerca da epidemiologia das IFI (Raquel Sabino & Martins, s.d). Num estudo realizado em Portugal durante 6 anos num hospital oncológico verificou-se que os pacientes com tumores de órgãos sólidos ou com doenças hematológicas têm predisposição para candidemia. Durante o período de estudo, dos 421 pacientes oncológicos, 110 (26,1%) apresentaram culturas positivas para estas leveduras (*Candida*), aliadas a sintomas e sinais clínicos, sendo diagnosticados com candidemia (R. Sabino et al., 2010). Mais recentemente, foi realizado o primeiro estudo multicêntrico, que se propôs a estudar a epidemiologia das fungemias em 10 hospitais distritais portugueses. Dos 240 episódios relatados, 40% dos isolados correspondem a *C. albicans*, sendo a espécie maioritária, como na maioria dos estudos europeus. No entanto, a segunda mais isolada é *C. glabrata*, contrariamente à *C. parapsilosis*, identificada nos estudos europeus. A candidemia apresenta assim uma incidência de 2,19 por 100000 habitantes, sendo estes resultados semelhantes aos estudos realizados no Norte da Europa (Finlândia e Noruega) que apresentam uma incidência de 3-5 episódios por 100000 habitantes (Faria-Ramos et al., 2014; R. Sabino et al., 2017).

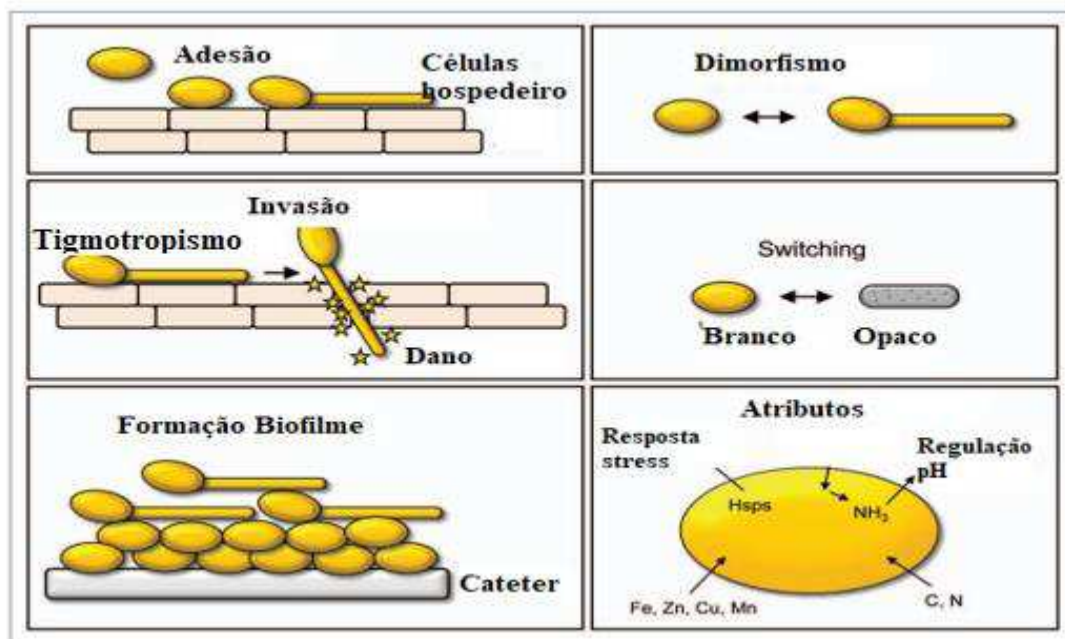
- Patogénese e fatores de virulência

As espécies de *Candida* fazem parte do microbioma humano, pelo que podem ser encontradas em vários locais como a pele, trato geniturinário e trato gastrointestinal. Quando ocorrem perturbações a nível da pele ou mucosas, associadas a um aumento da carga fúngica, é provável que ocorra infeção (McCarty & Pappas, 2016).

É através dos fatores de virulência e dos atributos de aptidão que os fungos conseguem infetar o hospedeiro. A expressão destes fatores de virulência varia consoante a espécie,

o local e estadio da infecção, o tipo de infecção assim como a resposta do hospedeiro (Deorukhkar, Saini, & Mathew, 2014).

Os principais mecanismos que a *C. albicans* utiliza são o dimorfismo, a expressão de adesinas, o tigmotropismo, a formação de biofilmes, a variação (“switching”) fenotípica e a secreção de enzimas hidrolíticas. Para além disso, a resposta ao stress, a regulação do pH, a aquisição de metais e a adaptação metabólica também têm um papel crucial na virulência do fungo, como ilustrado na Figura 2.



**Figura 2:**Mecanismos de patogênese da *C. albicans*. (Retirado e adaptado de Mayer, Wilson, & Hube, 2013)

*C. albicans* é a única espécie do género *Candida* que tem a vantagem de ser polimórfica, pelo que pode alternar a sua morfologia entre uma levedura unicelular ou sob a forma filamentosa, com hifas ou pseudo-hifas. Geralmente a forma filamentosa é mais patogénica que a levedura. Podem ainda diferir quanto à cor, sendo que se encontram brancas e durante o “switching” tornam-se opacas. O pH é um fator que influencia a forma do fungo. Geralmente se o pH for baixo (<6) o fungo cresce como levedura e se for alcalino (>7), o fungo cresce como hifa. Para além do pH, a presença de CO<sub>2</sub> e a temperatura fisiológica promovem o crescimento na forma de hifa (Mayer, Wilson, & Hube, 2013).

Quando ocorre adesão às células do hospedeiro, dá-se a formação de biofilmes que são determinantes para o início do processo de colonização ou doença (Hall-Stoodley, Costerton, & Stoodley, 2004). Estes podem ser encontrados no Homem, nas mucosas assim como em superfícies artificiais, como cateteres, válvulas, próteses dentárias e dispositivos médicos. Um bom exemplo é o caso da *C. parapsilosis* que é capaz de sobreviver até 14 dias nas superfícies de bancadas, o que pode ser um importante fator para a sua transmissão, caso não ocorra uma correta limpeza e desinfecção (Sabino & Martins, s.d.).

Outro mecanismo é a expressão de proteínas pelo fungo que conseguem aderir e penetrar nas células do hospedeiro. Por norma, utilizam como meio a endocitose induzida ou a penetração ativa, por intermédio de proteínas aspárticas, por exemplo. Geralmente após a adesão e crescimento das hifas, estas segregam hidrolases que vão auxiliar na penetração ativa, sendo elas de três tipos diferentes como as lípases, fosfolípases e proteinases, assim como na obtenção de nutrientes a nível extracelular (Mayer et al., 2013). As enzimas fosfolípases são um dos principais mecanismos de virulência, pois estas têm a capacidade de provocar a lise das células do hospedeiro, através da dissolução dos fosfolípidos das membranas celulares, tornando a posterior adesão e penetração mais fácil do fungo. Por sua vez, as proteinases conseguem degradar as proteínas (albumina, queratina) e provocam uma degradação local, permitindo a penetração (Lahkar, Saikia, Patgiri, Nath, & Das, s.d.).

O tigmotropismo é uma adaptação ambiental que desencadeia o crescimento de hifas e formação de biofilmes, aquando o contacto com uma superfície. As células de levedura passam a hifas, quando entram em contacto com uma superfície. Em superfícies com determinada morfologia, o crescimento da hifa ocorre de forma direcional. Este mecanismo é importante na patogenicidade do fungo, quer pela formação de biofilmes em superfícies artificiais ou pelo crescimento de hifas, causando danos a nível celular (Mayer et al., 2013).

Outros atributos de *Candida* e que implicam patogenicidade são a sua capacidade de resposta ao stress ambiental, através de proteínas de choque térmico; a regulação do pH, a captação de metais em especial, o Fe, Zn, Cu e Mn, que são importantes para a sobrevivência dos fungos e a captação de aminoácidos que promovem a autoindução da formação das hifas, pela alcalinização extracelular (Mayer et al., 2013).

- Fatores de Risco

São vários os fatores de risco predisponentes para as infecções por *Candida*. Independentemente dos fatores intrínsecos do hospedeiro, existem muitos fatores relacionados com os cuidados de saúde. Dentro dos fatores relacionados com os serviços prestados nos cuidados hospitalares, a nutrição parentérica total, o uso de cateteres, intervenções cirúrgicas (especialmente a nível abdominal) e o uso de antibióticos de amplo espectro constituem os principais problemas. Por sua vez, as próprias condições dos pacientes também podem ser predisponentes para que as infecções ocorram como a idade, o uso de agentes imunossupressores, neutropenia e a gravidade da sua condição clínica subjacente (Yapar, 2014). Na tabela 5 estão representados mais fatores de risco para as infecções por *Candida*.

**Tabela 5:** Fatores de risco para candidíase invasiva em adultos e prematuros. Adaptado de (Yapar, 2014)

Antibióticos de amplo espectro	Queimaduras	Índice de colonização por <i>Candida</i>	Cateter Venoso Central/Urinário	Quimioterapia
Corticosteroides	Diabetes <i>mellitus</i>	Transplante de células estaminais	Hemodiálise	APACHE II >20
Terapias Imunossupressoras	Insuficiência Renal	Cirurgia <i>major</i>	Insuficiência Hepática	Neutropenia
Pancreatite necrosante	Ventilação mecânica	Hospitalização prolongada UCI	Transplante de órgãos sólidos	Nutrição Parentérica Total
Prematuridade	Malformações congénitas	Baixo peso à nascença	Score baixo APGAR	Doenças Hematológicas

**Legenda:** APACHE II: *Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II*; APGAR: *American Pediatric Gross Assessment*

Dos fatores de risco anteriormente descritos, a hospitalização prolongada nas UCI continua a ser um fator *major*, pois está associado a muitas intervenções invasivas assim como à colonização.

- Manifestações clínicas

O termo candidose engloba um vasto portefólio de doenças, que vão desde as mais simples às mais severas. Nomeadamente, poderá variar entre uma candidíase da orofaringe ou do esófago até infeções da corrente sanguínea e candidíase disseminada (Yapar, 2014).

O termo CI engloba uma vasta gama de doenças como candidemia, endocardite, meningite, endoftalmite e candidíase disseminada (Pappas, 2006).

A candidemia representa a principal forma de CI, sendo responsável pela maioria dos casos e está implicada na *sepsis* por *Candida*. A nível endovascular pode ocorrer endocardite infecciosa estando relacionada com o implante de dispositivos intracardíacos. É também comum a ocorrência de complicações a nível ocular como a endoftalmite. O compromisso do fígado e baço também pode ocorrer por infeções com *Candida*, aquando o tratamento com quimioterapia mieloblátiva. Podem ainda ocorrer infeções menos comuns como meningite, artrite séptica e pneumonia (McCarty & Pappas, 2016).

### **3.2 *Aspergillus* spp**

*Aspergillus* é um género composto por fungos filamentosos que se caracteriza por ser ubiqüitário e saprófita tendo uma importante ação a nível da reciclagem do carbono e do nitrogénio (Dagenais & Keller, 2009).

Estão descritas mais de 250 espécies de *Aspergillus*, que consoante a sua morfologia, metabolismo e forma molecular estão agrupadas em diversos complexos (secções e subgéneros). Os oito subgéneros são os seguintes : *Aspergillus*, *Fumigati*, *Circumdati*, *Candidi*, *Terrei*, *Warcupi*, *Ornati* e *Nidulantes* (Lass-Flörl & Cuenca-Estrella, 2017). Esta classificação é muito importante e crucial, porque as espécies pertencendo ao mesmo complexo, têm entre si um comportamento muito diferenciado, o que poderá influenciar a suscetibilidade aos antifúngicos que iremos ver posteriormente esclarecido (Raquel Sabino & Martins, s.d). Destas 250 espécies, sensivelmente 40 causam doenças humanas. As espécies com maior interesse são *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* e *A. niger*, sendo

responsáveis pela maioria das infecções invasivas (Klich, 2009; Lass-Flörl & Cuenca-Estrella, 2017; Sabino & Martins, sd).

*Aspergillus* pode ser encontrado em vários locais como na poeira, sistemas de ventilação de ar e água, alimentos, plantas e em alguns equipamentos que se encontram nas UCI. No entanto, é de salientar que é difícil distinguir entre a colonização e infecção quando o fungo é isolado a partir do paciente (Bassetti & Bouza, 2017).

- Epidemiologia

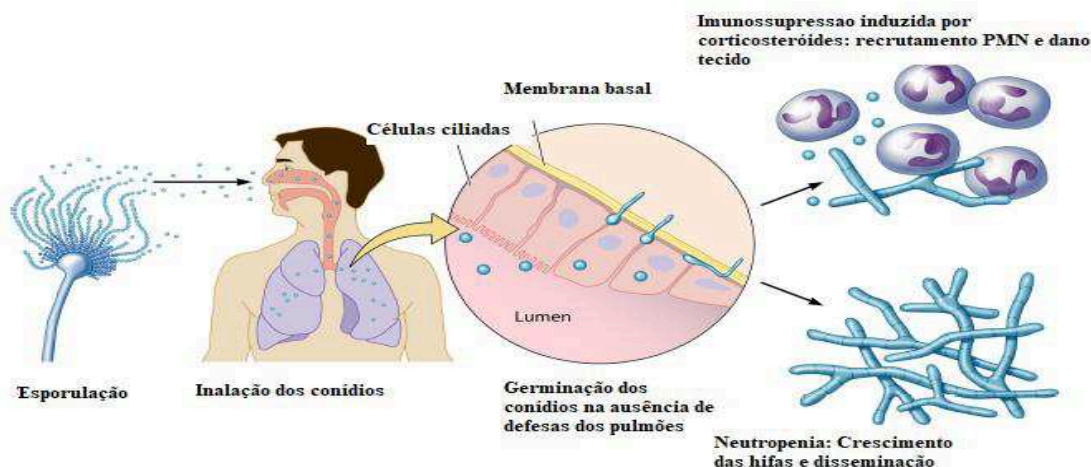
Em Portugal, a incidência de aspergilose invasiva (AI) é relativamente inferior quando comparada com outros estudos europeus, sendo semelhante aos resultados encontrados em Espanha e na República Checa. Estima-se que ocorram cerca de 240 episódios de AI por ano, sendo que as condições predisponentes são a doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), o cancro do pulmão e os transplantes de células hematopoiéticas e de órgãos sólidos, com a ocorrência de 83, 92 e 65 episódios, respetivamente (R. Sabino et al., 2017).

- Patogénese e fatores de virulência

Os esporos de *Aspergillus* que se encontram presentes no ar e que podem ser inalados entre 100-1000/dia têm a capacidade de atingir os alvéolos pulmonares devido ao seu reduzido tamanho (cerca de 2-3  $\mu\text{m}$ ) (van de Veerdonk, Gresnigt, Romani, Netea, & Latgé, 2017). No entanto, podem ainda assim não causar doença, caso sejam inalados por indivíduos saudáveis, cujo sistema imunitário está a funcionar corretamente. Por sua vez, se estes chegarem a ser inalados por indivíduos que por algum motivo têm o seu sistema imunológico enfraquecido, quer por alergias ou algum problema a nível dos pulmões (asma e fibrose cística) podem desenvolver doenças (Dagenais & Keller, 2009). A Figura 3 representa o ciclo de infecção por *A. fumigatus*.

Os fungos desenvolvem meios de adaptação aos vários ambientes a que se encontram sujeitos. Têm a capacidade de causar virulência e infecção nos hospedeiros através de vários mecanismos adotados. Algumas das características adquiridas pelo *A. fumigatus* passam pela termotolerância, sendo capazes de sobreviver até aos 50°C. Para além disso têm a capacidade de produzir micotoxinas, com destaque para a gliotoxina que tem atividade imunossupressora, inibindo a resposta imune do hospedeiro. O pigmento

melanina presente na superfície dos conídios também lhes proporciona proteção contra a luz UV, espécies reativas ao oxigênio, temperaturas elevadas e impede a lise (Boral, Metin, Dögen, Seyedmousavi, & Ilkit, 2017).



**Figura 3:** Ciclo da infecção por *A. fumigatus* (Adaptado de (Dagenais & Keller, 2009).

**Legenda:** A inalação de conídios por indivíduos imunocomprometidos, leva à sua implementação nos pulmões e posterior germinação. Em caso de deficiência de PMN (polimorfonucleares), pela toma de corticosteroides, ocorre dano a nível dos tecidos; em casos de neutropenia ocorre crescimento abrupto das hifas e disseminação pelo organismo.

- Fatores de risco

Existem inúmeros fatores relacionados com o hospedeiro que se consideram de risco na aquisição de infecções fúngicas invasivas, que foram descritos pela EORTC/MSG. Alguns dos fatores contemplados passam pela neutropenia, uso continuado de corticosteroides, tratamento com imunossupressores entre outros. No entanto, para a Aspergilose Pulmonar Invasiva (API) existem certos critérios adicionais que se revelam predisponentes para a aquisição da doença, tais como a DPOC, asma, neoplasias hematológicas como a leucemia mieloide aguda (LMA) ou leucemia linfoblástica aguda (LLA), síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), recetores de transplantes de órgãos sólidos e cirrose (Koulenti, Garnacho-Montero, & Blot, 2014).

Nas UCI o fator maioritário para a API é a DPOC em 50% dos casos, seguido dos transplantes de órgãos sólidos. Geralmente nos pacientes com DPOC, a colonização com *Aspergillus* é de 16,3 em cada 1000 admissões hospitalares (Guinea et al., 2010). Outros fatores externos que se revelaram importantes no desenvolvimento de API são os

trabalhos quer de construção, remodelação ou demolição nos hospitais e no meio ambiente geral, sendo uma fonte bastante provável dos surtos de aspergilose (Pemán & Salavert, 2013b)

Independentemente dos fatores de risco anteriormente descritos, pensa-se que existe predisposição genética para o desenvolvimento de API, em recetores de transplante de medula óssea. Existe um número muito limitado de recetores que estão implicados na gestão da resposta imune inata aos fungos. Estes são recetores de reconhecimento de padrões (PRRs, *pattern recognition receptors*), que permitem um aumento ou diminuição das reações inflamatórias de forma a evitarem a infeção no hospedeiro. Dentro dos PRRs, os *toll-like receptor* (TLRs), expressos na superfície dos macrófagos residentes e neutrófilos, destacam-se os TLR2, TLR4 e TLR9, no caso de *Aspergillus fumigatus*. A sinalização de TLR2 e TLR4 nas células polimorfonucleares (PMN), incita à ativação de diferentes vias que estão associadas a diferentes perfis de clearance e inflamação. Contrariamente, *A. fumigatus* consegue reverter a resposta inflamatória do hospedeiro, pela redução das respostas pro-inflamatórias mediadas pelos recetores TLR2 e TLR4. Dessa forma facilita a invasão, dada a sua atividade imunossupressora. Assim, os polimorfismos existentes nestes recetores podem modificar a suscetibilidade que os indivíduos têm para a aquisição de infeção. O recetor mais estudado foi o TLR4 que demonstrou apresentar duas mutações *missense* (D299G e T399I) que comprometem a correta ligação ao TLR4, tornando os indivíduos suscetíveis a reações sistémicas e bloqueio da via aérea, propícios ao desenvolvimento de API (Bochud et al., 2009; Cunha et al., 2011).

Num outro estudo Cunha et al., (2014) demonstraram a importância de pentraxina 3 (PTX3), um PRR, que é produzido pelos fagócitos e células dendríticas, em locais de inflamação e lesão. Apresenta, desta forma, um papel determinante na modulação das diversas vias de resistência imune de *A. fumigatus*, permitindo a estimulação das células da imunidade inata e adaptativa. Este recetor possibilita a formação de complexos a nível dos conídios do fungo, vai atuar como uma opsonina, permitindo o seu reconhecimento e facilitando a fagocitose. O défice deste recetor vai traduzir-se num maior risco de contração de API, uma vez que o reconhecimento dos conídios pelas células dendríticas, macrófagos alveolares e neutrófilos é prejudicado.

Meersseman, Lagrou, Maertens, & Van Wijngaerden, (2007) propuseram uma classificação para os fatores de risco nos pacientes das UCI, que se dividem em baixo, intermédio e alto risco, ilustrados na Tabela 6.

**Tabela 6:**Fatores de risco em pacientes das UCI (Adaptado de Koulenti, Garnacho-Montero, & Blot, 2014).

Risco Alto	Risco Intermédio	Risco Baixo
Neutropenia (<500/ $\mu$ l)	Corticosteroides antes de admissão na UCI	Queimaduras severas
Neoplasia hematológica	Transplante autólogo células-tronco hematopoiéticas	Transplantes de órgãos sólidos
Transplante alogénico da medula óssea	DPOC	Tratamento com esteroides <8 dias
	Cirrose hepática	Estadia prolongada nas UCI (> 21 dias)
	Infeção por VIH	Cirurgia pós-cardíaca
	Cancros de órgãos sólidos	Malnutrição
	Transplante de pulmão	
	Terapia imunossupressora sistémica	

- Manifestações clínicas:

As doenças causadas pelo fungo *Aspergillus* denominam-se aspergiloses e vão de ligeiras a mais severas e generalizadas que colocam a vida em risco. Apesar de o local infetado mais comum serem os pulmões, a infeção pode disseminar para outros órgãos, como no coração, no fígado, nos rins, nos nódulos linfáticos, na glândula tiroideia e no cérebro, podendo mesmo provocar convulsões, hemorragia intracraniana e meningite (Feng, Heffner, & Wright, 2007; Paramythiotou et al., 2014).

As manifestações clínicas podem variar consoante o local infetado e a capacidade do hospedeiro para gerar uma resposta imune. Desta forma, podem tratar-se de doenças não-invasivas como a aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) e o aspergiloma. Na classe das infeções invasivas, podemos considerar a API e a aspergilose traqueobrônquica (Cadena, Thompson, & Patterson, 2016).

Das doenças enumeradas anteriormente a que tem maior relevância e que causa elevada mortalidade e morbidade é a API. Os sintomas nem sempre são específicos o que pode dificultar o diagnóstico. Os principais sintomas apresentados são tosse, febre, mal-estar geral, dor no peito, perda de peso, hemoptise e dispneia (Pergam, 2017; Singh, Kalyan, Prakash, & Sharma, 2017).

### 3.3 *Mucorales* spp

Antigamente, o termo zigomicoses era utilizado para descrever as infecções criadas pela classe zigomicetes, porém, uma nova reclassificação taxonômica eliminou a classe sendo que esta deu origem a duas ordens: *Mucorales* e *Entomophthorales*. Porém, é a ordem *Mucorales*, a responsável pela maior parte das infecções fúngicas humanas, daí que se utilize o termo mucormicoses (Farmakiotis & Kontoyiannis, 2016; Lackner, Caramalho, & Lass-Flörl, 2014).

Esta ordem está dividida em sete famílias que são as seguintes: *Mucoraceae*, *Saksenaceae*, *Syncephalastraceae*, *Cunninghamellaceae*, *Thamnidaceae*, *Mortierellaceae* e *Absidiaceae* (Paramythiotou et al., 2014). Os gêneros mais associados a infecções fúngicas são *Rhizopus*, *Mucor*, *Cunninghamella*, *Rhizomucor*, *Apophysomyces*, *Absidia* e *Saksenaea* (Sabino & Martins, sd). Os fungos pertencentes aos *Mucorales* são seres ubiqüitários e saprófitas que se encontram em compostos orgânicos como pão, fruta, matéria vegetal em decomposição, solo e dejetos de animais. A nível hospitalar podem ser encontrados, em agulhas, depressores de língua, equipamentos, bandejas, o que facilita a sua transmissão (Richardson, 2009). Para além disso, são termorresistentes, o que lhes confere a capacidade de crescer a temperatura de 37 °C ou mais elevadas em algumas espécies e como são de crescimento rápido, são importantes patogénicos da doença humana (Binder, Maurer, & Lass-Flörl, 2014; Richardson, 2009). As variações sazonais também têm alguma influência no desenvolvimento de mucormicoses, sendo mais frequentes de agosto a novembro (Farmakiotis & Kontoyiannis, 2016). Sem esquecer que a área geográfica também tem algum impacto no tipo de infeção gerada e no padrão de doentes afetados, existindo diferenças entre países desenvolvidos e países em desenvolvimento. Nos países em desenvolvimento, como a Índia, Egipto e Arábia Saudita, os indivíduos mais afetados são os que apresentam diabetes descontrolada e

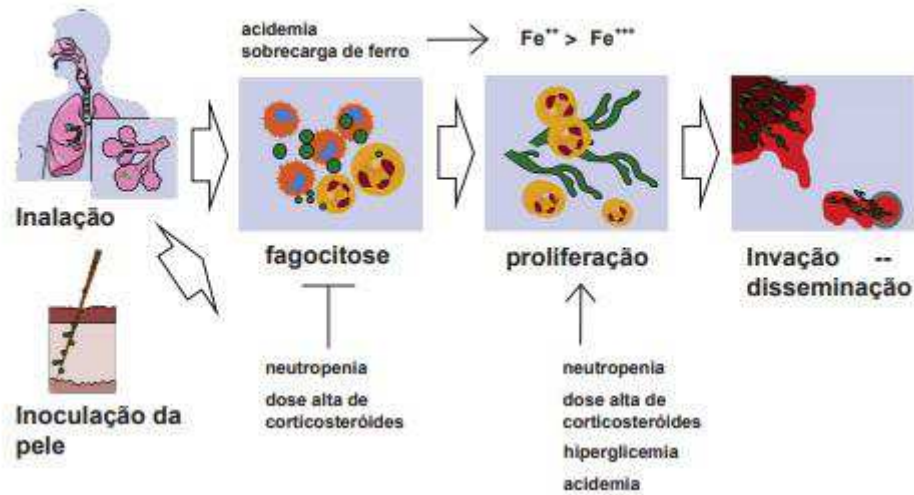
traumas. Por outro lado, os indivíduos dos países desenvolvidos sujeitos a transplante de células hematopoiéticas, doenças hematológicas e a quimioterapia, são os que apresentam maior risco (Lackner et al., 2014; Petrikkos et al., 2012).

As mucormicoses não escolhem idades nem condições subjacentes, pelo que pode infetar desde recém-nascidos até idosos se tiverem com o seu sistema imunitário debilitado (Katragkou, Walsh, & Roilides, 2014). As mucormicoses são infeções menos comuns que as provocadas por *Candida* ou *Aspergillus*, mas apresentam índices de mortalidade elevados. De salientar que têm vindo a aumentar, como consequência do aumento do número de indivíduos imunodeprimidos (Spellberg B, Edwards J, Ibrahim A, 2005).

Em Portugal, a incidência de mucormicoses deve-se em grande parte à enorme prevalência de diabetes *mellitus*, que ocorre, em cerca de 13% da população total. Entre os anos 2001 e 2015 foram registados 19 casos (R. Sabino et al., 2017).

- Patogénese e os seus fatores de virulência

As portas de entrada para esta infeção podem ocorrer através da via respiratória, da via cutânea/percutânea (agulhas/cateteres) ou pela ingestão de alimentos. Esta última via é a menos frequente e está implicada na mucormicose gastrointestinal (Binder et al., 2014). A principal via implicada é através da inalação, pois como referido anteriormente, os fungos são ubiqüitários pelo que a maioria dos indivíduos está exposta a estes microrganismos e estima-se que possa existir uma inalação de até 170000 esporos por dia. Apesar deste ser um número muito elevado, estes fungos raramente causam infeção em indivíduos imunocompetentes (Lackner et al., 2014). O mesmo não acontece nos indivíduos que por algum motivo têm o seu sistema de defesa fragilizado, nomeadamente em indivíduos neutropénicos, diabéticos ou com toma prolongada de corticosteroides, o que não lhes permite uma resposta de defesa eficaz. Desta forma os esporos conseguem escapar à fagocitose, permitindo a sua germinação em hifas e posterior disseminação, como se pode ver na Figura 4 (Farmakiotis & Kontoyiannis, 2016; Kasner, Hunter, Ph, Kariko, & Ph, 2013). De realçar que qualquer espécie de *Mucorales* pode causar doença (Petrikkos et al., 2012).



**Figura 4:** Patógenese da mucormicose. Retirado e adaptado de (Farmakiotis & Kontoyiannis, 2016)

- Manifestações Clínicas

Consoante o local anatómico da infecção, a mucormicose pode ser dividida em seis tipos que são: rinocerebral, pulmonar, gastrointestinal, cutânea/subcutânea, disseminada e formas incomuns que podem incluir peritonite, mediastinite, abscessos renais, miocardite, endocardite, otite externa e queratite (Farmakiotis & Kontoyiannis, 2016).

Os locais preferidos para a ocorrência de infecção invasiva são os seios paranasais (39%), pulmões (24%) e pele (19%), sendo que a disseminação para o sistema nervoso central (SNC) pode ocorrer em 23% dos casos (Lackner et al., 2014). As infecções causadas por estas espécies destacam-se na medida em que nestas há um início rápido da necrose tecidual que pode vir acompanhada de febre ou não. Esta necrose que é tão característica destas infecções resulta da invasão dos vasos sanguíneos e da sua posterior trombose. A presença de escaras necróticas negras constituem uma característica particular das mucormicoses (Binder et al., 2014; Petrikos et al., 2012).

As mucormicoses rinocerebrais e pulmonares são as mais comuns (Long & Koyfman, 2015). No caso da mucormicose rinocerebral, a infecção é iniciada nos seios paranasais, atingindo os olhos e posteriormente o cérebro. Numa fase inicial da doença, os principais sintomas são congestionamento nasal, dor nos seios paranasais, febre e inchaço facial. Quando os olhos são atingidos, a visão torna-se turva ou perde-se por completo. Ao

alcançar o cérebro ocorrem neuropatias cerebrais e alteração da consciência (Binder et al., 2014).

- Fatores de Risco

As infecções provocadas pela ordem *Mucorales* são a 3ª causa de IFI, a seguir à candidíase e aspergilose, com especial impacto nos doentes hematológicos e nos que foram sujeitos a transplante alogénico (Raquel Sabino & Martins, s.d.). As espécies *Mucorales* apresentam algumas características que se revelam fatores de risco na aquisição de infecções. Os fungos têm a capacidade de crescer em ambientes hiperglicémicos e ácidos, devido à presença da enzima cetona redutase, pelo que os pacientes com diabetes com ou sem cetoacidose são propensos ao crescimento destes. O ferro é determinante na patogenicidade, especialmente em indivíduos que tomam deferoxamina, pois os fungos conseguem absorver o ferro através dos seus sideróforos, impulsionando a invasão tecidual (Long & Koyfman, 2015).

Para além destas condições existem muitas outras que são propícias ao desenvolvimento de mucormicose como o uso crónico de corticosteroides, sobrecarga de ferro no organismo, trauma, malnutrição, baixo peso à nascença e prematuridade (Petrikos et al., 2012).

Na Tabela 7 pode observar-se a relação entre os fatores de risco e a localização das mucormicose.

**Tabela 7:**Localização da infeção e fatores predisponentes (Adaptado de Zigomicose, Severo, Guazzelli, & Severo, 2010).

Localização da infeção	Fatores predisponentes
<b>Rinocerebral</b>	Diabetes com cetoacidose
<b>Pulmonar</b>	Linfoma, leucemia, corticosteroides, diabetes
<b>Gastrointestinal</b>	Desnutrição, prematuridade, baixo peso à nascença
<b>Cutânea</b>	Traumas cutâneos, queimaduras
<b>Disseminada</b>	Terapia com deferoxamina, Transplante de órgãos, doenças hematológicas

### 3.4 *Cryptococcus* spp

Das 37 espécies conhecidas de *Cryptococcus*, apenas *C. neoformans* e *C. gattii* são consideradas patogênicas e causadoras de infecções em humanos e animais (Kwon-Chung et al., 2017). Este gênero pertence ao filo Basidiomycota e distingue-se das outras leveduras, como por exemplo da *Candida* por possuir cápsula polissacárida, pela formação de melanina e pela atividade da enzima urease (Huston et al., 2016).

As duas espécies patogênicas são muito diferentes entre si quer a nível do genótipo como do fenótipo. Enquanto que o complexo *C. neoformans* se divide em 2 espécies, o complexo *C. gattii* tem 5 espécies (Kwon-Chung et al., 2017). Estes dois agentes patogênicos têm entre si muitas diferenças. Essas diferenças residem a nível da distribuição geográfica, epidemiologia, caracteres moleculares e apresentação clínica. Existem 9 tipos moleculares, sendo que 5 são pertencentes ao complexo *C. neoformans* e 4 ao complexo *C. gattii*. Os tipos moleculares pertencentes a *C. neoformans* são VNI, VNII, VNIII, VNIV e VNB, enquanto que VGI, VGII, VGIII e VGIV estão associados a *C. gattii* (Cogliati, 2013; Hagen et al., 2015). Inicialmente os agentes responsáveis pela criptococose eram considerados uma única espécie, mas com o avanço dos métodos de identificação molecular, foram divididos e distinguidos segundo a sua diversidade antigénica. *C. neoformans* foi classificada em 2 variedades. *C. neoformans* var *neoformans* e *C. neoformans* var *grubii*, com os serotipos D e A, respetivamente. Por sua vez, *C. gattii* apresenta 2 variedades B e C. De salientar que estas espécies têm a capacidade de se recombinar entre si e formar híbridos. Estes são encontrados essencialmente na Colômbia, Brasil, Índia e Holanda (Aminnejad et al., 2012; Cogliati, 2013).

- Epidemiologia

Enquanto *C. neoformans* se encontra globalmente distribuído, *C. gattii* está confinado a áreas tropicais e subtropicais, no entanto tem havido um aumento nas zonas de clima temperado tais como no norte dos Estados Unidos, no Norte da Europa e Canadá, muito provavelmente derivado às alterações climáticas (Byrnes et al., 2010; Hoang, Maguire, Doyle, Fyfe, & Roscoe, 2004). *C. neoformans* como referido anteriormente está distribuído de forma global, sendo encontrados essencialmente em solos com excrementos de aves, com particular destaque para os pombos, e em cavidades de vários tipos de árvores. Por sua vez, *C. gattii* está ligado a eucaliptos, encontrados nas zonas

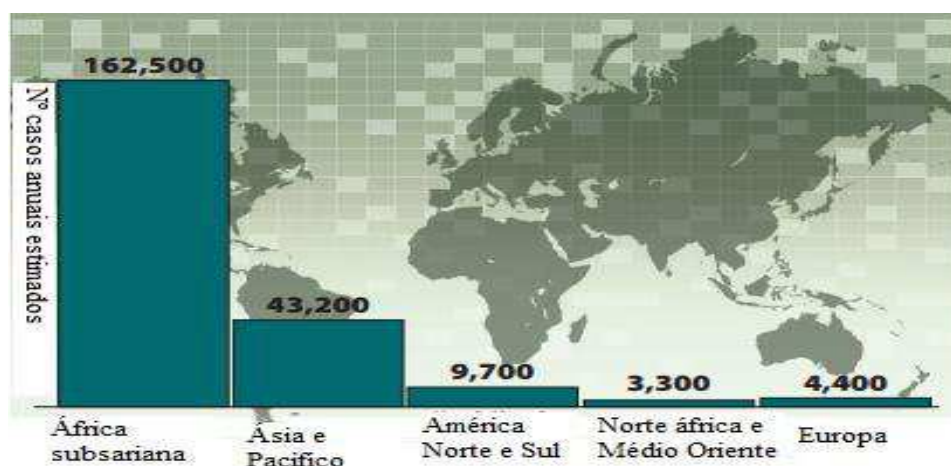
tropicais, mas com a expansão para zonas de climas temperados tais como , os carvalhos e abetos também ganharam destaque como reservatórios desta espécie (Maziarz & Perfect, 2016).

A percentagem de infeções a nível global difere substancialmente entre *C. neoformans* e *C. gattii*. A prevalência de infeções criadas por *C. neoformans* corresponde a 80%, enquanto que as geradas por *C. gattii* equivalem aos restantes 20% (Kwon-chung et al., 2016).

A criptococose era considerada uma infeção rara antes da pandemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), no entanto por volta de 1970 já assumia alguma relevância sendo associada essencialmente a neoplasias, transplantes de órgãos e tratamentos com imunossuppressores. Contudo, por volta de 1980, esta doença ganhou maior prevalência, sendo que a SIDA foi responsável por 80 % dos casos (Maziarz & Perfect, 2016).

Há uma forte correlação entre a meningite criptocócica e o vírus da SIDA, sendo na África subsariana que se regista o maior número de indivíduos infetados por estas duas infeções. Em 2009, segundo a organização mundial de saúde (OMS), ocorreram cerca de 1 milhão de casos por ano em todo o mundo, sendo que 720000 na África Subsariana, provocando cerca de 600000 mortes entre os pacientes com SIDA (Park et al., 2009). Atualmente, o cenário é mais satisfatório verificando-se um decréscimo no número de casos por ano, estando nos 220000, mas ainda com uma elevada taxa de mortalidade, rondando as 181000 mortes. Continua a verificar-se a prevalência destas infeções com os pacientes infetados com SIDA, no entanto os números têm vindo a decrescer devido à maior disponibilidade de terapia antirretroviral. Contudo, nos países em desenvolvimento, ainda há uma grande incidência desta infeção, como se pode ver na Figura 5 (Rajasingham et al., 2017).

Segundo R. Sabino et al., (2017) a incidência de criptococose extrapulmonar em Portugal é de 0,12 por 100000 habitantes/ano. Estes resultados são mais elevados quando comparados com outros estudos europeus, dada a grande incidência de casos de meningite criptocócica, derivado do número elevado de pacientes com SIDA.



**Figura 5:** Incidência da meningite criptocócica a nível global (Retirado e adaptado de Rajasingham et al, 2017)

- Patogénese e fatores de virulência

A infeção criptocócica ocorre maioritariamente pela inalação de pequenos propágulos sejam eles basidiósporos ou pequena células de levedura, que por terem dimensões mínimas (1,5-3,5  $\mu$ m) conseguem facilmente atravessar as vias aéreas e atingir os alvéolos pulmonares. No entanto pode também acontecer inoculação traumática, mas não é tão comum (Christianson, Engber, & Andes, 2003; Kwon-chung et al., 2016).

Quando os propágulos entram em contacto com os alvéolos, encontram os macrófagos alveolares que têm um papel determinante na resposta imune. Estes recrutam outras células que têm atividade a nível da imunidade através citoquinas como o interferão-  $\gamma$ , a interleucina-2 e o fator de necrose tumoral (TNF), que vão desencadear uma resposta pelas células T auxiliares resultando numa inflamação granulomatosa. De salientar que estas leveduras podem estar no hospedeiro sem provocar qualquer sintoma durante anos, na medida em que tem a capacidade de se tornar latente dentro do mesmo, permanecendo dentro dos nódulos linfáticos ou granulomas pulmonares. No entanto, quando ocorre algum distúrbio como a diminuição da função do TNF, através de inibidores anti-TNF; ou a destruição de células  $CD4^+$  pelo vírus da SIDA, a levedura cresce e ocorre disseminação (Kwon-chung et al., 2016; Maziarz & Perfect, 2016).

Um dos principais fatores de virulência é a cápsula polissacárida composta por glucuronoxilomanogalactano (GXMGal) e glucuronoxilomanano (GXM) que ao

funcionar como um escudo desempenha uma importante atividade contra as respostas imunes do hospedeiro, com particular destaque para a inibição da fagocitose. Para além disso também é importante na proteção do fungo contra a dessecação ambiental e das espécies de oxigénio reativas (Almeida & Wolf, 2015; Haruta, Gray, & Sussman, 2015; O'Meara & Andrew Alspaugh, 2012). Alguns dos principais fatores de virulência de *C. neoformans* consistem na sua termotolerância sendo capazes de crescer a temperaturas de 37°C, o que lhes permite gerar uma infeção no hospedeiro. A melanina dado o seu papel antioxidante confere proteção contra o stress oxidativo, o frio e o calor. A aquisição deste pigmento deve-se ao facto de possuírem uma enzima denominada fenoloxidase que é capaz de converter os compostos difenólicos em melanina. Para além dos fatores de virulência supracitados, secretam várias enzimas como fosfolipases, urease, proteases e DNAses que no processo de infeção permitem a destruição dos tecidos e posterior sobrevivência do fungo. Como exemplo, a urease permite a passagem do fungo dos pulmões para a barreira hematoencefálica, fator crucial para a meningite criptocócica (Almeida & Wolf, 2015).

- Manifestações clínicas

As infeções causadas por estes fungos tanto podem ser assintomáticas e variar de uma infeção cutânea autolimitada a uma infeção sistémica e disseminada fatal (Srikanta, Santiago-Tirado, & Doering, 2014).

Na infeção disseminada os principais órgãos afetados são os pulmões e o SNC, no entanto, o fungo pode ainda provocar infeção a nível da pele, ossos, articulações e próstata quando ocorre disseminação (Maziarz & Perfect, 2016).

Quando a infeção ocorre a nível dos pulmões os sintomas que os indivíduos apresentam são muito semelhantes a uma pneumonia, sendo que os mais comuns são tosse seca, dispneia, dor no peito e febre (W. C. Chang et al., 2006).

Apesar de qualquer parte do corpo poder ser infetada, a infeção no SNC é a mais comum e a mais preocupante, visto ser a mais fatal. As principais manifestações clínicas passam pela febre, dor de cabeça, alteração da consciência, neuropatia craniana, letargia e perda de memória (Maziarz & Perfect, 2016).

#### *4. Meios de diagnóstico*

#### **4.Meios de diagnóstico**

Uma vez que os prognósticos dos pacientes com IFI não são os mais favoráveis, mesmo com toda a terapêutica antifúngica disponível, é crucial a adoção de métodos de diagnóstico com a maior antecedência possível, pois muitos dos agravamentos estão relacionados com um atraso no diagnóstico, o que se reflete num início tardio da terapia adequada.

Visto que grande parte dos pacientes se encontram nas UCI ou possuem fatores que são considerados de risco, existem muitas técnicas de diagnóstico como a histopatologia que requerem intervenções invasivas como a biópsia, tornando-se inviáveis para pacientes neutropénicos com risco acrescido de desenvolver trombocitopenia e hemorragias. Por outro lado, como a técnica de cultura é demorada e nem sempre se revela específica e sensível, surge a necessidade de se investir em técnicas para além das convencionais e apostar nas metodologias não culturais que se baseiam essencialmente em métodos moleculares e imunológicos (Ostrosky-Zeichner, 2012).

##### **4.1 Métodos Convencionais**

Como referido anteriormente, estes métodos podem revelar-se bastante insensíveis e por vezes impraticáveis, no entanto continuam a ser necessários e utilizados na prática clínica de forma a complementar o diagnóstico. Estão incluídos nesta categoria, a microscopia direta, a cultura, a histopatologia e a radiologia.

- **Microscopia Direta**

Esta técnica pode ser utilizada sempre que é possível a recolha de amostras dos indivíduos suspeitos de uma infeção fúngica. As amostras colhidas podem vir de locais do corpo estéreis como sangue, líquido cefalorraquidiano (LCR) ou medula óssea, ou de locais não estéreis como a pele, trato respiratório, trato geniturinário, trato gastrointestinal e nas membranas de mucosas oral ou vaginal. Apesar de ser um teste rápido dá um diagnóstico que pode não ser o mais correto, uma vez que este método tem limitações. Só é possível a observação de estruturas fúngicas quando estas se encontram numa quantidade considerável na amostra, o que geralmente só acontece quando a doença já se encontra

numa fase avançada. Sem esquecer que o número de campos utilizado e a ampliação utilizada podem interferir na interpretação dos resultados. Desta forma, este método torna-se pouco sensível pelo que deve ser utilizado como complementar e não como método decisivo de diagnóstico. No entanto, podem ser utilizadas medidas que auxiliam a visualização e permitem que esta tenha o mínimo de contaminação, tais como o hidróxido de potássio (KOH) 10-20% que contém o fluoróforo branco-de- calcoflúor. O KOH tem um papel a nível da dissociação das células, enquanto que o fluoróforo confere fluorescência azul esverdeada pela ligação à quitina, que não está presente em todas as amostras biológicas. Em relação aos esfregaços podem ser utilizadas várias colorações tais como a Gram, Giemsa, Tinta da China, Azul de Metileno e Hematoxilina-eosina, para uma coloração histológica (Cuenca-Estrella et al., 2011; Freitas & Lopes, 2014).

- **Cultura**

Ainda que tenham sido desenvolvidos muitos métodos de diagnóstico posteriores às culturas, esta técnica continua a ser considerada “padrão de ouro” para um diagnóstico definitivo das infeções fúngicas (Chandrasekar, 2010). Esta metodologia apresenta algumas desvantagens como a demora de resultados, variando entre 24-72h conforme as espécies. Caso as amostras sejam retiradas de locais não estéreis como urina, reto ou orofaringe, podem exibir colonização em vez de infeção. Daí que faça parte dos critérios EORTC/MSG a distinção entre culturas realizadas a partir de amostras de locais estéreis e as obtidas de amostras de locais em que podem fazer parte da flora comensal humana. De realçar que podem ainda constituir um resultado positivo, quando, na verdade, ocorreu contaminação ambiental com *Aspergillus*, por exemplo (Hsu et al., 2011).

Ainda que tenham sido realizados esforços para melhorar esta técnica, como o recurso de centrifugação de amostras, meios de cultura com melhores características e o uso de sistemas automatizados, a sensibilidade continua a não ser a desejável (Chandrasekar, 2010).

○ **Histopatologia**

O exame histopatológico nos tecidos vai ser sempre um método importante para definir o diagnóstico de infeções fúngicas a partir de isolados de cultura positivos, invasão tecidual e para se conhecer a reação do hospedeiro ao fungo.

As amostras para examinar devem ser sempre adicionadas de hematoxilina-eosina que permite o estudo dos tecidos infetados. Para além disso existem outras colorações que auxiliam no diagnóstico como Fontana-Masson que permite a identificação de *Cryptococcus*, pela coloração dp++a melanina; Periodic acid -Schiff (PAS) que cora os elementos fúngicos de rosa e metenamina de prata que permite uma ótima visualização do fungo, pelo contraste verde fluorescente provocado (Roden & Schuetz, 2017; Zhang, 2012).

Porém, tal como na cultura esta técnica não pode ser usada em pacientes críticos, visto requerer uma prática invasiva. Para além disso, identificar uma espécie somente pelas suas características morfológicas revela-se um processo difícil/ impossível, na medida em que existem diferentes agentes patogénicos com caracteres semelhantes (Chandrasekar, 2010).

○ **Radiologia**

Dada a inespecificidade e semelhança dos sinais/sintomas no início do decorrer das IFI, a radiologia pode revelar-se uma mais valia, na medida em que existem aspetos específicos dos organismos que se tornam visíveis com o recurso de tecnologias de imagem. Estes podem revelar-se sugestivos para o início da terapêutica (Lamoth & Calandra, 2017).

Para além de ser um método não invasivo, tem a particularidade de diferenciar o estadio da infeção, através das imagens clínicas, o que permite evidenciar se a doença está numa fase precoce ou mais avançada (Chandrasekar, 2010).

A técnica mais usual para a deteção das imagens radiológicas é essencialmente através de tomografia computadorizada (TC) de alta resolução. Este método permite a

visualização de anormalidades tais como nódulos, halos, lesões cavitárias, entre outras que facilitam a detecção do organismo. É um método muito usado para o diagnóstico da aspergilose invasiva, no entanto pode não ser o mais exato, havendo por vezes semelhanças com infecções causadas por *Mucorales*, entre outros organismos (Lamoth & Calandra, 2017).

Fora a TC, existem outras técnicas como tomografia por emissão de positrões (PET) onde é utilizada um radionuclídeo [18F] fluorodeoxiglucose. Uma vez que este radionuclídeo se acumula nas células metabólicas e inflamatórias permite que seja utilizado na detecção de infecções fúngicas para além de permitir a sua monitorização (Hot et al., 2011).

#### 4.2 Métodos não convencionais

Surgiu a necessidade de desenvolver novas técnicas que permitissem diagnosticar IFI, visto que os métodos existentes não eram suficientes, apresentando várias limitações. Os novos métodos desenvolvidos têm por base os antigénios encontrados na parede celular das células fúngicas como o galactomanano, manano, antigénio criptocócico, 1,3- $\beta$ -Glucano; nos anticorpos e metabolitos. Para além destas técnicas foram também desenvolvidos métodos moleculares com vista à detecção e amplificação dos ácidos nucleicos, como o PCR em tempo real e a hibridização *in situ* – PNA FISH. Fora isso, métodos como a ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF) e o dispositivo de fluxo lateral (*Lateral Flow Device*- LFD) foram estudados, sendo usados para o diagnóstico das IFI. Alguns destes testes identificam múltiplos fungos, sendo que alguns se restringem a uma única espécie fúngica (Ostrosky-Zeichner, 2012).

- **Galactomanano**

O galactomanano é um componente da parede celular das espécies de *Aspergillus* que é libertado durante o crescimento das hifas e na invasão tecidual. Para a detecção deste polissacárido é utilizado um imunoensaio enzimático em dupla *sandwich* que foi aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) em 2003 e que é comercializado pelo nome Platelia *Aspergillus* EIA ®( Bio-Rad Laboratories, Inc.), que se encontra disponível na Europa (Ostrosky-Zeichner, 2012).

Apesar de também serem encontrados níveis de galactomanano em outros fungos filamentosos como *Paecilomyces* spp. e *Penicillium* spp, estes são muito baixos pelo que se desprezam e se considera a deteção deste antígeno específica para as espécies de *Aspergillus*, sendo utilizado para o diagnóstico da aspergilose (Cuenca-Estrella et al., 2011).

Os resultados dos níveis de galactomanano podem ser expressos de duas formas: em termos de índice de galactomanano ou índice da densidade ótica, em que se compara a da amostra com um padrão definido (Ostrosky-Zeichner, 2012).

Foram realizados vários estudos em diferentes amostras possíveis para este tipo de teste, nomeadamente o soro e o lavado broncoalveolar (LBA). Relativamente aos estudos realizados para o soro, os resultados encontrados em duas meta-análises foram de 60-80% para a sensibilidade e 80-95% para a especificidade (Leefflang et al., 2015; Pfeiffer, Fine, & Safdar, 2006). Por sua vez Meersseman et al., (2007) constataram valores mais favoráveis aquando o uso do LBA para a pesquisa do antígeno em pacientes de UCI, sendo que a nível da sensibilidade os valores se encontram entre 85-90% e para a especificidade entre 90-95%.

É importante ressaltar que este teste demonstra uma menor especificidade para recetores de transplantes de órgãos sólidos quando comparados com recetores de células hematopoiéticas ou com doenças hematológicas, o que pode ser determinante no uso deste ensaio para o diagnóstico da aspergilose invasiva, sendo sugerido a TC como complemento de diagnóstico (Cuenca-Estrella et al., 2011).

Como qualquer teste, também este apresenta desvantagens, na medida em que pode apresentar falsos-positivos ou falsos-negativos. Em situações que o paciente está a fazer antibióticos  $\beta$ -lactâmicos como piperacilina-tazobactam ou possua concomitantemente outras micoses invasivas, como as provocadas por *Penicillium* spp ou histoplasmoze, o teste pode diagnosticar falsos-positivos. Por outro lado, o teste pode acusar falsos-negativos quando o paciente fez ou está a fazer concomitantemente terapia antifúngica (Ostrosky-Zeichner, 2012).

○ **Manano**

Uma das várias opções para o diagnóstico das infeções por *Candida* é a deteção do antígeno (Ag) manano e do anticorpo (Ac) de imunoglobulina G contra o antígeno manano (Ostrosky-Zeichner & Al-Obaidi, 2017a). O manano é um antígeno presente na parede celular das espécies *Candida* que é lançado na corrente sanguínea quando existe uma invasão tecidual (Epelbaum & Chasan, 2017).

Existem vários testes comerciais para a realização deste teste, mas o mais usual é o Platelia *Candida* Ag Plus ELISA® que demonstrou níveis de especificidade e sensibilidade consideráveis (Ramanan, Wengenack, & Theel, 2017).

Segundo Mikulska, Calandra, Sanguinetti, Poulain, & Viscoli, (2010) há vantagem no uso simultâneo da deteção do antígeno e do anticorpo, comparativamente ao uso destes de forma individualizada. Para o uso isolado da deteção do anticorpo, os resultados obtidos para a sensibilidade foram de 59% e para a especificidade 83%; por sua vez, quando se utilizou o antígeno os resultados foram semelhantes, com uma sensibilidade de 58% e uma especificidade de 93%. Contudo, o uso combinado de Ag/Ac obteve melhores resultados, com uma sensibilidade de 83% e uma especificidade de 86%.

No entanto, esta metodologia também apresenta desvantagens, pois em indivíduos imunodeprimidos, os níveis de Ac são muito baixos ou inexistentes, o que se traduz num falso-negativo. Contrariamente, por vezes um título elevado de Ac detetado significa colonização e não infeção, pelo que é sempre necessário o recurso a outros métodos complementares aquando uma suspeita de IFI (Laín et al., 2008).

○ **(1, 3)-β-D- Glucano**

Este biomarcador é um componente maioritário da parede celular da maioria dos fungos com exceção das espécies de *Cryptococcus*, *Mucorales* e *Blastomyces dermatitidis*. Por esta razão não se pode considerar um método a usar nestas espécies, pois não o expressam de todo ou em muito pequena quantidade (Hsu et al., 2011; Ramanan et al., 2017). Visto que este marcador só é expresso em fungos, não sendo detetado em bactérias, mamíferos ou vírus, pode considerar-se um marcador pan-fúngico para o diagnóstico das IFI (Ostrosky-Zeichner, 2012).

Foram desenvolvidos vários testes, no entanto apenas o teste Fungitel® (Associates of Cape Cod, East Falmouth, MA, USA) foi aprovado pela FDA, sendo comercializado na América e Europa. Este teste tem como princípio um ensaio cromogénico que usa um fator de coagulação (fator G) que é isolado das células do caranguejo *Limulus polyphemus* ou *Tachypleus tridentatus*, de forma a detetar este marcador (Lamoth & Calandra, 2017). O fabricante deste ensaio considera valores inferiores a 60 pg/mL como resultado negativo e superiores a 80 pg/mL um resultado positivo. Este teste tem uma grande vantagem a nível da rapidez dos resultados, sendo que estes podem estar disponíveis até 2h após realizado (Lamoth & Calandra, 2017; Ostrosky-Zeichner, 2012).

Numa meta-análise de 16 estudos verificou-se que os níveis de deteção deste marcador foram de 77% e 85% para a sensibilidade e especificidade, respetivamente (Karageorgopoulos et al., 2011).

Visto este marcador ter várias vantagens a nível da rapidez de resultados, boa especificidade e sensibilidade, foi considerado um marcador a considerar nas diretrizes de *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) e nas da EORTC para o diagnóstico de aspergilose e candidíase. Este marcador revela-se muito útil, na medida em que permite o reconhecimento dos pacientes de alto risco, que beneficiariam no tratamento empírico, assim como na monitorização da resposta ao tratamento (Ostrosky-Zeichner & Al-Obaidi, 2017b; Pauw et al., 2008). Porém como todos os testes, também este possui algumas desvantagens sendo que as que se destacam são as reações cruzadas com antibióticos como os beta-lactâmicos, o uso de produtos de sangue como imunoglobulinas IV, albumina e a hemodiálise (Ramanan et al., 2017).

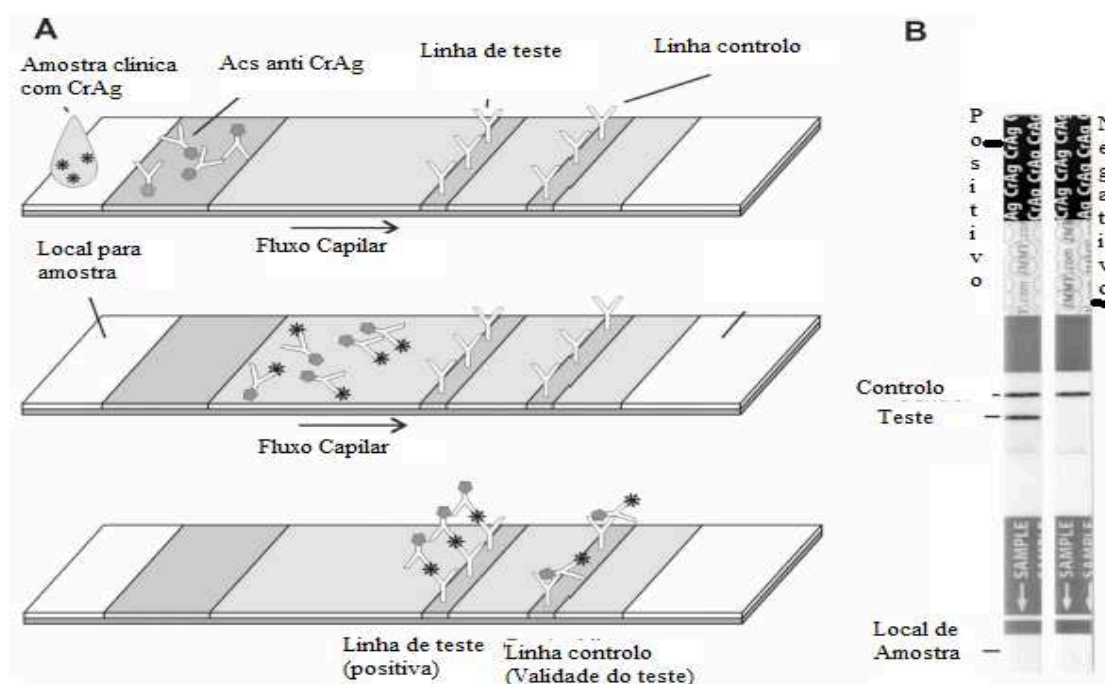
- **Antigénio Criptocócico**

As espécies de *Cryptococcus* possuem a nível capsular um antigénio polissacarídeo que é libertado durante a infeção. Os métodos geralmente utilizados para a deteção deste antigénio baseiam-se essencialmente em teste de aglutinação em látex, que é considerado o teste padrão e o imunoensaio enzimático, sendo que ambos se demonstram rápidos, sensíveis e específicos, e usam como amostras o LCR e o soro (Maziarz & Perfect, 2016).

Ambos os testes requerem infraestruturas laboratoriais complexas que nos países em desenvolvimento não se encontram disponíveis. Visto que uma grande maioria dos casos

de infeções por estas espécies se manifestam na África subsariana surge a necessidade de desenvolvimento de um teste praticável em países com recursos limitados. De forma a colmatar esta falha, desenvolveu-se um *point of care testing* (POCT), o IMMY (Norman, Oklahoma) em 2009. Este ensaio consiste num ensaio de fluxo lateral que permite a determinação do antígeno, a partir de amostras de vários fluidos corporais como plasma, soro, sangue, urina e LCR. Caso o antígeno se encontre presente na amostra, é capturado pelos anticorpos monoclonais anti antígeno presentes no reagente, exibindo um resultado positivo através da formação de uma linha no teste, como demonstrado na Figura 6 (Kozel & Bauman, 2012). Este kit foi aprovado pela FDA em 2011 e recebeu marca CE para aprovação a nível europeu.

Segundo a OMS este método de diagnóstico é o favorito para as infeções por *Cryptococcus*, pelo que deve ser adotado, dadas as suas inúmeras vantagens face aos outros, tais como rapidez de resultados (15 min), não requerer laboratório, eletricidade e ser estável à temperatura ambiente (Kozel & Bauman, 2012; Organization, 2011).



**Figura 6:** Demonstração do teste para a deteção do antígeno criptocócico (Adaptado de Kozel & Bauman, 2012).

○ **PCR (*Polimerase Chain Reaction*)**

Os testes moleculares baseados nos ácidos nucleicos ganharam grande destaque para a identificação de espécies fúngicas que apresentam falhas a nível da produção de características morfológicas num tempo aceitável (Ramanan et al., 2017). A técnica da reação em cadeia da polimerase ganhou importância por se tratar de uma prática não invasiva que contempla a análise molecular do DNA fúngico. Esta pode permitir a deteção de primers iniciadores específicos de uma espécie ou utilizar primers pan-fúngicos para sequências conservadas que são encontradas numa vasta gama de espécies fúngicas (Chandrasekar, 2010).

○ **PNA-FISH (*Peptide Nucleic Acid Fluorescence in situ Hybridization*)**

Esta é uma estratégia utilizada para a distinção entre as várias espécies de *Candida*. Após a obtenção de resultados positivos em culturas de sangue, recorre-se a uma hibridização *in situ* fluorescente com recurso a amostras ribossomais marcadas de *C. albicans*. Esta técnica possui vantagens em relação ao método cultural convencional, na medida em que disponibiliza resultados até 3h, em comparação com as 36-48h obtidas aquando uma cultura (Chandrasekar, 2010).

O primeiro teste disponível (AdvanDx, Inc., Woburn, MA), um PNA FISH Dual Prob, que fora aprovado pela FDA, permite a deteção entre apenas 2 espécies: *C. albicans* e *C. glabrata*, corando de verde e vermelho, respetivamente. Posteriormente surgiu outro teste Yeast Traffic Light PNA FISH kit (YTL) que permite a distinção de 5 espécies de *Candida*, sendo elas: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, com uma sensibilidade de 97% (Hall, Le Febre, Deml, Wohlfiel, & Wengenack, 2012; Shepard et al., 2008).

Uma das limitações deste teste é que apenas tem a capacidade de detetar estas 5 espécies, não permitindo a deteção de todas as espécies patogénicas de *Candida* (Zhang, 2012).

○ **LFD (*Lateral Flow Device*)**

Outra das técnicas para o diagnóstico de IFI, consiste num dispositivo de fluxo lateral. Este método consiste numa deteção imunocromatográfica de um antígeno pela reação com um anticorpo específico presente na membrana do dispositivo. Esta técnica já tinha sido desenvolvida sendo que primeiramente tinha sido desenhada para a deteção de vírus, bactérias e toxinas, tendo ficado reconhecida na aplicação dos testes de gravidez (Thornton, 2008).

Para o diagnóstico de *Aspergillus* este teste também demonstrou eficácia, sendo que o antígeno presente na parede dos fungos é reconhecido pela ligação aos anticorpos monoclonais JF5 presentes no teste. Este teste demonstrou uma sensibilidade de 67% com uma especificidade de 100% e permite a análise em amostras de soro ou LBA (Thornton, 2008).

Para além do diagnóstico para *Aspergillus*, esta técnica também tem sido aplicada para a deteção de *Cryptococcus*, a nível do antígeno criptocócico, como referido anteriormente.

○ **D-arabinitol**

D-arabinitol é um metabolito encontrado na maioria das espécies de *Candida* como *C. albicans* e *C. parapsilosis*, com exceção da *C. glabrata* ou *C. krusei*. Quando existe CI, os níveis no soro e urina estão aumentados, pelo que permite distinção entre colonização. No entanto o mesmo pode acontecer quando há anormalidades na função renal (FR), o que se revela uma limitação. De forma a controlar este problema, constatou-se que a taxa de depuração deste metabolito é equivalente à taxa de creatinina, pelo que fazendo a razão entre os dois, é possível o controlo desta. Outra alternativa a esta é a deteção do metabolito L-arabinitol que apesar de fazer parte do metabolismo dos seres humanos, é a principal fonte metabólica dos fungos. De reforçar que este não está aumentado num paciente com CI na deteção do soro/ urina (Ostrosky-Zeichner, 2012). Num estudo precoce realizado por Lehtonen, Anttila, Ruutu, Salonen, & Nikoskelainen, (1996) este método revelou 88% sensibilidade e 91% de especificidade.

○ **MALDI-TOF**

A metodologia *Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF) baseia-se na espectrometria de massa que se tem revelado revolucionário pelas suas características. Inicialmente foi apenas testado para bactérias, mas o seu uso alargou-se para vírus e fungos (Posteraro, De Carolis, Vella, & Sanguinetti, 2013).

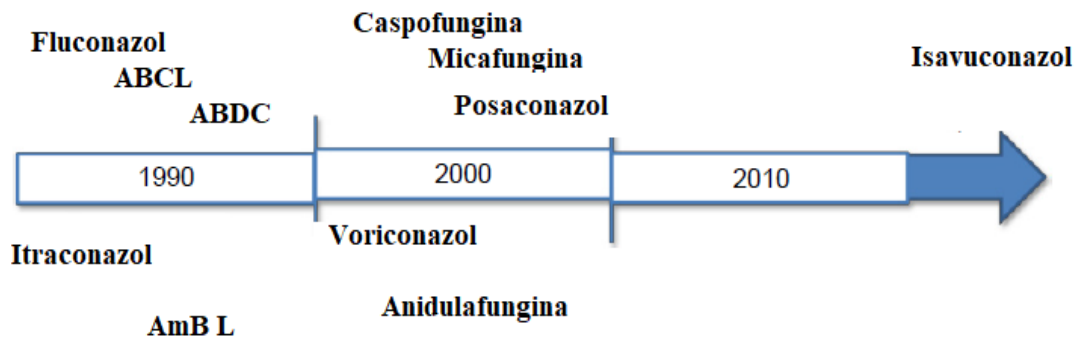
Este método permite uma distinção entre leveduras e fungos filamentosos a partir de colónias. Em casos de leveduras, a amostra é colocada num prato de metal e revestida com uma matriz, onde se faz incidir um feixe de laser, permitindo a dessorção e ionização das proteínas, sendo realizada posteriormente a espectrometria de massa das mesmas. O espetro gerado é depois comparado com uma base de dados que contem espetros de caracterização fúngica previamente analisados e inseridos. No caso de se tratar de um fungo filamentoso é realizada previamente a lise e extração do ácido nucleico antes de se colocar a amostra no prato de metal.

As principais vantagens deste método consistem num tempo de resposta rápido, na necessidade de uma pequena amostra (uma única colónia), na sua precisão e na capacidade de testar vários organismos de forma simultânea. O facto de só permitir o uso de colónias isoladas e de não permitir a análise direta nos produtos biológicos, requerendo uma cultura prévia e de a base com espetros de fungos filamentosos ser mais limitada em comparação com a base de dados das bactérias ou leveduras, pode limitar o seu uso, constituindo uma desvantagem (Ramanan et al., 2017).

## 5.Tratamento Antifúngico

Uma das maiores dificuldades a nível do tratamento das IFI centra-se no facto de os fungos serem eucariotas tal como os hospedeiros Humanos, limitando os alvos que podem ser explorados de forma seletiva para o desenvolvimento de fármacos sem risco de toxicidade associadas. Por esta razão o número de fármacos antifúngicos quando comparados com os antibacterianos é muito mais limitado (Denning & Bromley, 2015; Robbins, Wright, & Cowen, 2016).

Há que salientar que desde 2000 o número de agentes antifúngicos aumentou, existindo porém em número inferior ao desejável, na medida em que nenhum é totalmente satisfatório a nível de eficácia, segurança e toxicidade (Thompson, Cadena, & Patterson, 2009). A Figura 7 ilustra a descoberta de novos antifúngicos no decorrer do tempo.



**Figura 7:** Descoberta de novos antifúngicos (Retirado e adaptado de A.R. et al., 2016).

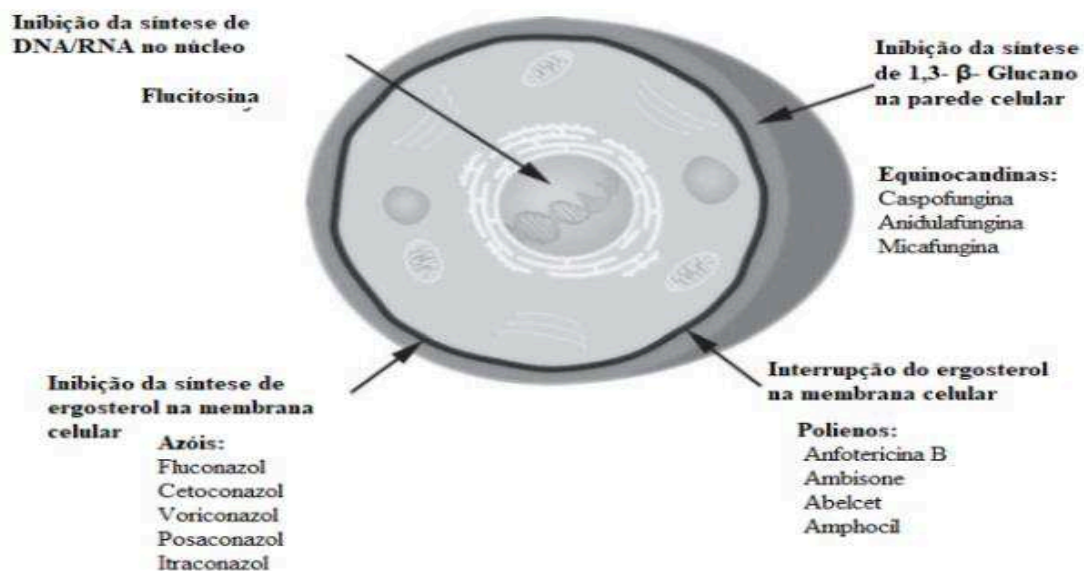
Legenda: ABCL: AmB complexo lipídico; ABDC: AmB dispersão coloidal; AmB L: AmB lipossómica

### 5.1 Classes terapêuticas dos antifúngicos

Atualmente estão disponíveis para o tratamento de infeções fúngicas quatro classes de agentes que existem em diferentes formulações como via oral ou intravenosa. As classes existentes são os polienos, os azóis, as equinocandinas e os análogos das pirimidinas. Estas moléculas antifúngicas apresentam diferentes mecanismos de ação que lhes conferem diferentes propriedades e espetros de ação. Estes fármacos tanto podem ser usados a nível de tratamento ou profilaxia (Paramythiotou et al., 2014).

É com base na estrutura e composição dos fungos, que os fármacos são pensados e desenvolvidos. Os fungos possuem parede celular e membrana citoplasmática com composição diferente das células Humanas, e é essencialmente nestas duas estruturas que se vai interferir. Os componentes maioritários da membrana celular são o ergosterol e o zimosterol. A quitina, manoproteínas e beta-glucanos encontram-se na parede celular. Estes compostos são essenciais pois para além de conferirem rigidez e estrutura aos fungos também desempenham uma ação importante a nível da imunidade do hospedeiro, sendo responsáveis pelas reações inflamatórias derivadas das lesões a nível dos tecidos, assim como reações sistémicas que podem levar à morte (Carmona & Limper, 2017).

A figura seguinte (Figura 8) ilustra as várias classes antifúngicas e o seu local alvo.



**Figura 8:**Diferentes classes terapêuticas e respetivos alvos. Adaptado de (Chandrasekar 2011).

Em suma, as classes antifúngicas e as estruturas afetadas são:

- ❖ Polienos/Azóis: interferem na membrana celular
- ❖ Equinocandinas: afetam a síntese da parede celular
- ❖ Análogos da pirimidina: bloqueiam a síntese de DNA

## **Polienos**

A anfotericina B (AmB) e a nistatina são dois dos fármacos pertencentes a esta classe, sendo que vou abordar apenas a anfotericina visto esta ter um papel essencial no tratamento das IFI.

A AmB foi desenvolvida em 1950, sendo por isso um dos fármacos mais antigos, não deixando de ser um fármaco de eleição, devido ao seu amplo espectro de ação. Este fármaco é desenvolvido a partir de *Streptomyces nodosus* e tem como alvo o ergosterol presente na membrana celular. A ligação a este permite a formação de poros que vão possibilitar um efluxo de eletrólitos e outras moléculas, perturbando assim a membrana e, causando a morte do fungo (Carmona & Limper, 2017).

A AmB apresenta elevada eficácia dado o seu amplo espectro de ação. Demonstra efeito sobre a maioria das espécies *Candida* e *Aspergillus*, *Cryptococcus neoformans*, *Mucorales*, fungos dimórficos como *Histoplasma*, *Blastomyces* e a levedura *Trichosporon* spp. É raro existir resistência a este agente, mas quando ocorre deve-se ao facto de existir uma diminuição da síntese do ergosterol ou à síntese de esteróis alternativos que não têm afinidade para o composto em questão. As espécies resistentes e conhecidas a este fármaco são *Aspergillus terreus*, *Candida lusitanae*, *Scedosporium* spp, como se pode ver na Tabela 10 (Rex & Pfaller, 2002; Thompson et al., 2009).

No entanto, este agente para além da afinidade para o ergosterol, tem também para o colesterol presente nas células dos mamíferos. Ainda que esta afinidade seja mínima provoca danos celulares que se vão traduzir em toxicidade e efeitos adversos no hospedeiro, especialmente nefrotoxicidade (Lemke, Kiderlen, & Kayser, 2005). A AmB é muito mal absorvida ao longo do trato gastrointestinal pelo que tem de ser administrada via IV. O desoxicolato é adicionado de forma a melhorar a sua solubilidade, no entanto este confere-lhe nefrotoxicidade (Campoy & Adrio, 2017; Carmona & Limper, 2017).

De forma a contornar esta toxicidade foram desenvolvidas formulações lipídicas da AmB, visto terem um melhor perfil a nível de segurança e toxicidade, diminuindo também as reações associadas à perfusão da AmB convencional como calafrios, vômitos, náuseas, febre, hipotensão e broncoespasmo.

As 3 formulações desenvolvidas são Anfotericina B lipossômica (Ambissome®), complexo lipídico (Abelcet®) e dispersão coloidal ( Amphocil®) (Tang, Clemons, Katzenstein, & Stevens, 2015). Estas formulações apesar de ainda apresentarem alguma toxicidade, esta é bastante inferior à apresentada com a AmB convencional. Segundo Wilcock, Endo, Uno, & Burke,( 2013) estes derivados da anfotericina B convencional são menos tóxicos devido à deleção do grupo hidroxilo C'2, o que faz com que estes se liguem apenas ao ergosterol e não ao colesterol presente nas células do mamífero.

### Azóis

Os azóis à semelhança dos polienos desempenham o seu papel a nível da membrana celular, nomeadamente na síntese do ergosterol que é o seu maior componente. O seu mecanismo de ação passa pela inibição da enzima dependente do citocromo P-450, nomeadamente a nível da 14- $\alpha$ -desmetilase que é codificada pelo gene *ERG11*, responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol. Desta forma vai ocorrer inibição do crescimento e replicação do fungo, após acumulação de produtos tóxicos resultantes da inibição, com alteração da permeabilidade da membrana (Carmona & Limper, 2017; Thompson et al., 2009).

As diferenças encontradas a nível de potência e espectro entre os agentes deve-se à afinidade que estes têm para a enzima.

Os azóis podem ser divididos em imidazóis e triazóis consoante o seu número de átomos de nitrogénio, no anel de 5 membros. Os primeiros a serem desenvolvidos foram os imidazóis (clotrimazol, cetoconazol, miconazol) mas devido à sua elevada toxicidade e inúmeras interações estes foram substituídos pelos triazóis. Estes podem ser classificados em primeira ou segunda geração (Campoy & Adrio, 2017). Os triazóis são todos fungistáticos com a exceção do voriconazol, que se pode apresentar fungicida para as espécies de *Aspergillus* (Carmona & Limper, 2017).

Da primeira geração fazem parte o fluconazol e itraconazol. Relativamente aos imidazóis, estes apresentam um melhor perfil de segurança e um espetro de ação mais amplo. O espetro de ação entre os dois difere um pouco, na medida em que o fluconazol tem

atividade contra as espécies de *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma* spp, não tendo atividade contra os fungos filamentosos. Por sua vez, o itraconazol tem um espectro mais amplo, sobre espécies de *Aspergillus* e outros fungos filamentosos. No entanto, o desenvolvimento de resistências é frequente, muito devido ao facto de serem fungistáticos em vez de fungicidas. Com exceção do voriconazol que pode ser fungicida contra *Aspergillus*, todos os restantes azóis são fungistáticos, como referido anteriormente, o que se traduz numa desvantagem, devido às resistências criadas assim como à recorrência das infeções (Campoy & Adrio, 2017; Carmona & Limper, 2017; Shukla, Singh, Yadav, Pandey, & Bhunia, 2016).

O voriconazol e posaconazol, aprovados em 2002 e 2006, respetivamente pela FDA, foram desenvolvidos de forma a melhorar a farmacocinética, a diminuição das interações e o espectro de atividade, fazendo parte da segunda geração de triazóis. Ambos os fármacos necessitam de ciclodextrinas, devido à sua fraca solubilidade em água, pelo que lhes é conferida nefrotoxicidade (Campoy & Adrio, 2017).

Em 2015 a FDA aprova uma substância inovadora com excelentes resultados no tratamento da aspergilose e mucormicose invasivas. Trata-se de um pró-fármaco solúvel em água que deriva do isavuconazol, a que se deu o nome de sulfato de isovuconazonio.

Uma característica que o diferencia e lhe confere vantagem é o facto de não necessitar de ciclodextrina, um potente nefrotóxico, devido à sua elevada solubilidade. Após administração IV, este pró-fármaco é rapidamente metabolizado em isacuvonazol, através das esterases plasmáticas. Contudo há que ter cuidado pois o facto de ser substrato e concomitantemente inibidor da CYP3A4, podem existir interações aquando a co-administração de inibidores/indutores da CYP3A4.

Este fármaco apresenta atividade alargada contra as espécies de *Candida* resistentes aos azóis; *C. neoformans* e *C. gattii*, *Aspergillus*, fungos dimórficos e outros fungos filamentosos como *Alternaria* spp. Na Tabela 8 podem ver-se as principais características farmacocinéticas entre os vários azóis.

**Tabela 8:** Propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos vários azóis (Adaptado de Falci & Pasqualotto, 2013)

Parâmetro	Antifúngico				
	Isavuconazol	Voriconazol	Itraconazol	Posaconazol	Fluconazol
Formulação	Oral e IV	Oral e IV	Oral	Oral	Oral e IV
Biodisponibilidade	Muito alta	Até 95%	30% cápsula 50% solução	Não aplicável	95%
Ligação às proteínas	98%	58%	>99%	99%	10%
Efeito da alimentação	Sem efeito	Efeito negativo	Positivo em cápsulas Negativo para a solução	Efeito positivo	Efeito negativo
Volume de distribuição (L/Kg)	Alto (4.4- 7.7)	Alto (4.6)	Muito alto (10.7)	Alto (6.5)	Baixa (0.7)
Penetração no SNC	Baixa no FCE Alta no cérebro	Alta (>50%)	Baixa (<10%)	Baixa	Alta (>60%)
Depuração	Baixa (1.9- 2.8)	Alta (8.4)	Muito alta (15.9)	Muito alta (21.7)	Baixa (1.2)
Tempo de semi-vida (h)	56-104	6-12	24-30	16-35	24-30
Interação entre medicamentos	Moderada	Alta	Alta	Moderada	Moderada

**Legenda:** LCR: líquido cefalorraquidiano; h: horas; L/Kg: Litro/quilo

### Equinocandinas

As equinocandinas são a classe terapêutica mais recentemente desenvolvida para o tratamento de infecções fúngicas. É a única classe que tem como alvo terapêutico a parede celular das células fúngicas, tendo uma ação a nível do 1,3,β- D-Glucano. Visto que este componente existe exclusivamente nas células fúngicas, é uma classe menos tóxica na medida em que não afeta as células humanas (Walker et al., 2011).

As três equinocandinas disponíveis são lipopéptidos semi-sintéticos que derivam de produtos naturais fúngicos. A micafungina deriva do *Aspergillus nidulans var echinulatus*; a caspofungina vem da pneumocandina B que é produzida pela *Glarea lozoyensis* e a anidulafungina da *Coleophoma empetri* (Eschenauer, Depestel, & Carver, 2007).

Apesar de serem a nível farmacodinâmico muito semelhantes entre si, a nível da farmacocinética apresentam bastantes diferenças, o que lhes confere diferentes propriedades, como ilustrada na Tabela 9.

A nível das espécies de *Candida*, as equinocandinas têm uma atividade fungicida, o que lhes confere uma boa opção no tratamento de candidíase invasiva. Por sua vez, contra as espécies de *Aspergillus* a atividade limita-se a ser fungistática, sendo apenas usado de forma alternativa/ 2ª linha. Não possuem atividade contra *Cryptococcus*, *Mucorales*, *Fusarium* ou fungos dimórficos (Nett & Andes, 2016).

Devido ao seu elevado peso molecular e instabilidade a nível gástrico, a formulação oral não é possível, estando apenas disponível a nível IV. Como têm tempos de semi-vida baixos é necessária uma administração diária, o que implica idas diárias ao hospital. Apesar de serem consideradas uma classe mais segura e menos tóxica, foram relatados alguns efeitos adversos a nível cardíaco, como arritmias e insuficiência cardíaca, com a administração de caspofungina. Com a anidulafungina foi observada instabilidade hemodinâmica fatal, pelo que é muito importante a monitorização em pacientes com comorbidades cardíacas (Fink et al., 2013; Stover, Farley, Kyle, & Cleary, 2014).

Visto não se tratarem de substratos/inibidores da CYP450 as interações fármaco-fármaco são muito raras, o que lhes confere uma grande vantagem em relação às outras classes, para além de terem como alvo, um composto exclusivamente fúngico (Y. L. Chang, Yu, Heitman, Wellington, & Chen, 2017).

**Tabela 9:**Propriedades farmacocinéticas das equinocandinas. Adaptado de (Azanza Perea, 2016)

Parâmetros	Caspofungina	Anidulafungina	Micafungina
Biodisponibilidade	<10 %	<10%	<10%
Vd (L/kg)	0,14	0,22	0,5
t <sub>1/2</sub> (h)	9-11	11-17	24--26
Ligação às proteínas	>95%	>95%	>95%
Eliminação urinária	1,4%	<15	<1%

**Legenda:** Vd: Volume de distribuição

### **Análogos da pirimidina**

A flucitosina faz parte dos análogos da pirimidina, não tendo por si uma atividade antifúngica, mas quando é absorvida pelas células fúngicas, a enzima citosina desaminase encarrega-se de a transformar no metabolito ativo, 5-fluorouracilo (5-FU). Este posteriormente vai ser incorporado no DNA e seguidamente no RNA, interferindo e impedindo a sua síntese. Tem um amplo espectro contra vários organismos, tais como a maioria das espécies de *Candida*, *C. neoformans* e algumas espécies de *Aspergillus* (Carmona & Limper, 2017).

De salientar que não deve ser administrado em monoterapia pelo elevado risco de aquisição de resistência, sendo sempre associado a outros agentes, com especial destaque à AmB (Stott & Hope, 2017).

### **5.2 Resistências adquiridas às várias classes antifúngicas**

Com o intuito de melhorar a sua capacidade de sobrevivência e permitir o crescimento há, por parte dos organismos, o desenvolvimento de mecanismos de resistência, que se baseiam em:

- 1) Diminuição efetiva da concentração de fármaco
- 2) Alteração do alvo terapêutico
- 3) Modificações do metabolismo de forma a contornar os efeitos tóxicos

A falha de resposta à terapêutica depende de vários fatores que podem ser intrínsecos (resistência própria do organismo) ou extrínsecos (resistência adquirida pelo hospedeiro). Um microrganismo define-se resistente quando os valores de concentração mínima inibitória (CMI) do fármaco ultrapassam os valores de suscetibilidade para esse organismo. A resistência denomina-se intrínseca quando o organismo tem ausência das estruturas alvo da molécula. Por sua vez, a resistência é designada extrínseca quando depende da alteração de genes e da exposição a esse antifúngico (Cowen, Sanglard, Howard, Rogers, & Perlin, 2015; Sanglard, 2016).

Um dos grandes motivos para o aparecimento das resistências prende-se no facto de o número de pacientes imunocomprometidos ser cada vez maior, pois a estes doentes, os

fármacos antifúngicos são administrados de forma profilática e empírica perante o mau prognóstico que lhes está associado (Zilberberg & Shorr, 2009).

A avaliação da resistência pode ser avaliada através de métodos definidos por *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) que envolvem testes padrão de suscetibilidade antifúngica para leveduras e fungos filamentosos, que se baseia na medição da CMI. Estão padronizados valores para a maioria de leveduras e fungos filamentosos, o que torna este método viável. Estes dois métodos são bastante utilizados em laboratórios especializados, enquanto que nos laboratórios de microbiologia de rotina se recorra a kits comerciais como Etest® ou Sensititre YeastOne®, ou Vitek® em caso de sistema automatizado (Perlin, Rautemaa-Richardson, & Alastruey-Izquierdo, 2017).

Na classe dos azóis, os mecanismos diferem consoante a espécie resistente. No caso do género *Candida*, são possíveis quatro mecanismos, e para a espécie *Aspergillus* estão descritos três.

No caso das espécies *Candida* a resistência adquirida pode dever-se a vários mecanismos. Um deles ocorre pelo aumento do efluxo do fármaco através da ativação dos genes *CDR1* e *CDR2* (*ATP binding cassette transportes*) e *MDR1* (*major facilitators*), o que leva a uma diminuição da concentração do fármaco. De salientar que os genes *CDR* estão implicados em vários azóis, e os genes *MDR1* restringem-se à resistência causada pelo fluconazol. O segundo e terceiro mecanismos estão correlacionados, sendo que ao ocorrer mutações no gene *ERG11*, que é responsável pela codificação da 14- $\alpha$ -desmetilase (enzima alvo), pode diminuir a afinidade para o antifúngico, tal como acontece quando existe a sua sobre expressão. O último mecanismo está implicado na perda de função dos esteróis da membrana a nível do gene *ERG3*. De salientar que estes mecanismos podem ocorrer de forma isolada, sequencial ou em simultâneo. Sem esquecer que *C. krusei* apresenta resistência intrínseca ao fluconazol e que *C. glabrata* tem uma suscetibilidade reduzida ao mesmo (Freitas & Frade, 2014; Perlin et al., 2017).

Por sua vez, os mecanismos adotados pelas espécies de *Aspergillus* consistem em mutações pontuais no gene *CYP51A* que vão provocar alterações na enzima alvo. Pode ocorrer um aumento da expressão dos genes que codificam as bombas de efluxo assim como mutações na zona promotora do gene *CYP51A* que se pensa estar relacionado com o uso de antifúngicos a nível agrícola (Perlin et al., 2017).

A nível das equinocandinas, os mecanismos envolvidos baseiam-se essencialmente em mutações a nível dos genes *FKS* que têm um papel importante na síntese do glucano, mais especificamente a nível das regiões SER 645 e Phe 641 (Y. L. Chang et al., 2017).

Na Tabela 10 estão representadas as várias espécies e respetivas resistências aos agentes antifúngicos.

**Tabela 10:** Espécies fúngicas e respetivas resistências aos fármacos. Adaptado de (Thompson, Cadena, & Patterson, 2009).

Organismo	AMB	FLU	ITR	POS	VOR	ANI	MFG	CAS	5FC
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>Aspergillus flavus</i>	+/-	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>Aspergillus terreus</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>Aspergillus niger</i>	+	-	+/-	+	+	+	+	+	-
<i>Aspergillus nidulans</i>	+	-	+/-	+	+	+	+	+	-
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida glabrata</i>	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+
<i>Candida krusei</i>	+	-	+/-	+	+	+	+	+	+/-
<i>Candida tropicalis</i>	+	+		+	+	+	+	+	+
<i>Candida parapsilosis</i>	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+	+
<i>Candida guilliermondii</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	+
<i>Candida lusitanae</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cryptococcus spp</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	+
<i>Mucorales</i>	+/-	-	-	+	-	-	-	-	-

**Legenda:** AMB: Anfotericina B; FLU: Fluconazol; ITR: Itraconazol; POS: Posaconazol; VOR: Voriconazol; ANI: Anidulafungina; MFG: Micafungina; CAS: Casofungina; 5FC: Flucitosina

(+) possui atividade antifúngica; (-) atividade antifúngica inexistente ou limitada; (+/-): atividade antifúngica variável

### 5.3 Outras abordagens de tratamento

Dados os maus prognósticos que estão associados às infeções fúngicas invasivas, e como o diagnóstico se revela lento e inviável em certos pacientes mais debilitados, é desejável implementar outras abordagens como a profilaxia ou terapia preventiva, quando não é possível começar com a terapia dirigida.

- Terapia Profilática

Quando existem pacientes de alto risco, mas que não apresentam sinais/sintomas clínicos é lhes administrado um fármaco de forma a prevenir o desenvolvimento de infeções

invasivas. O agente profilático mais utilizado é o fluconazol, mas dada a sua aptidão para criar resistências, as equinocandinas tornam-se agora uma opção válida, ainda que esta prática não seja abordada em todas as UCI (Paramythiotou et al., 2014).

Esta estratégia é aplicada em várias UCI, quando se tratam de pacientes com alto risco para candidíase ou aspergilose invasiva pela IDSA, com resultados positivos. No caso da profilaxia para a candidíase invasiva em pacientes das UCI, as recomendações segundo a IDSA são o uso de fluconazol ou equinocandinas. Para além disso o recurso a banhos corporais diários com clorhexidina também pode ser adotado no caso de candidemia, ainda que apresente uma recomendação fraca (Pappas et al., 2015). No caso dos indivíduos com neutropenia prolongada e com elevado risco para aspergilose invasiva, o posaconazol é o agente preferido, sendo também possível o uso de voriconazol ou micafungina, segundo as mais recentes diretrizes da IDSA (Patterson et al., 2016).

No entanto, há sempre dificuldade na identificação dos pacientes de alto risco, podendo haver a aplicação deste procedimento a pacientes que não necessitavam (Kerwat, Rolfes, & Wulf, 2011). Nem sempre é vantajoso iniciar terapia profilática na medida em que pode mascarar processos de controlo de infeção, especialmente quando os indivíduos possuem cateter venoso central (CVC) (Zilberberg & Shorr, 2009).

- Terapia Empírica

A terapia empírica envolve uma abordagem precoce para pacientes de alto risco com sinais de infeção não específicos e sem causa aparente como febre que não respondem à terapia antibiótica, assim como sem quaisquer resultados positivos em métodos de diagnóstico. No caso de suspeita para infeções por *Candida*, as diretrizes IDSA recomendam para pacientes não neutropénicos primeiramente o uso de equinocandinas, ou fluconazol ou ainda a formulação lipídica de anfotericina B (Pappas et al., 2015).

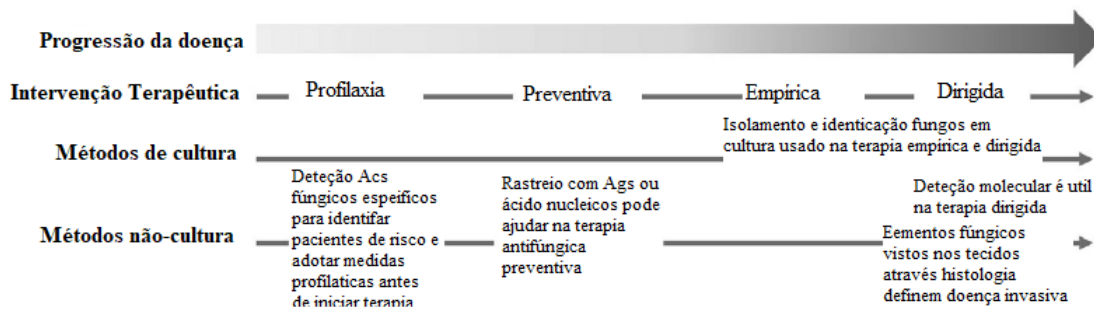
No caso de suspeita de infeções por *Aspergillus*, os agentes recomendados na terapia empírica são a formulação lipídica de anfotericina B, equinocandinas (micafungina ou caspofungina) ou voriconazol (Patterson et al., 2016).

▪ Terapia Preventiva

Esta abordagem revela-se uma boa tática na gestão das IFI, em especial nas UCI, na medida em que limita o número de pacientes expostos à terapia antifúngica permitindo ainda uma intervenção no início da doença. Esta técnica baseia-se na utilização de marcadores de diagnóstico antes do início de sintomas/sinais clínicos. Ao ser feita vigilância através de técnicas de imagem, serologia entre outras, pode iniciar-se logo terapêutica dirigida aquando o aparecimento dos primeiros sinais de doença ou na persistência das evidências dos marcadores (Zilberberg & Shorr, 2009) .

Num estudo realizado por Hanson et al. (2012) foi utilizado o marcador (1,3)- $\beta$ -D-glucano como orientador da terapia preventiva em pacientes das UCI, onde se recorreu à prevenção com anidulafungina, o que demonstra a viabilidade do uso de marcadores neste tipo de terapia.

Na Figura 9 estão representadas as várias estratégias adotadas, em função da progressão da doença.



**Figura 9:** Cronologia entre diagnóstico e tratamento nas IFI. Adaptado de (Powers-Fletcher & Hanson, 2016)

**5.4 Combinação de terapêuticas**

A combinação de vários fármacos no tratamento das IFI, comparativamente com a monoterapia é vantajosa. Pode permitir um atraso ou até o impedimento do desenvolvimento de resistências, na medida em que consegue diminuir a carga fúngica muito mais rápido. Sem esquecer que é mais complicado existirem mutações numa combinação de agentes, do que com o uso de apenas um agente. Fora isso permite um

efeito terapêutico mais eficaz e amplo, devido à sinergia criada pelos vários agentes, que não é conseguida quando se utiliza apenas uma classe. As combinações foram avaliadas *in vivo*, *in vitro* e em contextos clínicos, de forma a serem aprovadas (Spitzer, Robbins, & Wright, 2017).

- *Candida spp*

Para o tratamento das infeções causadas por estas espécies podem ser utilizadas várias classes como azóis, equinocandinas ou AmB em monoterapia. Não é aconselhável o uso de combinações. De acordo com as diretrizes da IDSA de 2016, as equinocandinas são os agentes antifúngicos na terapia primária, devido à sua atividade fungicida contra a maioria das espécies *Candida*. Como alternativa, o fluconazol pode ser utilizado. No caso de CI, não estão aprovadas combinações de antifúngicos (Pappas et al., 2015).

- *Aspergillus spp*

Numa abordagem inicial o voriconazol é o fármaco de primeira linha na AI, no entanto, com o aparecimento do isavuconazol também este tem aprovação para o tratamento da AI. Por sua vez, as equinocandinas são consideradas terapia de resgate, mas dada a sua atividade fungistática, os prognósticos não são os melhores. Dada a falta de dados suficientes que comprovem o uso de combinações no tratamento da AI, esta só é utilizada em pacientes de alto risco (Cadena et al., 2016).

- *Cryptococcus spp*

O uso de terapia combinada nas infeções por *Cryptococcus* está bem estabelecido pelo que é vantajoso a sua utilização. O uso combinado de flucitosina com AmB está indicado no tratamento da meningite criptocócica estando definido pelas guidelines da IDSA e da OMS (Perfect & Bicanic, 2015).

- *Mucorales* spp

No tratamento das infecções por *Mucorales* não está aprovado o uso simultâneo de dois antifúngicos. Geralmente a abordagem utilizada consiste na utilização de um antifúngico associado ao desbridamento cirúrgico. A anfotericina B lipossômica é o agente escolhido como primeira linha. Em caso de doentes refratários ou intolerantes a esta terapia, o posaconazol é o escolhido, para a terapia de resgate, sendo que o local da infecção não interfere na taxa de resposta (Arif & Perfect, 2017; Koehler, Tacke, & Cornely, 2014).

A cirurgia assume um papel determinante nas mucormicoses, pois dado o seu caráter angioinvasivo que resulta na trombose e necrose dos tecidos, comprometendo a penetração dos antifúngicos, torna-se crucial a remoção dos tecidos desvitalizados. Para além disso, existem alguns dados, ainda que limitados, acerca do uso de agentes quelantes de ferro. Estes estão apoiados no facto de o ferro desempenhar um papel importante a nível do crescimento e metabolismo dos *Mucorales*.

Em suma, as estratégias a adotar em caso de mucormicoses residem em três aspetos: revisão da doença subjacente, terapia com recurso à anfotericina B lipossômica e desbridamento cirúrgico (Arif & Perfect, 2017).

### **5.5 Opções terapêuticas futuras**

De forma a contornar as limitações existentes nos agentes antifúngicos atuais, têm sido realizadas investigações onde se procuram alvos diferentes dos que existem no mercado, sendo eles a nível do ergosterol, do 1,3- $\beta$ -D-Glucano e do DNA. Estas novas abordagens podem revelar-se muito vantajosas na medida em que as toxicidades e interações podem não ocorrer, assim como as resistências verificadas com as outras classes. Para tal os novos alvos a desenvolver devem ser únicos para além de permitirem a viabilidade celular (Mazu, Bricker, Flores-Rozas, & Ablordeppey, 2016; Wiederhold, 2017).

- Biossíntese de glicosilfosfatidilinositol (GPI)

AX001 (Amplix Pharmaceuticals, San Diego, CA, USA) é um novo agente que a partir da inibição da inositol aciltransferase, mediada pela enzima fúngica conservada Gwt1, previne a maturação das proteínas ligadas ao GPI. Estas por permitirem a adesão dos agentes nas mucosas e superfícies epiteliais, a formação de biofilmes e o crescimento de hifas, são determinantes a nível da colonização/infeção.

A principal vantagem desta molécula é que atua unicamente nas células fúngicas visto não ter qualquer atividade na acilação das células humanas.

O seu espectro de ação é bastante alargado na medida em que permite atuar contra *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Scedosporium*. Não possui atividade contra *C. krusei* e *Mucorales*, mas demonstrou eficácia *in vivo* para as espécies de *Candida* resistentes às equinocandinas e azóis

Esta molécula recebeu pela FDA a designação de medicamento órfão e *Qualified Infectious Disease Product (QIDP)*, estando agora em ensaios de fase 1 das formulações orais e intravenosas, para a avaliação da segurança e tolerabilidade (Gonzalez-Lara, Sifuentes-Osornio, & Ostrosky-Zeichner, 2017a; Wiederhold, 2017).

- Biossíntese da pirimidina

O agente F901318 faz parte da classe das orotomidas e tem a capacidade de inibir uma enzima oxidoreductase, a diidroorotato desidrogenase que interfere na biossíntese da pirimidina. Apesar desta enzima se encontrar nas células mamíferas, este agente parece ter apenas atividade contra fungos. Os principais fungos para o qual este agente demonstrou ter eficácia *in vitro* são *Aspergillus*, *Scedosporium*, *Blastomyces dermatitidis*, no entanto, sem eficácia contra leveduras e *Mucorales*. Este Agente recebeu pela European Medicines Agency (EMA) a designação de medicamento órfão para o tratamento da AI (Gonzalez-Lara, Sifuentes-Osornio, & Ostrosky-Zeichner, 2017b; Wiederhold, 2017).

- Sideróforos

Dado que o ferro é fulcral para a viabilidade dos microrganismos, se este for assimilado deixa de estar disponível para os agentes patogénicos, pelo que pode ser uma boa estratégia. Os sideróforos são quelantes de ferro, pelo que conseguem eliminar o ferro disponível em vários organismos como plantas, fungos e bactérias. Desta forma, conseguem eliminar o ferro que possa estar presente nos hospedeiros que os agentes patogénicos possam estar a infetar.

VT-2397, antes designado ASP2397, é isolado de *Acremonium* e permite a quelação de alumínio e foi desenvolvido pela Vical Pharmaceuticals (San Diego, CA, USA) demonstrando atividade contra *A. fumigatus* resistentes aos azóis (Wiederhold, 2017).

## 5.6 Novas moléculas com base nos mesmos alvos

- Azóis

Estão em desenvolvimento duas moléculas VT-1161 e VT-1129 que são metaloenzimas e que tal como os azóis inibem a 14- $\alpha$ -desmetilase, sendo direcionadas para o tratamento das infeções por *Candida* e meningite criptocócica, respetivamente. O que as diferencia dos azóis atuais é a melhor seletividade, não se ligando ao CYP5 humano, pelo facto de possuírem na sua estrutura uma fração de tetrazol, em vez de triazol ou imidazol, presente nos agentes disponíveis no mercado (Gonzalez-Lara et al., 2017b).

- Equinocandinas

As equinocandinas atuais só estão disponíveis na formulação IV. A molécula SCY-078 (antes MK-3118) são derivados da enfumafungina e que têm a vantagem de estar disponíveis na formulação oral. Esta apresenta atividade contra várias espécies de *Candida* e para além disso também para as espécies resistentes ao fluconazol e em isolados com mutação a nível dos genes *FKS1/FKS2*, que conferem resistência às

equinocandinas. Esta molécula demonstrou espectro de ação equiparável às equinocandinas comerciais, com destaque para a *C. glabrata* onde apresentou eficácia oito vezes maior. Para além disso, estudos recentes demonstraram atividade contra a nova espécie *C. auris* (Y. L. Chang et al., 2017; Gonzalez-Lara et al., 2017a; Wiederhold, 2017).

A molécula CD101 (antes SP3025) também faz parte das equinocandinas e apresenta melhor solubilidade e menos toxicidade, devido a uma modificação a nível da colina. Fora estas propriedades também demonstra um tempo de semi-vida muito maior, podendo ser administrado de forma mais espaçada. atividade contra espécies de *Candida* e *Aspergillus* (Gonzalez-Lara et al., 2017a).

- Polienos

A molécula MAT2203 (Matina BioPharma Holdings, Inc, USA) é uma versão da anfotericina B veiculada por nanopartículas que permite uma formulação oral e que foi aprovada pela FDA em agosto de 2015 para o tratamento da candidíase e aspergilose invasivas. No ensaio de fase 1 demonstrou perfil de segurança e tolerabilidade positivos (Gonzalez-Lara et al., 2017b)

A tabela seguinte (Tabela 11) estão representadas as características das moléculas em desenvolvimento.

**Tabela 11:** Fármacos em desenvolvimento para as infecções fúngicas. Adaptado de Gonzalez-Lara, Sifuentes-Osornio, & Ostrosky-Zeichner, 2017

Agente	Mecanismo	Vantagens	Aplicação
<b>VT-1161</b>	Inibidor de lanosterol demetilase	Fração de tetrazol apresenta elevada afinidade com o fungo CYP51	Candidíase
<b>VT-1129</b>	Inibidor de lanosterol demetilase	Fração de tetrazol apresenta elevada afinidade com o fungo CYP51	Meningoencefalite criptocócica
<b>SCY-078</b>	Inibidor da síntese de glucano	Biodisponibilidade oral Ativo independentemente das mutações de resistência	Candidíase invasiva
<b>CD101</b>	Inibidor da síntese de glucano	Toxicidade reduzida Tempo de semi-vida alargada	Candidíase invasiva Aspergilose
<b>MAT2203</b>	Ligação do ergosterol, formação de poros na membrana fúngica, efluxo de K e Mg, resultando na morte da célula	Biodisponibilidade oral Toxicidade reduzida Largo espectro de ação	Candidíase invasiva Aspergilose
<b>APX001</b>	Inibidor de Gwt1, Síntese proteína ancorada GPI	Alvo fúngico específico Afeta vários fatores de virulência	Infeções de <i>Candida e Aspergillus</i>
<b>F901318</b>	Inibidor da diidroonato desidrogenase <b>Facilita a síntese de pirimidina</b>	Alvo fúngico específico Antifúngico de largo espectro de ação	Fungos dimórficos Scedosporium Fusarium spp

## *6. Medidas preventivas*

## 6. Medidas preventivas

Os avanços tecnológicos trouxeram melhorias a nível dos cuidados de saúde, quer a nível de diagnóstico como de tratamento, com o uso de dispositivos invasivos e recurso à quimioterapia, no entanto, todas estas práticas são fatores de risco para o desenvolvimento de infeções nosocomiais. Dado que estas têm grande impacto a nível das taxas de mortalidade, para além dos encargos subjacentes, é crucial que se adotem medidas que previnam a emergência destas infeções a nível dos cuidados de saúde, tendo em conta o agente patogénico (Pemán & Salavert, 2013a).

Torna-se essencial o conhecimento da epidemiologia das infeções fúngicas, a nível hospitalar, de forma a estabelecer os planos de ação preventivos necessários. No entanto é fulcral os dois aspetos seguintes:

- 1) Reconhecimento dos pacientes críticos para as várias infeções, assim como os fatores de risco inerentes e os períodos mais críticos, sem esquecer os padrões de resistência existentes.
- 2) Estabelecimento de mecanismos que evitem a exposição permanente aos agentes patogénicos através da criação de instalações apropriadas e controlo de qualidade de ar e água dentro e fora das instalações hospitalares.

As medidas preventivas a adotar têm de ter em conta o modo de transmissão do agente envolvido, pois pressupõem diferentes meios de ação.

Em relação às infeções causadas por *Candida*, estas são geralmente de origem endógena, podendo, no entanto, resultar da contaminação cruzada através das mãos dos profissionais de saúde, familiares e dispositivos médicos. Por isso as medidas de precaução consistem essencialmente na higiene das mãos e na prevenção das infeções associadas aos cateteres intravasculares. Relativamente à higienização das mãos a Direção Geral de Saúde (DGS)emitiu em 2010 uma circular normativa para a Orientação de Boa Prática para a Higiene das Mãos nas Unidades de Saúde (Saúde, 2010). Por sua vez as diretrizes existentes para a prevenção de infeções relacionadas com cateteres intravasculares esclarecem as seguintes medidas: 1) Educação e treino dos profissionais de saúde que inserem e fazem a manutenção dos cateteres; 2) Uso máximo de barreiras estéreis

aquando a inserção do cateter; 3) uso de cloro-hexidina >0,5% como antisséptico da pele; 4) evitar a substituição rotineira do cateter como forma estratégica de prevenção de infecção; 5) revisão diária da necessidade da via central e remoção das vias desnecessárias e o uso de antisséptico/antibiótico impregnado no cateter, quando a taxa de infecção não diminui. (O'Grady et al., 2002) Para além destas medidas preventivas, é recomendado o uso de terapia profilática para contornar a causa endógena (Pemán & Salavert, 2013b).

No caso das infeções causadas por *Aspergillus* a prevenção consiste essencialmente no controlo da infeção a nível ambiental, visto a infeção ser tradicionalmente adquirida pela inalação de esporos que existem no meio ambiente. Para além disso são muitas vezes encontrados em reservatórios hospitalares como nos sistemas de ventilação, poeiras poluídas durante a construção, plantas, água e carpetes (Munoz, Burillo, & Bouza, 2001).

De acordo com Siegel, Rhinehart, Jackson, & Chiarello, (2007) as salas com ambiente protegido, que existem nas instalações hospitalares devem obedecer a certos requisitos:

- 1) Filtros de partículas de ar de alta eficácia (HEPA) com eficiência de 99,97% para a remoção de partículas de 0,3 µm ou mais;
- 2) Pressão de ar positiva entre a sala e o corredor, tem de ser superior a 2,5 Pa;
- 3) Fluxo de ar direcionado, de forma a que a entrada ocorra num lado e a saída no lado oposto
- 4) Mudanças de ar/hora  $\geq 12$
- 5) Quartos bem selados (janelas e portas isolantes, tetos lisos e livres de fissuras)

Geralmente estas salas de ambiente protegido estão reservadas às salas de bloco operatório, das UCI, de oncologia e transplantes, unidades de diálise e preparações de medicações de injetáveis. Fora isso, todos os responsáveis de saúde devem alertados para manterem um sistema de registo de novos casos de IFI e informar os pacientes críticos para os riscos fora do contexto hospitalar como evitar as zonas de construção, jardins, fumo de tabaco e animais de estimação. (Ruiz-Camps et al., 2010)

## 7. Conclusão

Os avanços que têm ocorrido nos últimos anos a nível dos cuidados de saúde têm sido muitos, o que permitiu aos profissionais de saúde mais ferramentas de diagnóstico e tratamento, para a resolução das necessidades dos doentes. No entanto estes trouxeram algumas desvantagens como o aumento dos indivíduos imunodeprimidos e da incidência das infeções fúngicas invasivas. Estas são particularmente preocupantes nas unidades de cuidados intensivos, pela delicadeza dos indivíduos envolvidos e das metodologias invasivas que lhes são necessárias. As principais condutas inerentes aos indivíduos das UCI passam pela cirurgia, nutrição parentérica total, ventilação mecânica, estadia prolongada e o uso de cateter de acesso venoso central.

Das infeções fúngicas invasivas que mais ocorrem nas UCI destacam-se as leveduras pertencentes ao género *Candida* e *Cryptococcus* e aos fungos filamentosos do género *Mucorales* e *Aspergillus*. Apesar de terem ocorrido modificações a nível da etiologia das IFI, com uma maior prevalência das espécies não *albicans*, *Candida albicans* continua a ser o agente patogénico mais isolado. Portugal, em comparação com outros países europeus apresenta menores taxas de IFI, mas não deixam de constituir um problema para a saúde pública.

O recurso a técnicas tradicionais, como a cultura e histopatologia continua a ser amplamente utilizado e considerado método padrão, ainda que estes métodos sejam invasivos e com muitas limitações a nível de sensibilidade e especificidade. Para contornar estas limitações foram desenvolvidas uma série de metodologias não invasivas, com melhores resultados a nível de rapidez, sensibilidade e especificidade, para além de não serem invasivas, o que se revela muito útil em doentes críticos, sem esquecer que também estas apresentam as suas desvantagens.

O conjunto de medicamentos para o tratamento das IFI é limitado quando comparado com o existente para as infeções bacterianas. No entanto estão em desenvolvimento novas moléculas que se baseiam nos mesmos alvos dos antifúngicos disponíveis, ou noutros novos, encontrando-se em diversas fases dos ensaios clínicos, que se têm revelado promissoras. As classes antifúngicas disponíveis são quatro: os azóis, os polienos, as equinocandinas e os análogos da pirimidina. Estas diferem entre si em muitas propriedades, como farmacocinética, farmacodinâmica, espectro de ação, efeitos adversos

e no perfil de segurança e toxicidade, pelo que é fundamental a escolha mais adequada para cada caso.

Outras abordagens passam pelo tratamento profilático, empírico e preventivo, assim como a combinação das diferentes classes. No entanto, estas nem sempre são indicadas para todo o tipo de infeções.

Concluindo, é crucial a implementação da vigilância epidemiológica em todos os países de forma a ser possível a comparação entre os vários estudos, tendo por base os mesmos parâmetros. A nível das comissões hospitalares é importante que as comissões de controlo de infeção estejam em contínua revisão e que ponham em práticas as últimas diretrizes recomendadas de forma a ter uma melhor gestão dos recursos hospitalares.

## 8. Bibliografia

- Almeida, F., & Wolf, J. M. (2015). Virulence-Associated Enzymes of, *14*(12), 1173–1185. <https://doi.org/10.1128/EC.00103-15.Address>
- Aminnejad, M., Diaz, M., Arabatzis, M., Castañeda, E., Lazera, M., Velegraki, A., ... Meyer, W. (2012). Identification of Novel Hybrids Between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI and *Cryptococcus gattii* VGII. *Mycopathologia*, *173*(5–6), 337–346. <https://doi.org/10.1007/s11046-011-9491-x>
- Arif, S., & Perfect, J. R. (2017). Emergence of the Molds Other than *Aspergillus* in Immunocompromised Patients. *Clinics in Chest Medicine*, *38*(3), 555–573. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2017.04.014>
- Bassetti, M., & Bouza, E. (2017). Invasive mould infections in the ICU setting: Complexities and solutions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *72*(September), i39–i47. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx032>
- Bassetti, M., Garnacho-Montero, J., Calandra, T., Kullberg, B., Dimopoulos, G., Azoulay, E., ... Cornely, O. A. (2017). Intensive care medicine research agenda on invasive fungal infection in critically ill patients. *Intensive Care Medicine*, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4731-2>
- Benedict, K., Richardson, M., Vallabhaneni, S., Jackson, B. R., & Chiller, T. (2017). Emerging issues, challenges, and changing epidemiology of fungal disease outbreaks. *The Lancet Infectious Diseases*, *3099*(17), 1–9. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30443-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30443-7)
- Binder, U., Maurer, E., & Lass-Flörl, C. (2014). Mucormycosis - from the pathogens to the disease. *Clinical Microbiology and Infection*, *20*(6), 60–66. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12566>
- Bochud, P.-Y., Jason W. Chien, M. D., Kieren A. Marr, M. D., Wendy M. Leisenring, S. D., Arlo Upton, M. D., Marta Janer, P. D., ... M.D. (2009). Toll-like Receptor 4 Polymorphisms and Aspergillosis in Stem- Cell Transplantation. *N Engl J Med.*, *359*(17), 1766–1777. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802629>.Toll-like
- Boral, H., Metin, B., Döğen, A., Seyedmousavi, S., & Ilkit, M. (2017). Overview of

- selected virulence attributes in *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum*, and *Exophiala dermatitidis*. *Fungal Genetics and Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.10.008>
- Byrnes, E. J., Li, W., Lewit, Y., Ma, H., Voelz, K., Ren, P., ... Heitman, J. (2010). Emergence and Pathogenicity of Highly Virulent *Cryptococcus gattii* Genotypes in the Northwest United States. *PLoS Pathogens*, 6(4), e1000850. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000850>
- Cadena, J., Thompson, G. R., & Patterson, T. F. (2016). Invasive Aspergillosis: Current Strategies for Diagnosis and Management. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(1), 125–142. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.015>
- Caggiano, G., Lovero, G., De Giglio, O., Barbuti, G., Montagna, O., Laforgia, N., & Montagna, M. T. (2017). Candidemia in the Neonatal Intensive Care Unit: A Retrospective, Observational Survey and Analysis of Literature Data. *BioMed Research International*, 2017(ii). <https://doi.org/10.1155/2017/7901763>
- Campoy, S., & Adrio, J. L. (2017). Antifungals. *Biochemical Pharmacology*, 133, 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.019>
- Carmona, E. M., & Limper, A. H. (2017). Overview of Treatment Approaches for Fungal Infections. *Clinics in Chest Medicine*, 38(3), 393–402. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2017.04.003>
- Casadevall, A., & Pirofski, L. A. (2004). The weapon potential of a microbe. *Trends in Microbiology*, 12(6), 259–263. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.04.007>
- Chandrasekar, P. (2010). Diagnostic challenges and recent advances in the early management of invasive fungal infections. *European Journal of Haematology*, 84(4), 281–290. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2009.01391.x>
- Chang, W. C., Tzao, C., Hsu, H. H., Lee, S. C., Huang, K. L., Tung, H. J., & Chen, C. Y. (2006). Pulmonary cryptococcosis: Comparison of clinical and radiographic characteristics in immunocompetent and immunocompromised patients. *Chest*, 129(2), 333–340. <https://doi.org/10.1378/chest.129.2.333>
- Chang, Y. L., Yu, S. J., Heitman, J., Wellington, M., & Chen, Y. L. (2017). New facets of antifungal therapy. *Virulence*, 8(2), 222–236.

<https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1257457>

- Christianson, J. C., Engber, W., & Andes, D. (2003). Primary cutaneous cryptococcosis in immunocompetent and immunocompromised hosts. *Medical Mycology*, *41*(3), 177–188. <https://doi.org/10.1080/1369378031000137224>
- Cogliati, M. (2013). Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica*, *2013*(serotype D), 23. <https://doi.org/10.1155/2013/675213>
- Colombo, A. L., de Almeida Júnior, J. N., Slavin, M. A., Chen, S. C. A., & Sorrell, T. C. (2017). *Candida* and invasive mould diseases in non-neutropenic critically ill patients and patients with haematological cancer. *The Lancet Infectious Diseases*, *3099*(17), 1–13. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30304-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30304-3)
- Cowen, L. E., Sanglard, D., Howard, S. J., Rogers, P. D., & Perlin, D. S. (2015). Mechanisms of Antifungal Drug Resistance, 1–22.
- Cuenca-Estrella, M., Bassetti, M., Lass-Flörl, C., Ráčil, Z., Richardson, M., & Rogers, T. R. (2011). Detection and investigation of invasive mould disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *66*(SUPPL. 1), 15–24. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq438>
- Cunha, C., Aversa, F., Lacerda, J. F., Busca, A., Kurzai, O., Grube, M., ... Carvalho, A. (2014). Genetic PTX3 Deficiency and Aspergillosis in Stem-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine*, *370*(5), 421–432. <https://doi.org/10.1056/NEJMoal211161>
- Cunha, C., Rodrigues, F., Zelante, T., Aversa, F., Romani, L., & Carvalho, A. (2011). Genetic susceptibility to aspergillosis in allogeneic stem-cell transplantation. *Medical Mycology : Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, *49* Suppl 1, S137–S143. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.508797>
- Dagenais, T. R. T., & Keller, N. P. (2009). Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, *22*(3), 447–465. <https://doi.org/10.1128/CMR.00055-08>
- Denning, D. W., & Bromley, M. J. (2015). How to bolster the antifungal pipeline.

- Science*, 347(6229), 1414–1416. <https://doi.org/10.1126/science.aaa6097>
- Deorukhkar, S. C., Saini, S., & Mathew, S. (2014). Virulence factors contributing to pathogenicity of candida tropicalis and its antifungal susceptibility profile. *International Journal of Microbiology*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/456878>
- Direção Geral de Saúde. (2003). Programa Nacional de Controlo de Infecção - Relatório 2003, 21.
- Ducel, G., Fabry, J., & Nicolle, L. (2002). Prevenção de infeções adquiridas no hospital - Um guia prático. *Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge*, 93. Disponível em [http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd49/man\\_oms.pdf](http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd49/man_oms.pdf)
- Epelbaum, O., & Chasan, R. (2017). Candidemia in the Intensive Care Unit. *Clinics in Chest Medicine*, 38(3), 493–509. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2017.04.010>
- Eschenauer, G., Depistel, D. D., & Carver, P. L. (2007). Comparison of echinocandin antifungals. *Ther Clin Risk Manag*, 3(1), 71–97. <https://doi.org/10.2147/tcrm.2007.3.1.71>
- Faria-Ramos, I., Neves-Maia, J., Ricardo, E., Santos-Antunes, J., Silva, A. T., Costa-de-Oliveira, S., ... Pina-Vaz, C. (2014). Species distribution and in vitro antifungal susceptibility profiles of yeast isolates from invasive infections during a Portuguese multicenter survey. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33(12), 2241–2247. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2194-8>
- Farmakiotis, D., & Kontoyiannis, D. P. (2016). Mucormycoses. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(1), 143–163. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.011>
- Feng, D., Heffner, R., & Wright, J. (2007). Invasive aspergillosis extensively involving the brain and multiple organs in a bone marrow transplant patient, 7(2), 1–5.
- Fink, M., Zerlauth, U., Kaulfersch, C., Rab, A., Alberer, D., Preiss, P., ... Grimm, G. (2013). A severe case of haemodynamic instability during anidulafungin administration. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 38(3), 241–242. <https://doi.org/10.1111/jcpt.12046>
- Freitas, G., & Frade, P. J. (2014). Agentes antifúngicos. In *Microbiologia Médica Vol.2* (pp. 291–307).

- Freitas, G., & Lopes, M. M. (2014). Diagnóstico laboratorial de infecções fúngicas. In *Microbiologia Médica Vol.2* (pp. 309–327).
- Garbee, D. D., Pierce, S. S., & Manning, J. (2017). Opportunistic Fungal Infections in Critical Care Units. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, 29(1), 67–79. <https://doi.org/10.1016/j.cnc.2016.09.011>
- Giolo, M. P., & Svidzinski, T. I. E. (2010). Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *Jornal Brasileiro de Patologia E Medicina Laboratorial*, 46(3), 225–234. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442010000300009>
- Gonzalez-Lara, M. F., Sifuentes-Osornio, J., & Ostrosky-Zeichner, L. (2017a). Drugs in Clinical Development for Fungal Infections. *Drugs*, 77(14), 1505–1518. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0805-2>
- Gonzalez-Lara, M. F., Sifuentes-Osornio, J., & Ostrosky-Zeichner, L. (2017b). Drugs in Clinical Development for Fungal Infections. *Drugs*, 77(14), 1505–1518. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0805-2>
- Guinea, J., Torres-Narbona, M., Gijón, P., Muñoz, P., Pozo, F., Peláez, T., ... Bouza, E. (2010). Pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: Incidence, risk factors, and outcome. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(7), 870–877. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03015.x>
- Hagen, F., Khayhan, K., Theelen, B., Kolecka, A., Polacheck, I., Sionov, E., ... Boekhout, T. (2015). Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genetics and Biology*, 78, 16–48. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.02.009>
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Hall, L., Le Febre, K. M., Deml, S. M., Wohlfiel, S. L., & Wengenack, N. L. (2012). Evaluation of the yeast traffic light PNA FISH probes for identification of *Candida* species from positive blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), 1446–1448. <https://doi.org/10.1128/JCM.06148-11>
- Hanson, K. E., Pfeiffer, C. D., Lease, E. D., Balch, A. H., Zaas, A. K., Perfect, J. R., &

- Alexander, B. D. (2012). B-D-glucan surveillance with preemptive anidulafungin for invasive candidiasis in intensive care unit patients: A randomized pilot study. *PLoS ONE*, 7(8), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042282>
- Haruta, M., Gray, W. M., & Sussman, M. R. (2015). HHS Public Access. *Current Opinion in Plant Biology*, 28(10), 68–75. <https://doi.org/10.1002/aur.1474>.Replication
- Hoang, L. M. N., Maguire, J. A., Doyle, P., Fyfe, M., & Roscoe, D. L. (2004). Cryptococcus neoformans infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997-2002): Epidemiology, microbiology and histopathology. *Journal of Medical Microbiology*, 53(9), 935–940. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05427-0>
- Hot, A., Maunoury, C., Poiree, S., Lanternier, F., Viard, J. P., Loulergue, P., ... Lortholary, O. (2011). Diagnostic contribution of positron emission tomography with [ 18 F ] fluorodeoxyglucose for invasive fungal infections. *Clinical Microbiology And Infection*, 17, 409–417.
- Hsu, J. L., Ruoss, S. J., Bower, N. D., Lin, M., Holodniy, M., & Stevens, D. A. (2011). Diagnosing invasive fungal disease in critically ill patients. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(4), 277–312. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.581223>
- Huston, S. M., Ngamskulrunroj, P., Xiang, R. F., Ogbomo, H., Stack, D., Li, S. S., ... Mody, C. H. (2016). Cryptococcus gattii Capsule Blocks Surface Recognition Required for Dendritic Cell Maturation Independent of Internalization and Antigen Processing. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 196(3), 1259–71. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501089>
- Karageorgopoulos, D. E., Vouloumanou, E. K., Ntziora, F., Michalopoulos, A., Rafailidis, P. I., & Falagas, M. E. (2011). ??-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: A meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 52(6), 750–770. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq206>
- Kasner, E., Hunter, C. A., Ph, D., Kariko, K., & Ph, D. (2013). NIH Public Access, 70(4), 646–656. <https://doi.org/10.1002/ana.22528>.Toll-like
- Katragkou, A., Walsh, T. J., & Roilides, E. (2014). Why is mucormycosis more difficult to cure than more common mycoses? *Clinical Microbiology and Infection*, 20(6), 74–81. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12466>

- Kerwat, K., Rolfes, C., & Wulf, H. (2011). [Fungal infections in the intensive care unit]. *Anästhesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie: AINS*, 46(11–12), 744–5. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1297181>
- Klich, M. A. (2009). Health effects of *Aspergillus* in food and air. *Toxicology and Industrial Health*, 25(9–10), 657–667. <https://doi.org/10.1177/0748233709348271>
- Koehler, P., Tacke, D., & Cornely, O. A. (2014). Our 2014 approach to candidaemia. *Mycoses*, 57(10), 581–583. <https://doi.org/10.1111/myc.12207>
- Koulenti, D., Garnacho-Montero, J., & Blot, S. (2014). Approach to invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 27(2), 174–183. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000043>
- Kozel, T. R., & Bauman, S. K. (2012). CrAg lateral flow assay for cryptococcosis. *Expert Opinion on Medical Diagnostics*, 6(3), 245–251. <https://doi.org/10.1517/17530059.2012.681300>
- Kullberg, B. J., & Arendrup, M. C. (2015). Invasive Candidiasis. *New England Journal of Medicine*, 373(15), 1445–1456. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1315399>
- Kwon-Chung, K. J., Bennett, J. E., Wickes, B. L., Meyer, W., Cuomo, C. A., Wollenburg, K. R., ... Casadevall, A. (2017). The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *mSphere*, 2(1), e00357-16. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00357-16>
- Kwon-chung, K. J., Fraser, J. A., Doering, T. L., Wang, Z. A., Janbon, G., Idnurm, A., & Bahn, Y. (2016). *gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis, 1–28. [https://doi.org/Kwon-Chung, K. J., Fraser, J. A., Doering, T. L., Wang, Z., Janbon, G., Idnurm, A., et al. \(2014\). Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii, the etiologic agents of cryptococcosis. Cold Spring Harb Perspect. Med. 4:a019760. doi: 10.1101/cshperspect.a019760](https://doi.org/Kwon-Chung, K. J., Fraser, J. A., Doering, T. L., Wang, Z., Janbon, G., Idnurm, A., et al. (2014). Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii, the etiologic agents of cryptococcosis. Cold Spring Harb Perspect. Med. 4:a019760. doi: 10.1101/cshperspect.a019760)
- Lackner, M., Caramalho, R., & Lass-Flörl, C. (2014). Laboratory diagnosis of mucormycosis: current status and future perspectives. *Future Microbiology*, 9(5), 683–95. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.23>
- Lahkar, V., Saikia, L., Patgiri, S. J., Nath, R., & Das, P. P. (n.d.). Estimation of biofilm, proteinase & phospholipase production of the *Candida* species isolated from

- the oropharyngeal samples in HIV-infected patients. [https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR\\_1773\\_14](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1773_14)
- Laín, A., Elguezabal, N., Moragues, M. D., García-Ruiz, J. C., Del Palacio, A., & Pontón, J. (2008). Contribution of serum biomarkers to the diagnosis of invasive candidiasis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 8(3), 315–325. Disponible em: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L351724710%5Cnhttp://www.expert-reviews.com/doi/pdf/10.1586/14737159.8.3.315%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1586/14737159.8.3.315>
- Lamoth, F., & Calandra, T. (2017). Early diagnosis of invasive mould infections and disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(November), i19–i28. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx030>
- Lass-Flörl, C., & Cuenca-Estrella, M. (2017). Changes in the epidemiological landscape of invasive mould infections and disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(September), i5–i11. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx028>
- Leeflang, M. M. G., Debets-Ossenkopp, Y. J., Wang, J., Visser, C. E., Scholten, R. J. P. M., Hooft, L., ... Vandenbroucke-Grauls, C. M. (2015). Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2017(9). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007394.pub2>
- Lehtonen, L., Anttila, V., Ruutu, T., Salonen, J., & Nikoskelainen, J. (1996). Diagnosis of disseminated candidiasis by measurement of urine D-arabinitol / L-arabinitol ratio . *Diagnosis of Disseminated Candidiasis by Measurement of Urine D -Arabinitol / L -Arabinitol Ratio*, 34(9), 2175–2179.
- Lemke, A., Kiderlen, A. F., & Kayser, O. (2005). Amphotericin B. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(2), 151–162. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1955-9>
- Liao, Y., Zhong, M.-K., Xu, H.-B., & Li, L. (2013). Development and validation of a risk score for predicting invasive fungal infectious in an intensive care unit. *Die Pharmazie*, 68(6), 459–64. <https://doi.org/10.1691/ph.2013.2891>
- Lockhart, S. R., Jackson, B. R., Vallabhaneni, S., Ostrosky-Zeichner, L., Pappas, P. G., & Chiller, T. (2017). Thinking beyond the common *Candida* species: Need for speciation of *Candida* due to the emergence of multidrug resistant *Candida auris*.

- Journal of Clinical Microbiology*, (September), JCM.01355-17.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.01355-17>
- Long, B., & Koyfman, A. (2015). Mucormycosis: What emergency physicians need to know? *American Journal of Emergency Medicine*, 33(12), 1823–1825.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajem.2015.08.037>
- López-Martínez, R. (2010). Candidosis, a new challenge. *Clinics in Dermatology*, 28(2), 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.12.014>
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119–128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>
- Maziarz, E. K., & Perfect, J. R. (2016). Cryptococcosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(1), 179–206. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.006>
- Mazu, T. K., Bricker, B. A., Flores-Rozas, H., & Ablordeppey, S. Y. (2016). *The Mechanistic Targets of Antifungal Agents: An Overview. Mini Rev Med Chem* (Vol. 16). <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303790>.The
- McCarty, T. P., & Pappas, P. G. (2016). Invasive Candidiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(1), 103–124. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.013>
- Meersseman, W., Lagrou, K., Maertens, J., & Van Wijngaerden, E. (2007). Invasive aspergillosis in the intensive care unit. *Clinical Infectious Diseases*, 45(2), 205–216.  
<https://doi.org/10.1086/518852>
- Mikulska, M., Calandra, T., Sanguinetti, M., Poulain, D., & Viscoli, C. (2010). The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Critical Care*, 14(6), R222. <https://doi.org/10.1186/cc9365>
- Munoz, P., Burillo, A., & Bouza, E. (2001). Environmental surveillance and other control measures in the prevention of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Infect*, 7 Suppl 2, 38–45. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2001.tb00008.x>
- Nett, J. E., & Andes, D. R. (2016). Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(1), 51–83. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.012>

- O'Grady, N. P., Alexander, M., Dellinger, E. P., Gerberding, J. L., Heard, S. O., Maki, D. G., ... Underwood, M. A. (2002). Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *American Journal of Infection Control*, 30(8), 476–489. <https://doi.org/10.1067/mic.2002.129427>
- O'Meara, T. R., & Andrew Alspaugh, J. (2012). The *Cryptococcus neoformans* capsule: A sword and a shield. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(3), 387–408. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-12>
- Organization, W. H. (2011). Rapid advice: diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children: December 2011. *Geneva: World Health Organization*, (December). Disponível em: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/44786>
- Ostrosky-Zeichner, L. (2012). Invasive mycoses: Diagnostic challenges. *American Journal of Medicine*, 125(1 SUPPL.), S14–S24. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.10.008>
- Ostrosky-Zeichner, L., & Al-Obaidi, M. (2017a). Invasive Fungal Infections in the Intensive Care Unit. *Infectious Disease Clinics of North America*, 31(3), 475–487. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2017.05.005>
- Ostrosky-Zeichner, L., & Al-Obaidi, M. (2017b). Invasive Fungal Infections in the Intensive Care Unit. *Infectious Disease Clinics of North America*. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2017.05.005>
- Pappas, P. G. (2006). Invasive Candidiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 20(3), 485–506. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2006.07.004>
- Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. R., Clancy, C. J., Marr, K. A., Ostrosky-Zeichner, L., ... Sobel, J. D. (2015). Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 62(4), e1–e50. <https://doi.org/10.1093/cid/civ933>
- Paramythiotou, E., Frantzeskaki, F., Flevari, A., Armaganidis, A., & Dimopoulos, G. (2014). Invasive fungal infections in the icu: How to approach, how to treat. *Molecules*, 19(1), 1085–1119. <https://doi.org/10.3390/molecules19011085>
- Park, B. J., Wannemuehler, K. A., Marston, B. J., Govender, N., Pappas, P. G., & Chiller,

- T. M. (2009). Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids*, 23(4), 525–530. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328322ffac>
- Patterson, T. F., Thompson, G. R., Denning, D. W., Fishman, J. A., Hadley, S., Herbrecht, R., ... Bennett, J. E. (2016). Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 63(4), e1–e60. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw326>
- Pauw, B. De, Thomas J. Walsha, Donnellya, J. P., Stevens, D. a., Edwards, J. E., Calandra, T., ... Bennett, J. E. (2008). Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive. *Clin. Infect. Dis*, 46(12), 1813–1821. <https://doi.org/10.1086/588660.Revised>
- Pemán, J., & Salavert, M. (2013b). Epidemiología y prevención de las infecciones nosocomiales causadas por especies de hongos filamentosos y levaduras. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clinica*, 31(5), 328–341. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.02.002>
- Pemán, J., & Salavert, M. (2013a). Epidemiología y prevención de las infecciones nosocomiales causadas por especies de hongos filamentosos y levaduras. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clinica*, 31(5), 328–341. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.02.002>
- Perfect, J. R., & Bicanic, T. (2015). Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. *Fungal Genetics and Biology*, 78, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.10.003>
- Pergam, S. A. (2017). Fungal Pneumonia in Patients with Hematologic Malignancies and Hematopoietic Cell Transplantation. *Clinics in Chest Medicine*, 38(2), 279–294. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2016.12.006>
- Perlin, D. S., Rautemaa-Richardson, R., & Alastruey-Izquierdo, A. (2017). The global problem of antifungal resistance: Prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet Infectious Diseases*, 3099(17), 1–10. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30316-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30316-X)
- Petrikkos, G., Skiada, A., Lortholary, O., Roilides, E., Walsh, T. J., & Kontoyiannis, D.

- P. (2012). Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. *Clinical Infectious Diseases*, 54(SUPPL. 1), 23–34. <https://doi.org/10.1093/cid/cir866>
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(1), 133–163. <https://doi.org/10.1128/CMR.00029-06>
- Pfeiffer, C. D., Fine, J. P., & Safdar, N. (2006). Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin.Infect.Dis.*, 42(1537–6591 (Electronic)), 1417–1427. <https://doi.org/10.1086/503427>
- Posteraro, B., De Carolis, E., Vella, A., & Sanguinetti, M. (2013). MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. *Expert Review of Proteomics*, 10(2), 151–64. <https://doi.org/10.1586/epr.13.8>
- Rajasingham, R., Smith, R. M., Park, B. J., Jarvis, J. N., Govender, N. P., Chiller, T. M., ... Boulware, D. R. (2017). Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(8), 873–881. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30243-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30243-8)
- Ramanan, P., Wengenack, N. L., & Theel, E. S. (2017). Laboratory Diagnostics for Fungal Infections. *Clinics in Chest Medicine*, 38(3), 535–554. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2017.04.013>
- Rex, J. H., & Pfaller, M. A. (2002). Has Antifungal Susceptibility Testing Come of Age ? DEGREE OF CORRELATION BETWEEN IN VITRO AND IN. *Clinical Infectious Diseases*, 35(November), 982–989.
- Richardson, M. (2009). The ecology of the zygomycetes and its impact on environmental exposure. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(SUPPL. 5), 2–9. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02972.x>
- Robbins, N., Wright, G. D., & Cowen, L. E. (2016). Antifungal Drugs: The Current Armamentarium and Development of New Agents. *Microbiology Spectrum*, 4(5), 1–20. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0002-2016>
- Roden, A. C., & Schuetz, A. N. (2017). Histopathology of fungal diseases of the lung. *Seminars in Diagnostic Pathology*. <https://doi.org/10.1053/j.semmp.2017.06.002>
- Ruiz-Camps, I., Aguado, J. M., Almirante, B., Bouza, E., Ferrer Barbera, C., Len, O., ...

- Cuenca-Estrella, M. (2010). Recomendaciones sobre la prevención de la infección fúngica invasora por hongos filamentosos de la Sociedad Española Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica*, 28(3). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.11.007>
- Sabino, R., & Martins, C. (n.d.). INFECÇÃO FÚNGICA EM Fungal infections in Portugal - The sleeping giant.
- Sabino, R., Veríssimo, C., Brandão, J., Alves, C., Parada, H., Rosado, L., ... Pais, C. (2010). Epidemiology of candidemia in oncology patients: a 6-year survey in a Portuguese central hospital. *Medical Mycology*, 48(2), 346–354. <https://doi.org/10.1080/13693780903161216>
- Sabino, R., Veríssimo, C., Brandão, J., Martins, C., Alves, D., Pais, C., & Denning, D. W. (2017). Serious fungal infections in Portugal. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 36(7), 1345–1352. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-2930-y>
- Sanglard, D. (2016). Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. *Frontiers in Medicine*, 3(March), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmed.2016.00011>
- Sasso, M., Roger, C., Sasso, M., Poujol, H., Barbar, S., Lefrant, J.-Y., & Lachaud, L. (2017). Changes in the distribution of colonising and infecting *Candida* spp. isolates, antifungal drug consumption and susceptibility in a French intensive care unit: A 10-year study. *Mycoses*, (March), 1–11. <https://doi.org/10.1111/myc.12661>
- Saúde, D. G. de. (2010). Orientação de Boa Prática para a Higiene das Mãos nas Unidades de Saúde. *Circular Normativa N° 13, 1*, 44.
- Schmiedel, Y., & Zimmerli, S. (2016). Common invasive fungal diseases: an overview of invasive candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, and *Pneumocystis pneumonia*. *Swiss Medical Weekly*, 146(February), w14281. <https://doi.org/10.4414/smw.2016.14281>
- Shepard, J. R., Addison, R. M., Alexander, B. D., Della-Latta, P., Gherna, M., Haase, G., ... Fiandaca, M. J. (2008). Multicenter evaluation of the *Candida albicans*/*Candida glabrata* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization method for simultaneous dual-color identification of *C. albicans* and *C. glabrata* directly from blood culture bottles. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(1), 50–55.

- <https://doi.org/10.1128/JCM.01385-07>
- Shukla, P. K., Singh, P., Yadav, R. K., Pandey, S., & Bhunia, S. S. (2016). Past, Present, and Future of Antifungal Drug Development. [https://doi.org/10.1007/7355\\_2016\\_4](https://doi.org/10.1007/7355_2016_4)
- Siegel, J. D., Rhinehart, E., Jackson, M., & Chiarello, L. (2007). 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health Care Settings. *American Journal of Infection Control*, 35(10 SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2007.10.007>
- Singh, G., Kalyan, S., Prakash, S., & Sharma, J. (2017). Disseminated invasive aspergillosis in a prolonged stay in the intensive care unit.
- Spellberg B, Edwards J, Ibrahim A. (2005). Novel perspectives on Mucormycosis: pathophysiology, presentation, and management. *Clin Microbiol Rev*, 18(3), 556–569. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.3.556>
- Spitzer, M., Robbins, N., & Wright, G. D. (2017). Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. *Virulence*, 8(2), 169–185. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1196300>
- Srikanta, D., Santiago-Tirado, F. H., & Doering, T. L. (2014). *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. *Yeast (Chichester, England)*, 31(2), 47–60. <https://doi.org/10.1002/yea.2997>
- Stott, K. E., & Hope, W. W. (2017). Therapeutic drug monitoring for invasive mould infections and disease: Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(November), i12–i18. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx029>
- Stover, K. R., Farley, J. M., Kyle, P. B., & Cleary, J. D. (2014). Cardiac toxicity of some echinocandin antifungals. *Expert Opinion on Drug Safety*, 13(1), 5–14. <https://doi.org/10.1517/14740338.2013.829036>
- Tang, M. W., Clemons, K. V., Katzenstein, D. A., & Stevens, D. A. (2015). The cryptococcal antigen lateral flow assay: A point-of-care diagnostic at an opportune time. *Critical Reviews in Microbiology*, 0(0), 1–9. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.982509>
- Thompson, G. R., Cadena, J., & Patterson, T. F. (2009). Overview of Antifungal Agents.

- Clinics in Chest Medicine*, 30(2), 203–215.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccm.2009.02.001>
- Thornton, C. R. (2008). Development of an immunochromatographic lateral-flow device for rapid serodiagnosis of invasive aspergillosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(7), 1095–1105. <https://doi.org/10.1128/CVI.00068-08>
- van de Veerdonk, F. L., Gresnigt, M. S., Romani, L., Netea, M. G., & Latgé, J.-P. (2017). *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.90>
- Walker, S. S., Xu, Y., Triantafyllou, I., Waldman, M. F., Mendrick, C., Brown, N., ... Black, T. A. (2011). Discovery of a novel class of orally active antifungal  $\beta$ -1,3-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 5099–5106. <https://doi.org/10.1128/AAC.00432-11>
- Wiederhold, N. P. (2017). The antifungal arsenal: alternative drugs and future targets. *International Journal of Antimicrobial Agents*. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.09.002>
- Wilcock, B. C., Endo, M. M., Uno, B. E., & Burke, M. D. (2013). C2'-OH of amphotericin B plays an important role in binding the primary sterol of human cells but not yeast cells. *Journal of the American Chemical Society*, 135(23), 8488–8491. <https://doi.org/10.1021/ja403255s>
- Yapar, N. (2014). Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 10(1), 95–105. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S40160>
- Zhang, S. X. (2012). Non-Culture-Based Methods in Diagnostic Mycology. *Clinical Microbiology Newsletter*, 34(13), 101–105. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2012.06.001>
- Zilberberg, M. D., & Shorr, A. F. (2009). Fungal Infections in the ICU. *Infectious Disease Clinics of North America*, 23(3), 625–642. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2009.04.008>

## *8. Bibliografia*