

CAMILA ROCHA VILELA

**ESTUDO COMPARATIVO DA MICROBIOTA FÚNGICA ORAL EM
PROFISSIONAIS DA ÁREA DA SAÚDE, PACIENTES INTERNADOS EM
UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA E INDIVÍDUOS ISENTOS DE
CONTATO HOSPITALAR**

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2022**

Camila Rocha Vilela

**ESTUDO COMPARATIVO DA MICROBIOTA FÚNGICA ORAL EM
PROFISSIONAIS DA ÁREA DA SAÚDE, PACIENTES INTERNADOS EM
UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA E INDIVÍDUOS ISENTOS DE
CONTATO HOSPITALAR**

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Odontologia – área de concentração em Clínica Odontológica

Orientadora: Profa. Dra. Amália Moreno

Coorientadores: Profa. Dra. Cláudia Silami de Magalhães, Prof. Dr. Leonel Mendoza

Colaboradora: Profa. Dra. Raquel Rocha Vilela

**Belo Horizonte
2022**

Ficha Catalográfica

V699e Vilela, Camila Rocha.
2022 T Estudo comparativo da microbiota fúngica oral em
profissionais da área da saúde, pacientes internados em
unidade de terapia intensiva e indivíduos isentos de contato
hospitalar / Camila Rocha Vilela. -- 2022.

78 f. : il.

Orientadora: Amália Moreno.
Coorientadora: Cláudia Silami de Magalhães.
Coorientador: Alberto Leonel Mendoza.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas
Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Candida. 2. COVID-19. 3. Filogenia. 4. Espectrometria
de massas por ionização e dessorção a laser assistida por
matriz. I. Moreno, Amália. II. Magalhães, Cláudia Silami de.
III. Mendoza, Alberto Leonel . IV. Universidade Federal de
Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. V. Título.

BLACK - D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

ESTUDO COMPARATIVO DA MICROBIOTA FÚNGICA ORAL EM PROFISSIONAIS DA ÁREA DA SAÚDE, PACIENTES INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA E INDIVÍDUOS ISENTOS DE CONTATO HOSPITALAR

CAMILA ROCHA VILELA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ODONTOLOGIA, área de concentração CLÍNICA ODONTOLÓGICA.

Aprovada em 22 de julho de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Amália Moreno - Orientador
UFMG

Prof(a). Alberto Leonel Mendoza
Michigan State University

Prof(a). Veridiana Salles Furtado de Oliveira
Centro Universitário Newton Paiva

Prof(a). Célia Regina Moreira Lanza
UFMG

Belo Horizonte, 22 de julho de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Veridiana Salles Furtado de Oliveira, Usuária Externa**, em 22/07/2022, às 16:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Amalia Moreno, Professora do Magistério Superior**, em 22/07/2022, às 17:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Celia Regina Moreira Lanza, Professora do Magistério Superior**, em 22/07/2022, às 17:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alberto Leonel Mendoza, Usuário Externo**, em 25/07/2022, às 10:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1603884** e o código CRC **AB053039**.

Dedico este trabalho a Deus, o maior orientador da minha vida. A Ele, por me capacitar e guiar em todos os momentos. Que este trabalho seja instrumento em Suas mãos para servir ao próximo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir trilhar esse caminho desafiador que tanto sonhei.

A minha orientadora, Profa. Dra. Amália Moreno que se disponibilizou de maneira única, sua dedicação e paciência serviram como pilares de sustentação, para a conclusão deste trabalho.

A minha coorientadora, Profa. Dra. Cláudia Silami de Magalhães, que teve durante todo o curso deste mestrado a firme presença, sempre disposta ao auxílio.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Leonel Mendoza que me ensinou e mostrou o mundo da biologia molecular de forma simples e maravilhosa. Obrigada por tudo e por ser essa fonte infinita de conhecimento e por compartilhá-lo da forma mais impressionante e criativa que já testemunhei.

A colaboradora e mãe, Profa. Dra. Raquel Vilela por ser uma constante fonte de motivação e incentivo ao longo de todo o projeto, obrigada por caminhar comigo e por me ensinar sempre.

Ao meu marido, Felipe, cuja presença foi essencial para a conclusão deste trabalho, que foi capaz de suportar todos os meus momentos difíceis durante o processo.

A todos os professores que compõem a Clínica Odontológica, que se dedicam a formar e transformar compartilhando tanto conhecimento.

A Michigan State University que abriu suas portas para me receber e ajudar a concluir essa dissertação.

Aos professores e funcionários da Michigan State University por me receberem e fazerem minha jornada na universidade leve e prazerosa.

Ao programa de Pós-graduação em Odontologia da FO-UFMG uma instituição de confiança que desde o início me deu todo o suporte para que eu chegasse aqui. Agradeço aos meus colegas de mestrado, pelo aprendizado, divisão de conhecimentos, palavras de apoio e incentivo, que tornou os momentos especiais.

Aos meus familiares, Rubens, Luiza, Priscila e Gabriella por me apoiarem incondicionalmente, por todo amor e carinho. E agradeço aos meus sobrinhos, Samuel e Izabella que tornara essa caminhada mais leve e alegre.

RESUMO

O conhecimento sobre a microflora fúngica oral em pacientes com COVID-19 ainda precisam ser avaliadas. Este estudo tem como objetivo mapear e comparar as principais espécies de fungos presentes na cavidade oral (com foco nas espécies de *Candida*) de pacientes com COVID-19 em unidades de terapia intensiva e seus profissionais de saúde. A coleta oral foi realizada com swabs em cento e vinte e oito indivíduos (incluindo um grupo controle). As amostras foram cultivadas em CHROMagar (CROMOagar, Pinhais, PR. Br) e incubadas a 37°C por 7 dias. Seguindo as instruções do fabricante foi realizada uma identificação inicial das espécies de *Candida* isoladas. A identificação final das espécies foi realizada utilizando DNA genômico extraído dos fungos isolados e PCR com primers universais 18S SSURNA e sequenciamento genético. A dessorção a laser assistida por matriz/tempo de voo de ionização (MALDI-TOF) também foi implementada juntamente com os procedimentos moleculares. Oito espécies diferentes de *Candida* (incluindo espécies de *Pichia*), *Ogataea polymorpha*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Trichosporum ashii* foram identificadas na cavidade oral da população investigada. A análise comparativa, usando dados filogenéticos e MALDI-TOF, das espécies isoladas de *Candida*, mostrou uma correlação estatística entre as espécies presentes em pacientes e profissionais de saúde, sugerindo transmissão putativa entre os dois grupos. Nossos dados pedem medidas sobre estratégias de biossegurança para controlar possíveis contaminações de superfícies e a transmissão de patógenos que representam riscos à qualidade de vida em ambientes de saúde.

Palavras-chave: *Candida spp.* COVID-19. Filogenia. MALD-TOF.

ABSTRACT

Comparative study of oral fungal microbiota in healthcare professionals, patients interned in intensive care unit and individuals without hospital contact

Information regarding oral fungal microflora in patients with COVID-19 has yet to be evaluated. This study aims to map and compare the main species of fungi present in the oral cavity (with focus on *Candida* species) of COVID-19 patients in intensive care units and their health providers. The oral collection was carried out with swabs in one hundred twenty-eight individuals (including a control group). The samples were cultured on CHROMagar (CROMOagar, Pinhais, PR, Br) and incubated at 37°C for 7 days. Following the manufacturer's instructions an initial identification of the isolated *Candida* species was performed. The final identification of the species was carried out using genomic DNA extracted from the isolated fungi and PCR with 18S SSURNA universal primers and genetic sequencing. Matrix-Assisted Laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) was also implemented along with the molecular procedures. Eight different *Candida* species (including *Pichia* species), *Ogataea polymorpha*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Trichosporum ashii* were identified in the oral cavity of the investigated population. Comparative analysis, using phylogenetic and MALDI-TOF data, of the isolated *Candida* species, showed a statistic correlation between the species present in patients and health care providers, suggesting putative transmission between the two groups. Our data call for measurements on biosecurity strategies to control possible contamination of surfaces and the transmission of pathogens that pose risks to the quality of life in health care environments.

Keywords: *Candida* species. COVID-19. Phylogenetics. MALDI-TOF.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Coleta com o swab oral e plaqueamento.....	20
Figura 2 - Esquema de cores no CHROMagar das espécies de <i>Candida</i>	22
Figura 3 - Esquema de funcionamento da plataforma de espectrofotometria de massa.....	24
Figura 4 - Ionização das amostras e organização da nuvem vaporizada de proteína e matriz.....	24
Figura 5 - Passo a passo NORGEN BIOTEK CORP (ON, Canadá).....	25
Figura 6 - Emparelhamento do primer universal NS1 com a fita de DNA para amplificação.....	29
Figura 7 - Gel com amplificação genômica.....	29
Figura 8 - Sequência laboratorial do plaqueamento a extração genômica.....	65
Figura 9 - Sequência Laboratorial do PCR.....	66

LISTA DE TABELAS

Table 1- Variables and characterization of the selected individuals in the study	58
Table 2- Cross comparison between isolates recovered from hospital individuals versus control group	59
Table 3- The use of Chi-square test to investigate differences between Subgroups.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABRAOH	Associação Brasileira de Odontologia Hospitalar
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BH	Belo Horizonte
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora
et al.	e outros
Fig.	Figura
FO	Faculdade de Odontologia
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ICH	Indivíduos Isentos de contato hospitalar
MALDI-TOF	Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz com analisador por tempo de voo
MG	Minas Gerais
NS1	Primer Universal
PAS	Profissionais das áreas da saúde que trabalham dentro da ala de UTI do Hospital da Baleia
PCR	Proteína C Reativa
Profa.	Professora
Prof.	Professor
PUB	Pacientes internados na UTI do Hospital da Baleia
RNA	Ácido Ribonucleico
SARS-COV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2

Spp	Espécies não específicas
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLA	Tampão de buffer de lise de cauda
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	15
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivos gerais	18
2.2	objetivos específicos.....	18
3	METODOLOGIA EXPANDIDA.....	19
3.1	Desenho do estudo e aspectos éticos.....	19
3.2	Coleta de amostras.....	20
3.3	Cultura das amostras clínicas.....	21
3.4	Identificação das espécies de candida.....	23
3.5	Extração de DNA genômico.....	25
3.6	PCR e sequenciamento do dna.....	27
3.7	Phylogeny – Relações evolutivas dos táxons.....	30
3.8	Análise estatística.....	32
4	RESULTADOS.....	33
4.1	ARTIGO.....	33
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
	REFERÊNCIAS.....	61
	APÊNDICE A – Figuras.....	67
	APÊNDICE B- Questionário excludente para população isenta de contato hospitalar.....	68
	ANEXO A – Carta de aceite da Michigan State University para o projeto de pesquisa.....	69
	ANEXO B – Parecer aprovação CEP.....	78

ANEXO C - Página inicial de submissão na revista Oral Desases.....	75
---	-----------

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A Odontologia Hospitalar no Brasil foi legitimada em 2004 com a criação da Associação Brasileira de Odontologia Hospitalar (ABRAOH). Este evento foi de fundamental importância para que em 2008, fosse decretada a Lei nº 2776/2008, exigindo a presença do dentista nas equipes multiprofissionais hospitalares e nas UTIs (PONZONI *et al.*, 2012; TEIXEIRA, SANTOS, AZAMBUJA, 2019). O papel do cirurgião dentista, no ambiente hospitalar, está relacionado com o auxílio do controle das infecções orais, focado na diminuição da morbidade e mortalidade dos pacientes internados. As principais manifestações clínicas na cavidade bucal são: 1) de caráter primário, sendo capaz de evoluir para uma doença sistêmica, ou 2) de caráter secundário apresentando-se a partir de alterações sistêmicas (GERMANO *et al.*, 2018, SIQUEIRA *et al.*, 2014, WADE, 2013). Segundo Ponzoni *et al.*, (2012) e Stramandinoli *et al.*, (2010) pacientes entubados, com distúrbios respiratórios, com higienização bucal precária e outras comorbidades (por exemplo diabetes, uso de medicamentos como bisfosfonato - associado à osteonecrose da mandíbula - AIDS e portadores do vírus Sars-CoV-2), estão intimamente relacionados à alteração da microbiota bucal por fungos leveduriformes, especialmente os do Gênero *Candida*. Em pacientes imunossuprimidos, nos que fazem uso iatrogênico indiscriminado de antibióticos, corticosteroides, imunossupressores, e/ou nos portadores de doenças sistêmicas graves, pode ocorrer modulação na microbiota oral, por seleção de espécies, ou pela colonização adquirida a partir do ambiente hospitalar (HE *et al.*, 2015, NETO *et al.*, 2005).

Dentro do gênero *Candida*, a *Candida albicans* é a principal espécie responsável por infecções em mucosas e na pele. Trata-se de um fungo leveduriforme comensal, comumente encontrada na cavidade oral, trato digestivo, respiratório e vaginal (CORTIVO *et al.*, 2019; NEVILLE *et al.*, 2009). Em pacientes hospitalizados, a *C. albicans* é a levedura encontrada com maior prevalência na microbiota oral. (AVILA *et al.*, 2009, SIQUEIRA *et al.*, 2014, SPOLIDORIO *et al.*, 2003). De acordo com Neto, *et al.* (2005) e Ghannoum *et al.*, (2010) a candidíase é a infecção fúngica mais frequentemente diagnosticada na prática odontológica. As lesões orais causadas por *C. albicans* podem

ser agudas ou crônicas, e a magnitude da expressão clínica destas lesões dependerá da resposta imune do hospedeiro (BAUMGAEDNER, 2019). Ataídes *et al.*, (2010), Vallabhaneni *et al.*, (2019) e Spivak, Hanson *et al.*, (2018) fazem referência ao aumento expressivo de outras espécies de *Candida* spp com especial relevância para *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e mais recentemente *C. lusitaniae* e *C. auris*, com foco principal em pacientes hospitalizados. Os mesmos autores, afirmam que a espécie *C. auris* é hoje considerada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de infecção fúngica na região orofaríngea devido a expressão da multirresistência aos antifúngicos. Considerando a prevalência aumentada dessas infecções em pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI), torna-se preocupante a exposição dos profissionais da área de saúde e a possibilidade da transmissão horizontal destas espécies (PONZONI *et al.*, 2012). As equipes de controle de infecção hospitalar estão atentas ao isolamento desses fungos, especialmente os do gênero *Candida*, e às suas implicações clínicas. A interpretação destes isolamentos perpassa pela compreensão da microbiota leveduriforme que coloniza as duas populações, pois tanto os pacientes das UTIs, quanto os profissionais da área da saúde, podem potencialmente ser fonte de contaminação por transmissão horizontal (ATAÍDES *et al.*, 2010, BLISS *et al.*, 2008). Uma possível hipótese de via de transmissão foi apresentada por De Groot *et al.*, (2013) e Mayer *et al.*, (2013). Estes autores afirmam que as espécies de *Candida* têm a capacidade de aderir-se firmemente a superfícies celulares e superfícies abióticas, como dispositivos médicos invasivos. Sua presença nessas superfícies assim como práticas inadequadas de biossegurança facilitará sua transmissão intra-hospitalar (entre pacientes e profissionais da área da saúde).

O espaço bucal é um habitat favorável à presença de uma microbiota diversa, com a possibilidade de ter uma grande influência no sistema imunológico do hospedeiro. A diversidade de espécies de microrganismos encontradas na mucosa oral, em constante competição por nutrientes disponíveis, promove a homeostase bucal, que indiretamente, beneficia o sistema imunológico. Quando ocorre o desequilíbrio desta microbiota (por enfermidade, uso indiscriminados de antibióticos, corticosteroides e outros), as diferentes espécies do gênero *Candida* expressam fatores de virulência, tornando-se patogênicas, o que promove lesões locais pela invasão tecidual, contribuindo para a formação de um

sistema disbiótico oral (NUNES *et al.*, 2019). Nesse contexto Doi *et al.*, (2016) e Nunes *et al.*, (2019) destacam que as infecções fúngicas hospitalares, são responsáveis por um índice elevado de óbitos em pacientes de UTI, nos quais os casos de candidíase sistêmica sobrepõem outras micoses.

A necessidade da compreensão do real papel da microbiota oral é de suma importância, para que sejam elaboradas estratégias de combate as infecções nosocomiais geradas por esses microrganismos. Com base na importância epidemiológica, que a transmissão de espécies de *Candida* possui no contexto hospitalar, este estudo tem como objetivo principal a avaliação da microbiota leveduriforme presente em pacientes em UTI e nos profissionais da saúde que estão em contato direto com os mesmos, comparados a um grupo controle, composto por indivíduos hígidos ausentes de contato com a área hospitalar. Conhecer as espécies de *Candida* existentes na cavidade oral, e os possíveis fatores epidemiológicos e de transmissão entre os grupos estudados poderá contribuir para o desenvolvimento e melhorias na saúde bucal, beneficiando os usuários do Sistema Único de Saúde. Os resultados obtidos poderão subsidiar a revisão das estratégias de biossegurança existentes, visando ao maior controle de possível transmissão horizontal de patógenos. Isso torna-se especialmente relevante no cenário da pandemia de COVID-19, que acarretou riscos para a qualidade de vida e saúde humana.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar as principais espécies de *Candida* presentes na cavidade bucal de profissionais das áreas da saúde que trabalham na ala de UTI do Hospital da Baleia (PAS), pacientes internados na UTI do Hospital da Baleia (PUB) e em indivíduos saudáveis isentos de contato hospitalar (ICH).

2.2 Objetivos específicos

1. Identificar as espécies de leveduras do gênero *Candida* utilizando metodologias de cultivo (CHROMagar) e de MALDI-TOF;
2. Analisar os genótipos nos isolamentos de *Candida* presentes em cada uma das populações deste estudo;
3. Correlacionar os dados encontrados para determinar possíveis transmissões horizontais nas populações PAS e os PUB, comparando-os com a microbiota leveduriforme no grupo de indivíduos controle ICH.

3 METODOLOGIA EXPANDIDA

3.1 Desenho do estudo e aspectos éticos

Trata-se de estudo de caso-controle observacional analítico para determinar a presença das espécies de fungos leveduriformes na cavidade oral em indivíduos internados na UTI COVID (PUB 30 pacientes) e nos profissionais da área da Saúde que trabalham diretamente na ala da UTI (PAS 30 indivíduos) do Hospital da Baleia incluindo médicos, enfermeiros, técnicos de enfermagem, dentistas e farmacêuticos. O cálculo amostral foi realizado utilizando a metodologia proposta por Fleiss, 1989, e os seguintes parâmetros: nível de significância $\alpha=5\%$; o poder do teste ($1-\beta=80\%$), valor de “d” (risco relativo para comparação entre grupos) sugerido por Cohen, 1988 = 0,5 risco relativo para comparação entre grupos) d”, O tamanho amostral mínimo estimado foi de 29 participantes em cada grupo. Esse valor foi arredondado para 30 participantes, com a intenção de facilitar a realização da análise dos resultados e elaboração/organização dos dados estatísticos.

O grupo controle foi formado por 60 indivíduos saudáveis, os quais foram recrutados da Comunidade Morro Alto em Vespasiano. Foram incluídos indivíduos isentos de contato com a área hospitalar (ICH), selecionados por aplicação de um questionário excludente (APÊNDICE B). No grupo PUB foram excluídos aqueles que estivessem fazendo uso de antifúngicos e a associação de sulfametoxazol + trimetropim (fatores que influenciam na recuperação do microrganismo em cultivo). No grupo PAS, não foi aplicado o questionário excludente, para permitir a avaliação da transmissão horizontal entre PUB e PAS.

As análises microbiológicas foram realizadas em dois laboratórios. A primeira parte relacionada ao isolamento dos cultivos originais dos participantes do estudo foi realizada no laboratório de Microbiologia do Hospital da Baleia, Belo Horizonte, Brasil, na direção da Profa. Dra. Raquel Vilela. A segunda parte que incluiu a sessão molecular e MALDI-TOF foi realizada no laboratório de Micologia Médica, na sessão do Biomedical

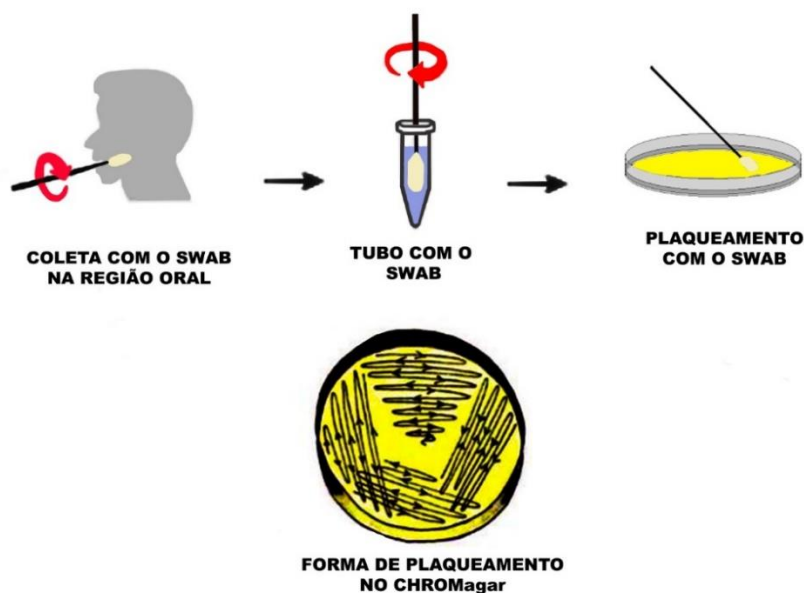
Laboratory Diagnostics, Michigan State University, East Lansing – Michigan, Estados Unidos, na direção do Prof. Dr. Leonel Mendoza.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital da Baleia, sob o número CAAE: 31806720.0.0000.5123. Na sequência este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (CEP-UFMG), sob o número CAAE: 45240721.4.0000.5149. Após a assinatura do termo de consentimento livre esclarecido pelos participantes do estudo, as amostras foram coletadas dos três grupos (PAS, PUB e ICH).

3.2 Coleta de amostras

A coleta foi realizada utilizando um kit contendo um *swab* bucal e um tubo de ensaio seco (RAYSWAB/SWAB DE RAYON em tubo seco, SP, BR). O *swab* foi posicionado contra a mucosa jugal e a amostra foi coletada com movimentos rotatórios por 20 segundos (Figura 1. Estes foram lacrados e transportados, no mesmo dia da coleta, ao Laboratório de Microbiologia do Hospital da Baleia.

Figura 1. Coleta com o *swab* oral e plaqueamento



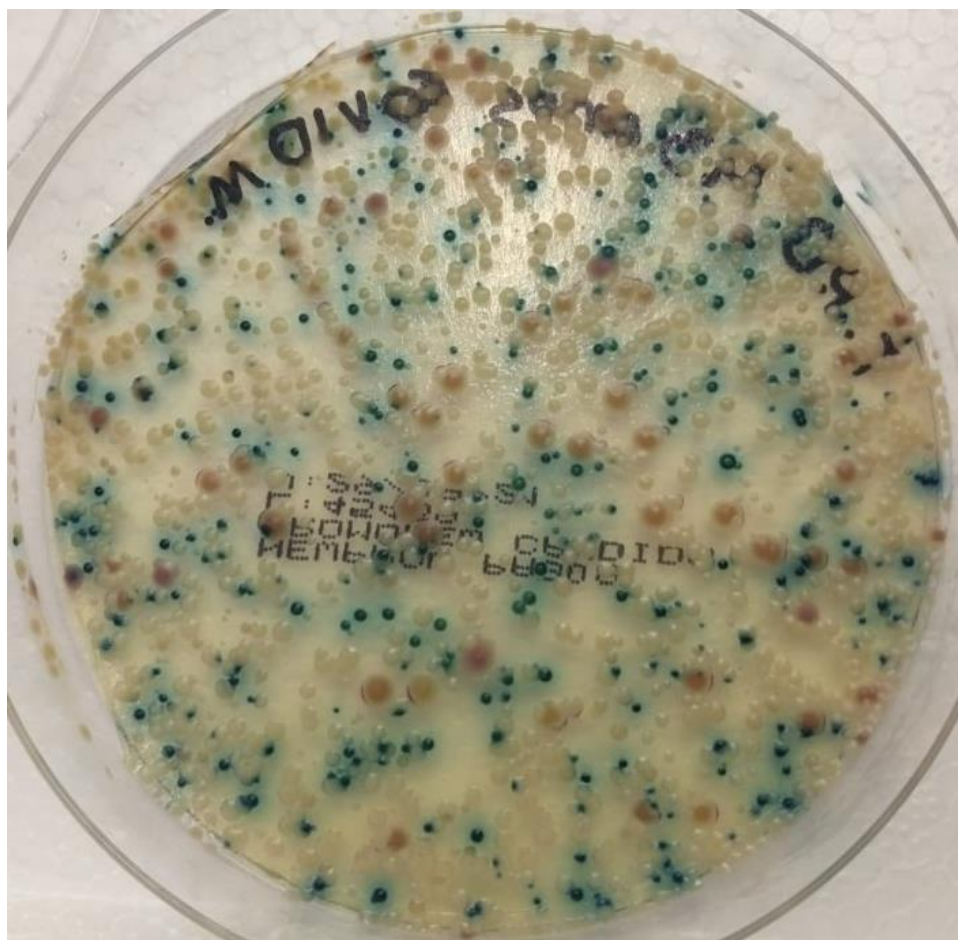
Fonte: Arquivo pessoal

3.3 Cultura das amostras clínicas

Após o recebimento das amostras clínicas no laboratório de micologia, os swabs foram removidos e utilizados assepticamente (em capela de fluxo laminar) para inocular as placas de CHROMOagar (CROMONEW CANDIDA, Pinhais, PR BR). O meio CHROMOagar, para cultura de fungos leveduriformes é seletivo e diferencial. Este meio contém antibióticos (cloranfenicol) para eliminar a flora bacteriana oral e uma mistura de substâncias cromogênicas que dão cores específicas às diferentes espécies de *Candida*. Por exemplo, as colônias de *C. albicans* nesse meio apresentam a cor verde, *C. tropicalis* azul e *C. krusei* rosa, com uma especificidade e sensibilidade de 99% (Figura 2). Porém, este meio não pode discriminar espécies emergentes de *Candida*, como *C. auris* e *C. lusitanae*, pois suas colônias são de cor branca, e em alguns isolados, podem variar entre rosa, vermelho ou púrpura (JEFFERY-SMITH *et al.*, 2018). Todas as colônias leveduriformes foram sub cultivadas em meio de ágar Sabouraud Dextrose 2% para posterior identificação genômica por sequenciamento, utilizando a tecnologia de Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight, Mass Spectrophotometry (MALDI-TOF MS).

Para inocular as placas os swabs foram colocados delicadamente contra as placas CHROMOagar e, com movimentos rotativos, o conteúdo do swab foi distribuído por toda a superfície do ágar. As placas inoculadas com as amostras clínicas foram incubadas a 37°C, durante 7 dias. As cores das colônias de leveduras nas placas positivas foram coletadas para análise de PCR e MALD-TOF de acordo com os grupos estudados. As placas sem crescimento micológico, foram descartadas, após 10 dias de incubação, e consideradas como crescimento negativo.

Figura 2. Esquema de cores no CHROMagar das espécies de *Candida*

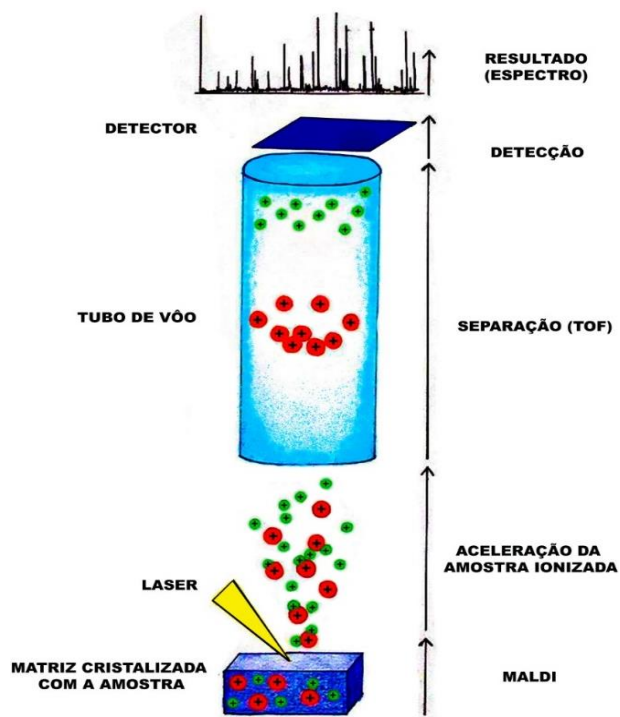


Fonte: Arquivo pessoal

3.4 Identificação das espécies de *candida* por MALDI-TOF

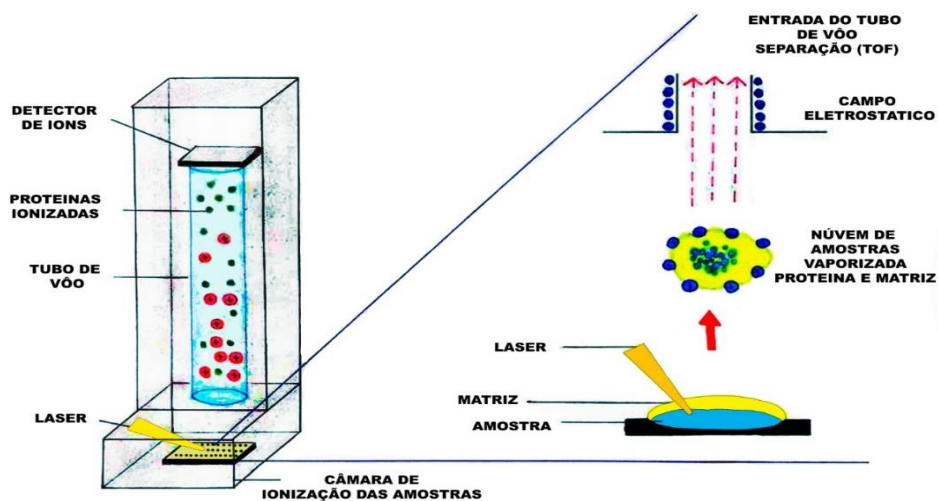
As amostras foram analisadas em uma plataforma de espectrofotometria de massa MicroFlex LT (Bruker Daltonics Inc. Billerica, MA), disponíveis nas instalações da Michigan State University, no Veterinary Diagnostic Laboratory (Este aparelho contém parâmetros de identificação para fungos fornecidos pelo Instituto Nacional de Saúde, NIH, Bethesda Maryland, EUA). As amostras das leveduras coletadas dos cultivos foram analisadas no aparelho de espectrofotometria de massa de acordo com as indicações do fabricante (Bruker Daltonics Inc. Billerica, MA) (Figura 3, Figura4). Os escores MALDI-TOF são de 0.0 a 3.0, para a identificação apropriada das espécies, e um escore de 2.0 ou maior que 2.0 é considerado como identificação bem-sucedida. Por exemplo, uma colônia branca, sem identificação, submetida a espectrofotometria de massa, dentro dos parâmetros de *C. glabrata* ou *C. auris* reconhecidos pelo MALDI-TOF, sempre mostrará sucesso na identificação dessas espécies, se os escores alcançados forem maiores ou iguais a 2.0. Escores menores que 1.5 foram interpretados como um isolamento de diferentes espécies de leveduras (espécies diferentes ao gênero *Candida* sp.) de acordo com os parâmetros fornecidos pelo fabricante (Bruker Daltonics Inc. Billerica, MA).

Figura 3. Esquema de funcionamento da plataforma de espectrofotometria de massa



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 4. Ionização das amostras e organização da nuvem vaporizada de proteína e matriz



Fonte: Arquivo pessoal

3.5 Extração de DNA genômico

O rendimento total de DNA genômico de materiais vegetais, depende do volume de material processado e da quantidade de DNA genômico no material vegetal utilizado. Cada caixa fornecida no Fungi/Yeast Genomic DNA isolation Kti (NORGEN Biotek corp, ON, Canada) é projetado para realizar a extração do material genômico das leveduras. Os reagentes necessários para gerar lisados de leveduras são fornecidos no kit. Água sem nuclease é fornecida para diluir o tampão de ligação no primeiro poço do cartucho para otimizar a ligação do DNA genômico. De acordo com o fabricante (NORGEN Biotek corp, ON, Canada), as etapas a serem seguidas para a extração do DNA genômico são (Figura 7):

Isolamento de DNA genômico de fungos/leveduras pela **NORGEN BIOTEK CORP (ON, Canadá)**

Passo 1:

- a) Em um tubo, transfira 2,5 ml de solução de NaCl (preparada com água destilada) e adicione o fungo a esta solução.
 - b) Em outro tubo, coloque 1 ml da solução de NaCl com a célula e centrifugue a 14.000 RPM por 1 minuto.
 - c) Despeje o sobrenadante (o pellet de células ficará abaixo/aderido ao fundo do tubo).
 - d) No tubo com as células, adicionar 500µl de Lysis Buffer e adicionar 10µl de RNase. Misture com vórtice.
 - e) Transfira a mistura para um tubo de esferas fornecido e prenda o tubo horizontalmente em uma almofada de vórtice de leito plano com fita adesiva de 5 minutos.
 - f) Incubar o Bead Tube com água a 65°C durante 10 minutos.
- OBS: Ocasionalmente misturar o lisado 2 ou 3 vezes durante a incubação invertendo os tubos.
- g) Transfira o líquido para outro tubo e centrifugue por 2 minutos a 14.000 RPM.
 - h) Transfira cuidadosamente o sobrenadante limpo para um novo tubo.
 - i) Adicionar igual valor de etanol 100% e misturar com vortex.

j) Adicione 300µl de tampão (solução da empresa) BX Solution e misture com vortex.

Passo 2:

- a) Em outro tubo com coletor, coloque 700µl da solução (a solução com o etanol e o tampão) e centrifugue por 1 minuto a 10.000 RPM. OBS: Faça este passo com o restante da solução para ter todo o DNA disponível.

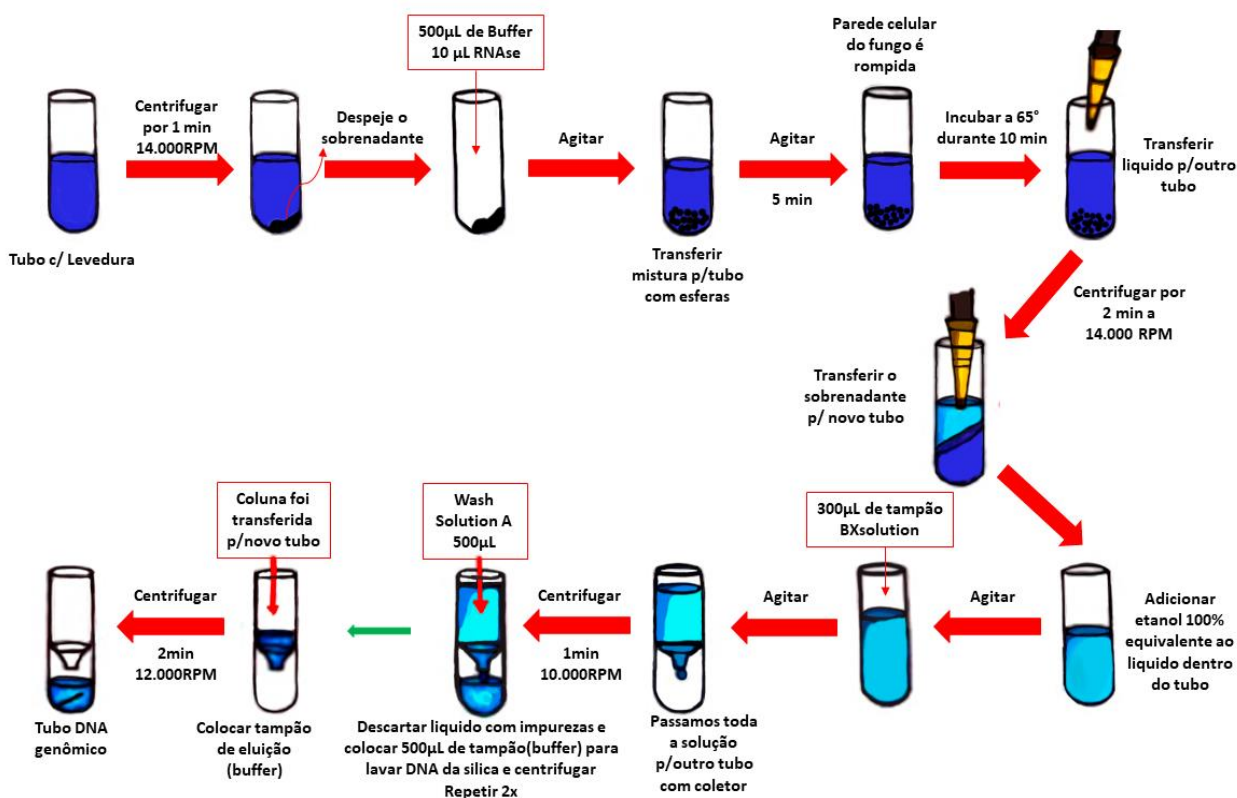
Etapa 3:

- a) Aplicar 500µl da solução da empresa (Wash Solution A) e centrifugar por 1 minuto a 10.000 RPM.
- b) Descarte o fluxo e repita a etapa 3a.
- c) Após descartar o segundo fluxo, gire a coluna por 2 minutos a 14.000 RPM.

Passo 4:

- a) Remova a coluna para um novo tubo.
- b) Adicione 100µl de tampão de eluição B à coluna.
- c) Centrifugar por 2 minutos a 12.000 RPM.
- d) Colocar o DNA a -80°C.

Figura 5. Passo a passo **NORGEN BIOTEK CORP (ON, Canadá)**



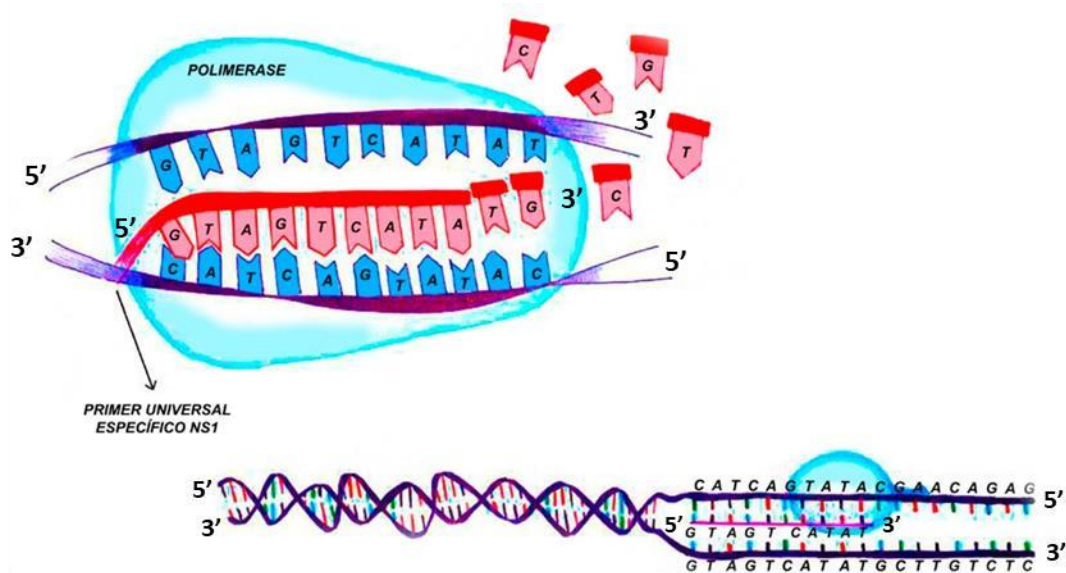
Fonte: Arquivo pessoal

3.6 PCR e sequenciamento de DNA

As amostras obtiveram um score do MALDI-TOF menores que 1.95 e aquelas que apresentaram a mesma espécie nos diferentes grupos estudados foram identificadas através de técnicas moleculares, como o PCR e sequenciamento do DNA. O processo inicial em toda a técnica molecular, é a extração do DNA genômico. Para este efeito, o DNA genômico das *Candidas* investigadas foram extraídos de acordo com os parâmetros fornecidos pelo fabricante do Fungi/Yeast Genomic DNA isolation Kti (NORGEN Biotek corp, ON, Canada). Para amplificar o DNA genômico, foram utilizados primers universais

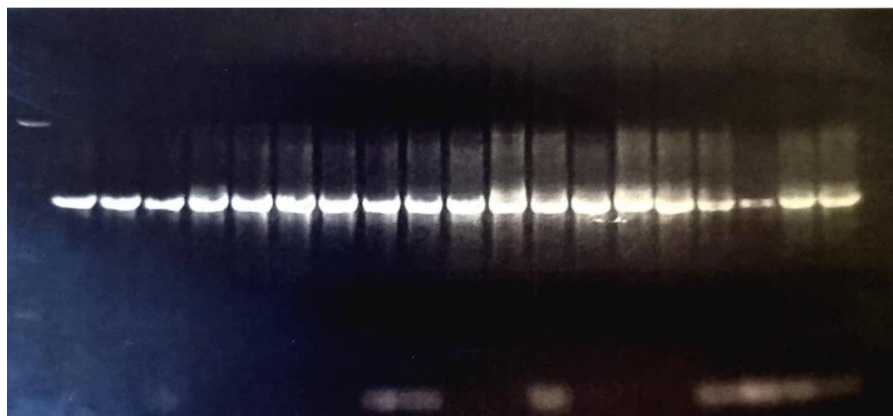
específicos NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') e NS8 (5'-TCCGCAGGTTTACCTACGGA-3') da região do gene 18S SSUrDNA (Figura 5). Os fragmentos esperados foram entre 1700 a 2000 pares de bases (bp). O ciclo de PCR consistiu em uma desnaturação inicial de 10 min a 95°C, seguida por 35 ciclos de desnaturação (30s a 94°C), emparelhamento (30s a 61°C) e extensão (45s a 72°C) (Figura 5). A PCR finalizou com um alongamento final de 10 min a 72 °C. A amplificação da PCR foi realizada com um termociclador de 96 poços (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA). Os produtos de PCR purificados foram sequenciados com os mesmos primers (Figura 6 mostra eletroforese com amplificação da PCR). O sequenciamento do DNA foi realizado nas instalações da Michigan State University no departamento Genomics–Research Technology Support Facility (www.search.msu.edu). As sequências do DNA obtidas foram analisadas pela técnica de Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) disponível no National Center for Biotechnology Information (NCBI – www.ncbi.nlm.nih.gov). As sequências de *Candida* no estudo, com valores de identidade entre 99% a 100% das espécies detectadas em BLAST, foram identificadas como tais. Já as sequências com os valores de identidade inferiores a 98% não foram consideradas.

Figura 6. Emparelhamento do primer universal NS1 com a fita de DNA para amplificação



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 7. Gel com amplificação genômica.



Fonte: Arquivo pessoal.

3.7 PHILOGENY – Relações evolutivas dos táxons

3.7.1 *Candida glabrata*

A história evolutiva, de acordo com Saitou, Nei, (1987), foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0,00913653 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados agrupados no teste de bootstrap (1000 replicatas) são mostrados ao lado dos ramos (FELSENSTEIN, 1985). A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de galhos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de 2 parâmetros de Kimura (KIMURA, 1980) e estão nas unidades do número de substituições de bases por sítio. Esta análise envolveu 46 sequências de nucleótidos. As posições de códon incluídas foram 1º+2º+3º+Não codificante. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas, ou seja, menos de 5% de lacunas de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidas em qualquer posição (opção de exclusão parcial). Houve um total de 894 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018).

3.7.2 *Candida albicans*

A história evolutiva, de acordo com Saitou, Nei, (1987), foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ótima com a soma do comprimento do ramo = 0,01115998 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados agrupados no teste de bootstrap (1000 replicatas) são mostrados ao lado dos ramos (FELSENSTEIN, 1985). A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de galhos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de 2 parâmetros de Kimura (KIMURA, 1980) e estão nas unidades do número de substituições de bases por sítio. Esta análise envolveu 27 sequências de nucleótidos. As posições de códon incluídas foram 1º+2º+3º+Não codificante. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas, ou seja, menos de 5% de lacunas de alinhamento,

dados ausentes e bases ambíguas foram permitidas em qualquer posição (opção de exclusão parcial). Havia um total de 932 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018).

3.7.3 *Candida parapsilosis*

A história evolutiva, de acordo com Saitou, Nei, (1987), foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0,00584664 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados agrupados no teste de bootstrap (1000 replicatas) são mostrados ao lado dos ramos (FELSENSTEIN, 1985). A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de galhos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de 2 parâmetros de Kimura (KIMURA, 1980) e estão nas unidades do número de substituições de bases por sítio. Esta análise envolveu 12 sequências de nucleótidos. As posições de códon incluídas foram 1º+2º+3º+Não codificante. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas, ou seja, menos de 5% de lacunas de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidas em qualquer posição (opção de exclusão parcial). Houve um total de 985 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018).

3.7.4 *Candida dubliniensis*

A história evolutiva, de acordo com Saitou, Nei, (1987), foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0,00203149 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados agrupados no teste de bootstrap (1000 replicatas) são mostrados ao lado dos ramos (FELSENSTEIN, 1985). A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de galhos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de 2 parâmetros de Kimura (KIMURA, 1980) e estão nas unidades do número de substituições de bases por sítio. Esta análise envolveu 4 sequências de nucleótidos. As posições de códon

incluídas foram 1º+2º+3º+Não codificante. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas, ou seja, menos de 5% de lacunas de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidas em qualquer posição (opção de exclusão parcial). Houve um total de 986 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018).

3.8 Análise estatística

Análise descritiva das variáveis categóricas (variáveis qualitativas) foi realizada por meio das frequências absolutas e relativas. Na descrição das variáveis numéricas (variáveis quantitativas) foram utilizadas medidas de posição, tendência central e dispersão. Os resultados obtidos para os grupos caso e controle foram comparados por meio do Teste Qui-Quadrado (AGRESTI; KATERI, 2011). O nível de significância adotado foi de 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 Artigo

Artigo submetido ao periódico internacional: The Journal of Hospital Infection (Qualis A2 – Fator de Impacto 8.944)

Investigation of the fungal oral microbiota among hospitalized patients with COVID-19
and their health professionals

Camila Vilela^{1,4}, Leonel Mendoza^{4,5*}, Claudia Silami de Magalhães², Raquel Vilela^{3,4},
Rinosh Mani⁶, Amalia Moreno¹

Department of Dental Clinic, Pathology and Surgery¹, Department of Restorative Dentistry², Faculty of Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Department of Clinical and Toxicological Analysis³, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Microbiology and Molecular Genetics⁴, Biomedical Laboratory Diagnostics⁵, Veterinary Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine⁶, Michigan State University, East Lansing MI 48910

Running Title: Fungal microbiota among patients with COVID-19 and health professionals

Key Words: *Candida* species, COVID-19, Dentistry, Phylogenetics, MALDI-TOF.

*Corresponding author: Leonel Mendoza, Biomedical Laboratory Diagnostics, Michigan State University, 354 Farm Lane, North Kedzie Hall, Room N324. East Lansing MI 48824. Tel. 517- 20 432-1234; Fax 517-432-2006. e-mail: mendoza9@msu.edu

Abstract

Background and Aim: Information regarding oral fungal microflora in hospitalized patients with COVID-19 has yet to be evaluated. This study investigated fungal species present in the oral cavity of COVID-19 intensive care units' patients and their health professionals.

Methods: Oral swabs were used to collect one hundred twenty-eight individual specimens. The samples were cultured on CHROMagar and incubated at 37°C for 7 days. Following the manufacturer's instructions, an initial identification of the isolated fungal species was performed. Matrix-Assisted Laser desorption/Ionization-time of flight (MALDI-TOF) was implemented for the final identification of the fungal isolates. Species with lower MALDI-TOF scores were further investigated using PCR and DNA sequencing.

Findings: Eight different *Candida* spp., *Pichia* spp., *Ogataea polymorpha*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Trichosporum asahii* were identified in the oral cavity of the investigated population. Comparative analysis using MALDI-TOF data and DNA sequences in phylogenetic analyses, showed a statistic correlation between the fungal species present in patients and health care providers, suggesting putative horizontal transmission between the two groups.

Conclusions: Our data revealed several fungal opportunistic pathogens in COVID-19 patients and their putative transmission between patients and their physicians. This study

alert the medical community to ensure the implementation of strict biosecurity strategies in hospital environments during high demand events.

Introduction

The role of the oral microflora is directly related to morbidity and mortality of hospitalized patients. In these patients the main clinical manifestations in the oral cavity are of a primary nature capable of evolving into a systemic disease, or of a secondary nature, the result of systemic changes resulting in the modulation of the oral microbiota (1). According to Terezakis et al., (2), intubated patients with respiratory disorders, poor oral hygiene and other comorbidities (for example, diabetes, use of drugs such as bisphosphonates - associated with osteonecrosis of the jaw - and AIDS and carriers of the Sars-CoV-2 virus), are closely related to the alteration of the oral microbiota by fungi, especially those of *Candida* species. It is important to mention that in immunosuppressed patients, those who make indiscriminate iatrogenic use of antibiotics, corticosteroids, immunosuppressants, and/or in those with severe systemic diseases, modulation in the oral microbiota may occur, by species selection, or by colonization acquired in a hospital environment (3).

Within *Candida* species, *C. albicans* is the main pathogen responsible for mucosal, skin, and systemic candidiasis. It is a commensal yeast normally present in the oral cavity, digestive, respiratory and vaginal tracts of mammalian hosts (4,5). In hospitalized patients, *C. albicans* is the most prevalent species in the oral cavity (4,6). In addition, candidiasis is the most frequently diagnosed fungal infection in dental practice (7). Oral lesions involving *C. albicans* can be acute or chronic, but the clinical manifestations will depend

on the host's immune response. Conversely, Ataídes et al., (8) and Vallabhaneni et al., (9), refer to the significant increase in other *Candida* species with specially *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* and more recently *C. lusitaniae* and *C. auris* on hospitalized patients. These authors stated that *C. auris* is now considered one of the main risk factors of the oropharyngeal region due to the expression of multidrug resistance to most antifungal agents. Considering the increased prevalence of these infections in patients hospitalized in the Intensive Care Unit (ICU), the exposure of health professionals and the possibility of horizontal transmission of these species becomes worrying (10). Understanding the role of the yeast microbiota that colonize the two populations is of importance, as both ICU patients and health professionals can potentially be a source of contamination by horizontal transmission (8). A hypothesis of route transmission was presented by De Groot et al., (11) and Mayer et al., (12). These authors stated *Candida* species firmly adhere to cell surfaces and abiotic surfaces, such as invasive medical devices. Its presence on these surfaces could facilitate its intra-hospital transmission (between patients and health professionals) due to inadequate biosecurity practices.

Medical literature on topics related to the diversity of the oral microbiota is limited. The need to understand the role of the oral microbiota in disease is thus, of paramount importance. Due to the epidemiological importance of *Candida* transmission in hospital environments, the objectives of this study were to evaluate the yeast microbiota present in ICU COVID-19 patients and health professionals, in direct contact with these patients, and their role in the horizontal transmission of such microbiota.

Methods

Study design and ethical aspects

This analytical observational case-control study was designed to determine the presence of fungal species in the oropharyngeal cavity of three different populations. This included PCR positive COVID-19 ICU patients without antifungal therapy (PUB, n= 36 patients), health professionals working in the ICU ward (PAS, n= 33 individuals) at the Hospital da Baleia, Belo Horizonte, Brazil, and a control group of healthy individuals not in contact with the hospital area (ICH, n= 59). Details of the investigated population is shown in Table 1. Every participant filled up a questionnaire indicating their consent to participate in the study following ethical protocols at the involved institutions (see below). The sample size calculation was that proposed by Fleiss, (13), with reference to the value of "d" (size of the relative risk factor for comparison between groups) with a medium relative risk defined with the value of 0.5, suggested by Cohen (14). Applying the Fleiss formula, considering the significance level values (respectively $\alpha = 5\%$) and the power of the test (respectively $\beta = 80\%$), the number of participants in the study was calculated to be 29 participants in each group. Therefore, with the intention of facilitating the statistical analysis final data calculations, the value was rounded to 30 participants. The chi-square test was used at a 5% significance level and the statistical analyzes in this report was executed in the software R v. 4.0.1 (15,16).

The protocols of the study were submitted and approved by the Research Ethics Committee of Hospital da Baleia (Belo Horizonte, Brazil; CAAE: 31806720.0.0000.5123). Subsequently, the research project was also approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil (UFMG CEP-UFMG;

CAAE: 45240721.4.0000.5149). After signing the informed consent form for participation in the study, samples from the three groups were collected (PAS, PUB and ICH).

Sample collection and culture of clinical specimens

Glass tubes containing sterile swabs were used to collect the specimens. The swabs were positioned in the mouth against the buccal mucosa and the sample was collected with rapid rotational movements for ~20 seconds. Tubes were identified, sealed and transported, on the same day of collection, to the Microbiology Laboratory Hospital da Baleia. The swabs were removed under class II biosafety cabinet, and the CHROMOagar plates (CROMOagar, Pinhais, PR. Br) were aseptically inoculated with the swabs. The medium contains antibiotics (chloramphenicol) to eliminate oral bacterial flora and a mixture of chromogenic substances that give specific colors to different *Candida* and other fungal species. According to the company instructions, the colonies of *C. albicans* are green, *C. tropicalis* blue, and *C. krusei* pink, with high specificity and sensitivity.

To inoculate the plates, the swabs were gently placed against the CHROMOagar plates and with rotating movements, the swab content distributed over the entire surface of the agar. Once the plates were inoculated with the clinical specimen, they were incubated at 37°C for 7 days. Colored colonies, indicating positive plates, were collected and subcultured on 2% Sabouraud Dextrose agar for PCR and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight, Mass Spectrophotometry (MALDI-TOF MS) analyses. Plates without mycological growth were discarded after 10 days of incubation and considered negative. Sub-cultured yeast colonies were kept in 2% Sabouraud Dextrose agar slant tubes at 25°C until use.

Identification of Candida species by MALDI-TOF

Colonies kept in slant 2% Sabouraud dextrose agar tubes were analyzed on a MicroFlex LT mass spectrophotometry platform (Bruker Daltonics Inc. Billerica, MA), available at Michigan State University's Veterinary Diagnostic Laboratory facility. The fungal samples collected from the cultures were processed for mass spectrophotometry instrument according to the manufacturer's instructions (Bruker Daltonics Inc. Billerica, MA). Briefly, individual colonies were spotted on duplicate wells and 1uL of freshly made 70% formic-acid was added on each spots. The fungal spots were allowed to dry and 1 uL of matrix (HCCA, Bruker Daltonics Inc. Billerica, MA), was added. Identification of the yeast was performed using MBT Compass Explorer 4.1 (Bruker Daltonics Inc. Billerica, MA), using Bruker reference library version 11. The MALDI-TOF scores range from 0.0 to 3.0 for proper species identification, and a score of 2.0 or greater than 2.0 is considered successful identification. Scores less than 1.7 were interpreted as an isolation of different yeast species (species other than the genus *Candida* sp.) according to the parameters provided by the manufacturer (Bruker Daltonics Inc. Billerica, MA). The dendrogram data were constructed using MBT Compass Explorer 4.1 (Bruker Daltonics Inc. Billerica, MA). Fungal isolates with low scores in MALDI-TOF ($1.7 \geq$) were subjected to molecular analysis for its final identification.

Molecular and Phylogenetic analyses

Using Fungi/Yeast Genomic DNA isolation Kit (NORGEN Biotek corp, ON, Canada) the genomic DNA from the of the investigated isolates were obtained. Reagents needed to generate yeast lysates are provided in the kit. The extraction of total genomic

DNA was according to the manufacturer's instructions (NORGEN Biotek corp, ON, Canada). The isolated total genomic yeast DNA was kept at -80°C until use. Fungal isolates with MALDI-TOF scores lower than 1.7, were further investigated through molecular techniques such as PCR and DNA sequencing. The genomic DNA of the investigated fungal species were PCR amplified using universal primers NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') and NS8 (5'-TCCGCAGGTTTACCTACGGA-3') targeting the 18S SSUrDNA gene region (Gargas & DePrist, 1996 [17]). The PCR cycle consists of an initial 10 min denaturation at 95°C, followed by 35 cycles of denaturation (30s to 94°C), annealing (30s to 61°C) and extension (45s to 72°C). PCR ends with a final elongation of 10 min at 72°C. PCR amplification was performed with a 96-well thermocycler (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Purified PCR products were sequenced in both directions with the same primers. DNA sequencing was performed at Michigan State University's Genomics–Research Technology Support Facility (www.search.msu.edu). The DNA sequences obtained were analyzed using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) technique available at the National Center for Biotechnology Information (NCBI – www.ncbi.nlm.nih.gov). The DNA sequences of *Candida* spp. in the study, with identity values ranging from 99% to 100% of the species detected in BLAST, were identified as such. Sequences with identity values lower than 98% were not considered.

The DNA sequences were aligned in MEGA X (18) with other *Candida* DNA sequences trees were inferred by Maximum Likelihood (ML) and Kimura-2 parameter model using MEGA X (19). The topologies generated for ML analysis were fully compatible and branches were considered supported when boots-strap values exceeded

70%. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. Evolutionary analyzes were performed on MEGA X (18).

Results

Fungal Species Recovered in culture

Fungal species growing on CHROMOagar plates were properly identified by MALDI-TOF and DNA sequencing analyses. Thirteen different fungal species were identified: *Candida albicans*, *C. dubliensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. orthopsilosis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *Ogataea polymorpha*, *Pichia kudriavzevii*, *P. manshurica*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Trichosporon asahii* (Figure 1, Table 2).

Candida spp. and other fungal species were found in colonized individuals (including hospital individuals and control group) with positive results in culture (Figure 1). The most prevalent species in all examined fungal specimens (n= 223) were *Candida albicans* (30.5%) followed by *C. glabrata* (23.3%), *C. parapsilosis* (10.3), *C. tropicalis* (4%), *C. orthopsilosis* and *C. dubliensis* (3.1% each), *Pichia kudriavzevii* and *Trichosporon asahii* (1.3% each), *C. guilliermondii* (0.9%), *C. lusitaniae*, *Ogataea polymorpha*, *Pichia manshurica*, and *Saccharomyces cerevisiae* (0.4% each) respectively. In the examined specimens 19.7% showed negative growth in the first stage of the study (Figure 1, Table 2).

When the number of isolates recovered from individuals related to hospital environment and those from the control group were compared, *C. albicans* was the most

prevalent species in the group control, with 26.4% in group case and 56.5% in the group control respectively (Figure 1, Table 2). Relevant to the study was the high number of *C. albicans* isolates recovered from individuals in the control group (Figure 1). In contrast, *C. glabrata* was significantly prevalent among patients and hospital workers (46.4%) than the control group (1.4%). *Candida parapsilosis* was isolated in 10% of hospital individuals and 17.4% in the control group, whereas *C. tropicalis* showed a similar percentage in both groups (4.5% hospital versus 5.8% control group) (Figure 1). *Candida dubliensis* was more prevalent in hospital individuals (4.5%) than those in the control group (2.9%). In contrast, *C. orthopsilosis* showed 0.9% in hospital personnel and 8.7% in the control group (Figure 1, Table 2). Interestingly, *Pichia kudriavzevii*, was isolated only in individuals related to the hospital environment (2.7%) but not in the control group (Figure 1, Table 2). Similar results were observed with *Ogataea polymorpha* and *Pichia manshurica* both with 0.9% of frequency. The percentage of *Trichosporon asahii* recovered in both groups were in some way similar (1.8% and 1.4% respectively). Comparable results were obtained in *C. guilliermondii* in both groups (0.9% versus 1.4% respectively). *Candida lusitanae* (1.4%) and *Saccharomyces cerevisiae* (1.4%) were recovered in culture only from individuals in the control group (Figure 1, Table 2). Negative cultures were recorded in all investigated groups as follows: hospital workers (n= 28), control group (n= 9) and ICU patients (n= 7) (Figure 1).

Statistical analysis

According to statistical data, the fungal species found in Health Professionals and the group of ICU patients did not differ significantly, maintaining equivalent proportions in

both groups. For example, the proportion of *C. glabrata* found in healthcare professionals is similar to the ratio found in ICU patients (Table 3). This trend can also be observed in *C. albicans* as well other species in this study (Table 3).

MALDI-TOF analysis

The identity of the fungal isolates was determined by the use of MALDI-TOF (Figures 1-3). *Candida* species (n= 175) spectra profile in cladistic analysis these species clustered in a similar pattern to that in phylogenetic analysis (see below). For instance, MALDI-TOF dendograms using *C. glabrata* (n= 50) and *C. albicans* (n= 29) (Figures 2,3) protein spectra profiles, showed these two species grouped into several monophyletic clusters. Each cluster was subdivided into several sub-groups, each containing isolates from ICU patients (orange) along with that of their health professionals (green) (Figures 2,3). Interestingly, some ICU patients (orange) displayed the same fungal patterns as that associated to their physician (green), suggesting horizontal transmission.

Molecular and phylogenetic analyses

The evolutionary history, according to Saitou and Nei, (20), was inferred using the Neighbor-Joining method. The ideal trees with the sum of branch lengths = 0.00913653 (Figure 4), branch = 0.01115998 (not shown), branch = 0.00584664 (not shown), branch = 0.00584664 (not shown), branch = 0.00203149 (not shown) were used. The percentage of replicated trees in which the associated taxa grouped in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. According to their nucleotide polymorphism, the phylogenetic trees showed *C. glabrata* separate in several clusters, each holding ICU

patients and health professionals (Figure 4). A similar result was also observed in *C. albicans* and *C. parapsilosis* (data not shown). Based on the DNA sequencing and phylogenetic analysis of *Candida* species isolated in this study, a correlation was found between *Candida* species polymorphic sites and the health professionals (green) interaction with those ICU patients (orange) with identical *Candida* genotypes (Figure 4).

Discussion

Within the hospital environment, a wide variety of microorganisms with the ability to initiate debilitating infections in patients with a weakened immune system are commonly reported (1-4,21-23). Thus, it is of fundamental importance to understand the epidemiology of such infections, in particular those caused by *Candida* species, especially with the emergence of antifungal resistant strains, such as *C. auris* (24, 25). *Candida auris* is an emerging fungus developing yeast cells with serious threat to public health due to formation of biofilms and its intrinsic resistance to antifungal drugs commonly used to treat *Candida* infections (24). In October 2016, the Pan American Health Organization/World Health Organization (PAHO/WHO) published an epidemiological alert based on reports of *C. auris* outbreaks in Latin American health care systems, recommending that Member States adopt several measures to prevent and control outbreaks caused by this pathogen (26). In December 2020, the first case of *C. auris* was identified in Brazil (27). The resistant isolate was recovered from the tip of a catheter in a patient admitted to the ICU of a hospital in Salvador/BA/Brazil, this was the first case of 15 other outbreaks. The cases in Brazil were confirmed as *C. auris* by MALDI-TOF analysis (27).

The three investigated groups (health professionals, ICU COVID-19 patients, and the control group) harbored several *Candida* species, with *C. albicans* and *C. glabrata* being the most frequently isolated (Table 2, Figure 1). Studies such as those by Ataídes et al., (8) and Vallabhaneni et al., (9), refer to the significant increase in *Candida* spp. species in hospitalized patients, with special relevance to *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* and more recently *C. glabrata* and *C. auris* (8,24-26,28). Although we did not isolate *C. auris*, this study found *C. glabrata* with a prevalence of 46.4% in ICU patients and their health professionals (26 patients and 25 health professionals) (Table 2, Figure 1). Subsequently, *C. albicans* was in second place with 26.4%, from which 14 were ICU patient and 15 health professional. In third place, *C. parapsilosis* has a prevalence of 10% of the total sample, with five ICU patients and six health professionals (Table 2). *Candida tropicalis* and *C. dubliensis* with fourth (4.5%), fifth with *Pichia kudriavzevii* (2.7%), sixth with *Trichosporon asahii* (1.8%), seventh with *C. orthopsilosis*, *C. guilliermondii*, *Pichia manshurica*, and *Ogataea polymorpha* (0.9%). In the control group, *C. albicans* was first with a prevalence of 56.5%, followed by *C. parapsilosis* with 17.4%. In third place is *C. orthopsilosis* with 8.7%, in fourth place *C. tropicalis* is present with 5.8% followed by *C. dubliensis* with 2.9% in fifth place. The last species were identified as *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *Trichosporon asahii*, and *Saccharomyces cerevisiae* (Table 2, Figure 1).

According to Silva et al. (29) hospitalized patients can be colonized by yeast species, some of them with multiresistance to antifungals, such as *C. glabrata* species that displays intrinsic resistance to Fluconazole, Itraconazole, and Amphotericin B (29). Our data showed *C. glabrata* is present not only in ICU patients, but also in health

professionals taking care of those patients, a data consistent to that in other studies (29,30) (Figures 1,2,4). As previously described, *C. glabrata* horizontal transmission is a strong possibility, since some of the health professionals were in close contact with those ICU patients with identical MALDI-TOF profiles (10) (Figure 2). A similar outcome was recorded in 2.7% of the participants with *Pichia kudriavzevii* (Table 2). According to Xi et al., (31) *Candida* spp. possess the ability to transfer genetic information, such as antifungal resistance, to other species.

One of the main features of *Candida* species is their ability to adhere abiotic surfaces developing biofilms, and to decrease basal metabolism production to survive outside the host (11,12,23). Our study found that some health professionals (green) (pharmacists and pharmacy technicians; participants 62, 63, 64, 65 and 68) without direct contact with COVID-19 patients (orange) displayed the same MALDI-TOF spectra between the two groups (Figure 2,3). For instance, these participants displayed the same polymorphic DNA sequences of *C. glabrata* in the phylogenetic tree with DNA sequencing (Figure 4) and in MALDI-TOF protein profile dendograms (Figures 2,3) to that in ICU patient (participants. 40, 43, 44, 47, 51, 57, 70, 71, and 72) (Figure 2). A similar situation occurs with participant number 50, a laboratory worker without direct contact with ICU patients but, according to the MALDI-TOF analysis, the laboratory worker displayed the same *Candida* profile of participant 44, an ICU patient (Figure 3). This interesting finding was observed also on non-health professionals (ICU secretary, number 4 and 13) sharing the same protein profile as that of ICU patients (number 5, 21, and 61) (Figures. 2,3). Also *C. parapsilosis* displayed a similar pattern where a professional responsible for cleaning the site (number 16), has the same polymorphic DNA sequence as two ICU patients

(numbers 25 and 59) (data not shown). These observations agree with the statements made by several authors investigating horizontal transmission of normal flora within hospital environments (11,12,23,32,33). In addition, patients admitted to the COVID-19 ICU included in this study did not show clinical symptoms of *Candida* spp. infection.

Our data showed the possibility of fungal microbiota horizontal transmission between ICU patients and their health professionals. The finding can be explained by the excess of hospital admissions in the ICU during the COVID-19 pandemic and by the inclusion of new health professionals with short-term training to meet the growing hospital admission demands. These unusual events possibly have had an impact on the results encountered in this study. For instance, during the pandemic, the elevated number of patients with COVID-19 without the possibility of a place in the ICU, were relocated to other places not prepared to receive high number of patients with COVID-19. This was a feature in common with other health centers around the globe, thus breaking the barriers of hospital biosafety (22-24). The importance of this study is to draw the attention of public health authorities on the unseen risks hospital could face during catastrophic events.

Conclusion

Using MALDI-TOF protein profile and DNA sequencing of the fungal microbiota present in the oral cavity of health professionals and ICU patients, our study showed the possibility of yeast species horizontal transmission in hospital environments. The finding of identical fungal profiles using MALDI-TOF and phylogenetic analyses, among health professionals and ICU COVID-19 patients, suggests there is a need to review existing biosafety strategies and propose new measures to ensure better control on the spread of

opportunistic microbiota during high demand events. There is a lack of data on the risks *Candida* species pose to the quality-of-life on infected COVID-19 patients, and thus, this study called the attention on potential nosocomial *Candida* species horizontal transmission that could impact human health.

Acknowledgements

The authors thanks the Department of Microbiology and Molecular Genetics, Michigan State University for their funding support to this study.

Author contributions

Camila Vilela: Data curation; Performed analyses; Writing the manuscript. **Leonel Mendoza:** Data curation; Original design; Writing the original draft; Investigation; Funding acquisition; Editing. **Claudia Silami de Magalhães:** Data curation; Writing the original draft. **Raquel Vilela:** Data curation; Conceptualization; Original design; Writing the first draft; Editing. **Rinosh Mani:** MALDI-TOF analysis; Writing review; editing. **Amalia Moreno:** Conceptualization; Funding acquisition; Methodology; Writing-review & editing.

Conflict of interest

The authors declared no conflict interest.

References

- [1] Wade W. The oral microbiome in health and disease. J Pharmacological Res. 2013;69:137-143. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.11.006>

- [2] Terezakis E, Needleman I, Kumar N, Moles D, Agudo E. The impact of hospitalization on oral health: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2011;38:628–636. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.2011.01727.x>
- [3] He J, Li Y, Cao Y, Xue J, Zhou X. The oral microbiome diversity and its relation to human diseases. *J Folia Microbiol*. 2015;60:69-80. <https://doi.org/10.1007/s12223-014-0342-2>
- [4] Spolidorio LC, Martins V, Nogueira R, Spolidorio D. The frequency of *Candida* sp. In biopsies of oral mucosal lesions. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17:89-93. <https://doi.org/10.1590/s1517-74912003000100017>
- [5] Neville BW, Damm D, Allen C, Chi A. *Patologia Oral e Maxilofacial*. 4th ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- [6] Avila M, Ojcius D M, Yilmaz O. The Oral Microbiota: Living with a Permanent Guest. *J DNA Cell Biol*. 2009;28:405-411. <https://doi.org/10.1089/dna.2009.0874>
- [7] Neto M, Danesi C, Unfer D. Candidíase Bucal revisão da literatura. *Rev Saúde, RS*, 2005; 31:16-26. <https://doi.org/10.5902/223658346404>
- [8] Ataídes FS, Abrao F, Costa C, Silva M, Pimenta F, Palos M, et al. Identificação de espécies de *Candida* em saliva de profissionais da saúde. *Rev Eletr Enf, Goiânia.*, 2010; 12:498-501. <https://doi.org/10.5216/ree.v12i3.6472>
- [9] Vallabhaneni S, Jackson B, Chiller T. *Candida auris*: An Emerging Antimicrobial Resistance Threat. *Ann Internal Med*. 2019;171:432-433. <https://doi.org/10.7326/m19-2205>
- [10] Doi AM, Pignatari A, Edmond M, Marra A, Camargo L, Siqueira R et al. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a

- Brazilian national surveillance program. PLoS One 2016;11:e1.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146909>
- [11] De Groot P, Bader O, Boer A, Weig M, Chauhan N. Adhesins in human fungal pathogens: Glue with plenty of stick. Eukaryotic Cell 2013;12:470–481.
<https://doi.org/10.1128/EC.00364-12>
- [12] Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence 2013;4:119–128. <https://doi.org/10.4161%2Fviru.22913>
- [13] Fleiss JL. The design and analysis of clinical experiments. New York: John Wiley & Sons. 1989. <https://doi.org/10.1002/bimj.4710300308>
- [14] Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. 1988.
<https://doi.org/10.4324/9780203771587>
- [15] Mckight PE, Najab J. Kruskal-wallis test. The corsini encyclopedia of psychology 2010;1-1. <https://doi.org/10.1002/9780470479216.corpsy0491>
- [16] Katz BM, Mcsweeney M. A multivariate Kruskal-Wallis test with post hoc procedures. Multivariate Behavioral Research 1980;15:281-297.
https://doi.org/10.1207/s15327906mbr1503_4
- [17] Gargas A, Deprist PT. A nomeclature for fungal PCR primers with examples from intron-containing SSU rDNA. Mycologia 1996;88:745-748.
<https://doi.org/10.1080/00275514.1996.12026712>
- [18] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution 2018;35:1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

- [19] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 1980;16:111-120. <https://doi.org/10.1007/bf01731581>
- [20] Saitou N. and Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evolution*. 1987;4:406-425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- [21] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 1985;39:783-791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- [22] Mattos-Silva P, Felix NS, Silva PI, Robba C, Battaglini D, Pelosi P, et al. Pros and cons of corticosteroid therapy for COVID-19 patients. *Respir Physiol Neurobiol*. 2020;280:103492. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2020.103492>
- [23] Facciola A, **Pellicanò G, Visalli G, Paolucci I, Venanzi Rullo E, Ceccarelli M** et al. The role of the hospital environment in the healthcare-associated infections: a general review of the literature. *Eur Ver Med Pharmacol. Sci*. 2019;23:1266-1278. https://doi.org/10.26355/eurrev_201902_17020
- [24] Villanueva-Lozano H, Treviño-Rangel R De J, González GM, Ramírez-Elizondo MT, Lara-Medrano R, Aleman-Bocanegra MC, et al. Outbreak of *Candida auris* infection in a COVID-19 hospital in Mexico. *Clin Microbiol Infec*. 2021;27:813-816. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.12.030>
- [25] Belkin A, Gazit Z, Keller N, Ben-Ami R, Wieder-Finesod A, Novikov A, et al. *Candida auris* infection leading to nosocomial transmission, Israel, 2017. *Emerging Infectious Diseases* 2018;24:801–804. <https://doi.org/10.3201/eid2404.171715>

- [26] Pan American Health Organization/World Health Organization. (2016) Epidemiological Alert: *Candida auris* outbreaks in health care services. 3 October, Washington, D.C.: PAHO/WHO. Available at: [Epidemiological Alert: Candida auris outbreaks in health care services in the context of the COVID-19 pandemic - 6 February 2021 - PAHO/WHO | Pan American Health Organization](#)
- [27] Agência Nacional De Vigilância Sanitária. (2021) Alerta de Risco GVIMS/ GGTES/ Anvisa. Confirmação de caso de *Candida auris* em outro Hospital Brasileiro. Brasil, dez. Available at: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/comunicados-de-risco-1/alerta-candida-auris-dezembro-de-2021.pdf/view>
- [28] Ghannoum MA, Jurevic R, Mukherjee P, Cui F, Sikarrodi M, Naqvi A, et al. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. J PLoS Pathog 2010;6:e1. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000713>
- [29] Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiology Reviews 2012;36:288–305. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x>
- [30] Mushi MF, Gross U, Mshana S E, Bader O. High diversity of *Candida glabrata* in a tertiary hospital—Mwanza, Tanzania Med Mycol 2019;57:914-917. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy036>
- [31] Xi Y, Zhan T, Xu H, Chen J, Bi C, Fan F, et al. Microbial Biotechnology published by Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd, Microbial Biotechnology 2021;14:1130–1147. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13781>

- [32] Alby K, Bennett RJ. Sexual reproduction in the *Candida* clade: cryptic cycles, diverse mechanisms, and alternative functions. *Cell Mol. Life Sci.* 2010;67:3275–3285. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0421-8>.
- [33] Squeri R, Genovese C, Palamara M, Trimarchi G, Fauci V. “Clean care is safer care”: correct handwashing in the prevention of healthcare associated infections. *Ann Ig.* 2016;28:409-415. <http://doi.org/10.7416/ai.2016.2123>

Figure 1. The chart shows the number of fungal species recovered during the study and the correlation with their health professional involvement, including culture positive and negative individuals, and the control group (ICU= Intensive Care Unit).

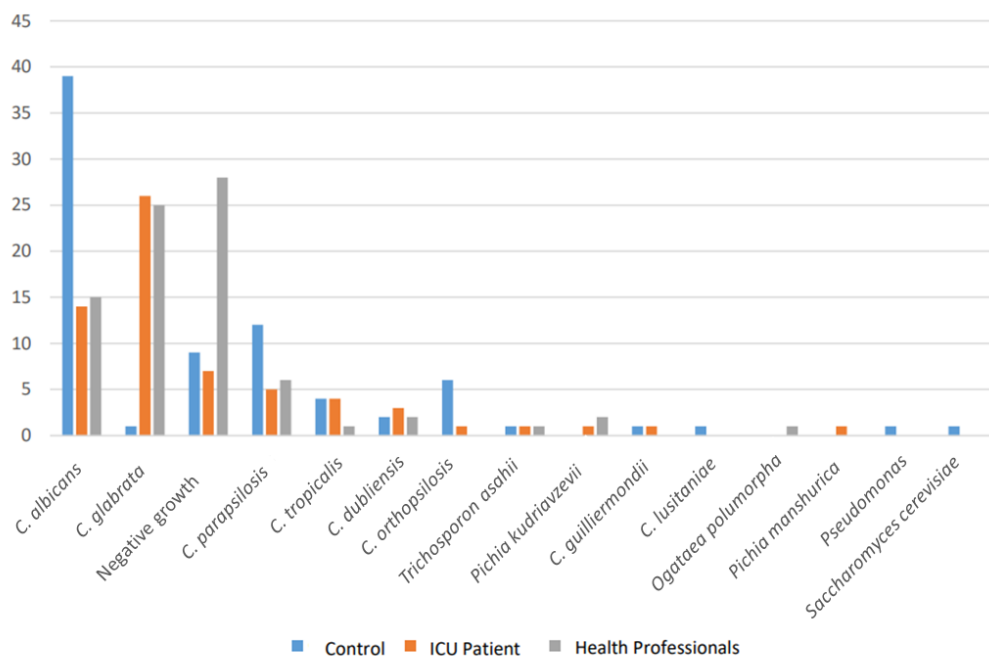


Figure 2. Dendrogram based on protein spectra profile (MALDI-TOF) of *Candida glabrata* showing several clusters comprising intensive care unit (ICU) patients (orange) and health professionals (green). Numbers on the right column represent different ICU patients (orange) and health professionals (green).

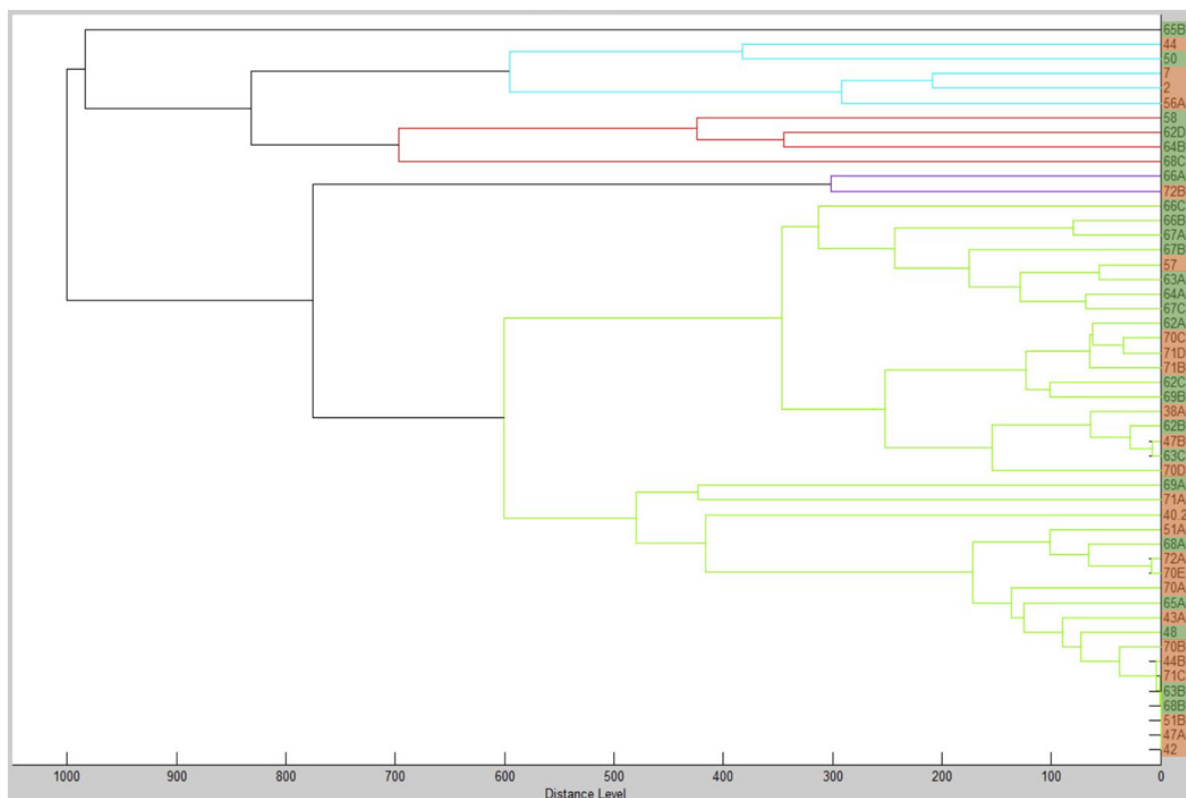


Figure 3. Dendrogram based on protein spectra profile (MALDI-TOF) of *Candida albicans* showing several clusters comprising intensive care unit patients (orange) and health professionals (green). Numbers on the right column represent different ICU patients (orange) and health professionals (green).

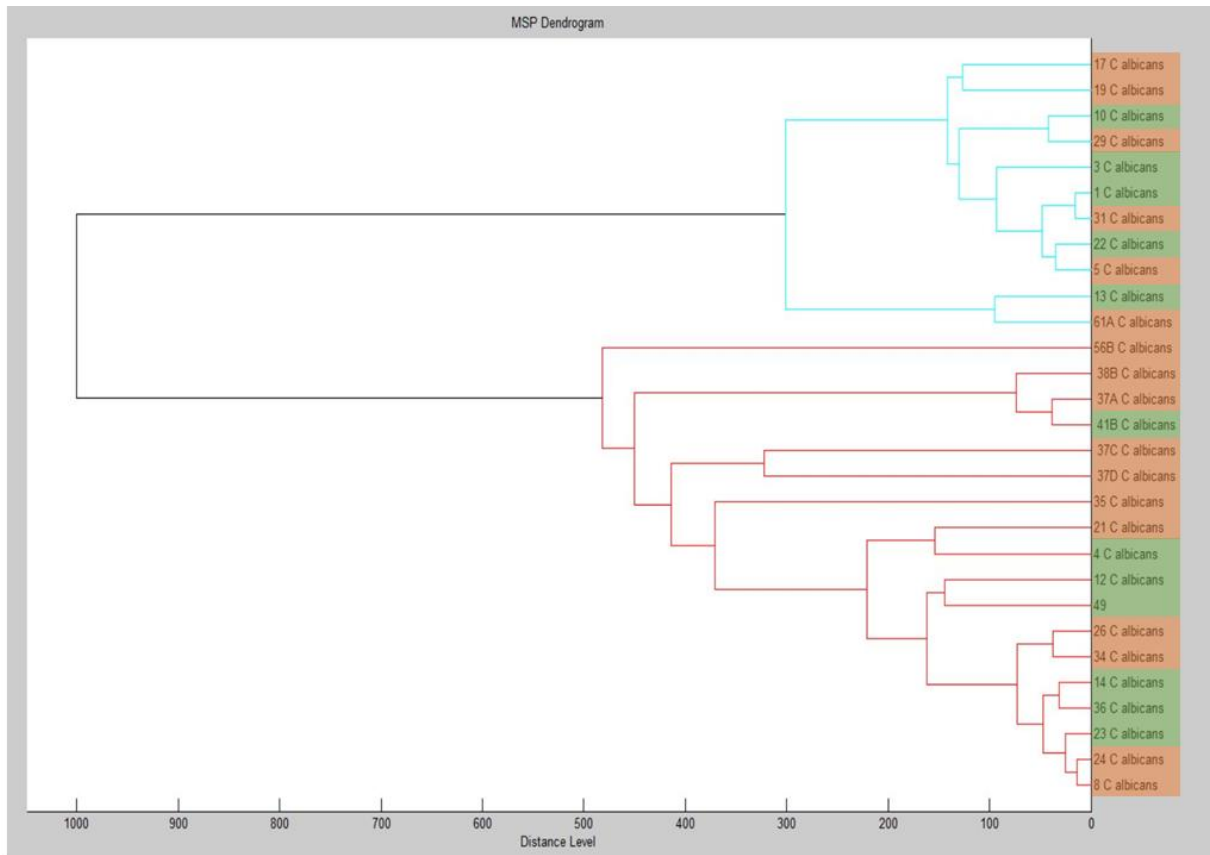


Figure 4. Phylogenetic tree using 18S SSUrDNA sequences of *C. glabrata* recovered from hospital patients and their health professionals. The figure shows *C. glabrata* divided into several monophyletic clusters, each containing ICU patients (orange) and health professionals (green). Numbers on the tree branches represent different ICU patients (orange) and health professionals (green). The scale bar indicates nucleotide substitutions per site.

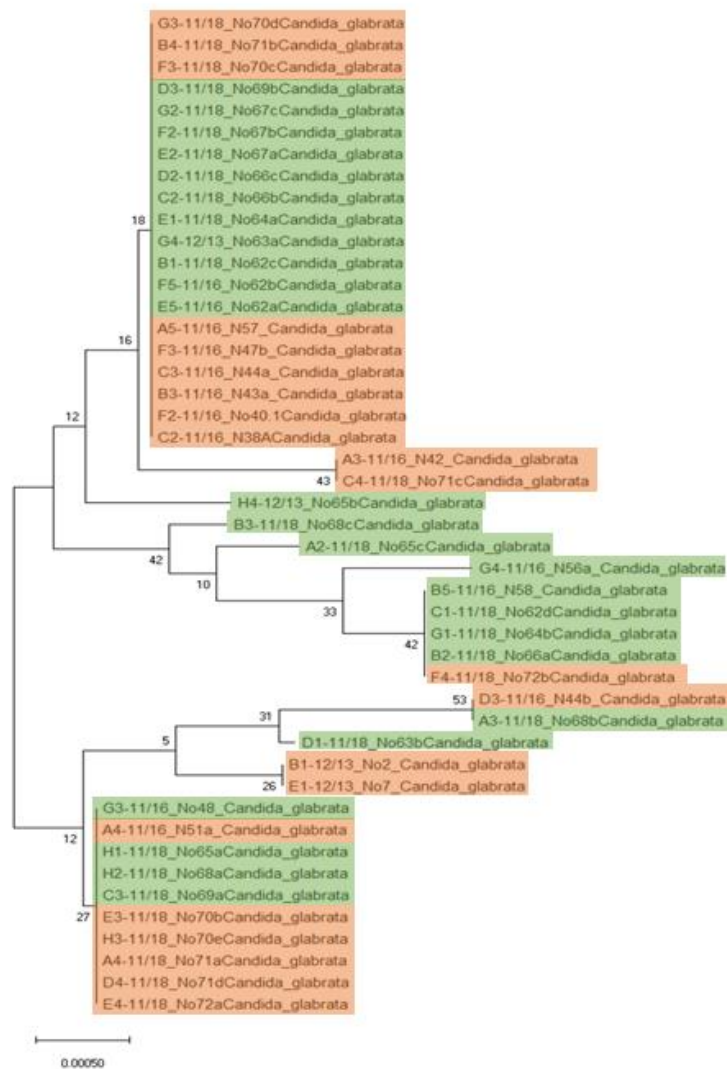


Table 1- Variables and characterization of the selected individuals in the study

Variables	Individuals	Number	%
Group	Cases	69	53,90
	Control	59	46,10
Subgroups	Patients ICU	36	28,12
	Health Professionals	33	25,78
	Control group	59	46,10
Sex	Females	81	63,28
	Males	47	36,71
Age	Adult	115	89,84
	Senior (> 65 year-old)	13	10,16
Profession	Administration ICU	1	0,8
	Pharmacy assistant	4	3,1
	Biomedical	1	0,8
	COVID patient	36	28,1
	Dentist	1	0,8
	Nurse	4	3,1
	Medical Student	1	0,8
	Pharmaceutical	1	0,8
	Physiotherapist	1	0,8
	Speech therapist	1	0,8
	G. Control	59	46,1
	Cleaning personnel	1	0,8
	Physician (female)	1	0,8
	Physician (male)	1	0,8
	Nutritionist	1	0,8
	Nursing assistant	13	10,2
Growth	Case	35	79,54
Negative	Control	9	20,46

ICU= Intensive care unit

Table 2. Cross comparison between isolates recovered from hospital individuals versus control group

Species	Hospital (%)	Control (%)	Total (%)
<i>Candida albicans</i>	29 (26,4%)	39 (56,5%)	68 (38,0%)
<i>C. glabrata</i>	51 (46,4%)	1 (1,4%)	52 (29,1%)
<i>C. parapsilosis</i>	11 (10,0%)	12 (17,4%)	23 (12,8%)
<i>C. tropicalis</i>	5 (4,5%)	4 (5,8%)	9 (5,0%)
<i>C. dubliensis</i>	5 (4,5%)	2 (2,9%)	7 (3,9%)
<i>C. orthopsilosis</i>	1 (0,9%)	6 (8,7%)	7 (3,9%)
<i>Pichia kudriavzevii</i>	3 (2,7%)	0 (0,0%)	3 (1,7%)
<i>Trichosporon asahii</i>	2 (1,8%)	1 (1,4%)	3 (1,7%)
<i>C. guilliermondii</i>	1 (0,9%)	1 (1,4%)	2 (1,1%)
<i>C. lusitaniae</i>	0 (0,0%)	1 (1,4%)	1 (0,6%)
<i>Ogataea polymorpha</i>	1 (0,9%)	0 (0,0%)	1 (0,6%)
<i>Pichia manshurica</i>	1 (0,9%)	0 (0,0%)	1 (0,6%)
<i>Pseudomonas</i>	0 (0,0%)	1 (1,4%)	1 (0,6%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0 (0,0%)	1 (1,4%)	1 (0,6%)
Total	110 (100,0%)	69 (100,0%)	179 (100,0%)

Table 3. The use of Chi-square test to investigate differences between Subgroups.

Species	Patient ICU	Health Care workers	Total
<i>Candida glabrata</i>	26(23,6%) _a	25(22,7%) _a	51(46,4%)
<i>C. albicans</i>	14(12,7%) _a	15(13,6%) _a	29 (16,5%)
<i>C. parapsilosis</i>	5(4,5%) _a	6(5,5%) _a	11(10,0%)
<i>C. tropicalis</i>	4(3,6%) _a	1(0,9%) _a	5(4,5%)
<i>C. dubliensis</i>	3 (2,7%) _a	2 (1,8%) _a	5 (4,5%)
<i>Pichia kudriavzevii</i>	1(0,9%) _a	2(1,8%) _a	3(2,7%)
<i>Trichosporon asahii</i>	1(0,9%) _a	1(0,9%) _a	2(1,8%)
<i>C. guilliermondii</i>	1(0,9%) _a	0(0,0%) _a	1(0,9%)
<i>Ogataea polymorpha</i>	0(0,0%) _a	1(0,9%) _a	1(0,9%)
<i>C. orthopsilosis</i>	1(0,9%) _a	0(0,0%) _a	1(0,9%)
<i>Pichia manshurica</i>	1(0,9%) _a	0(0,0%) _a	1(0,9%)
Total	57(51,8%)	53(48,2%)	110(100,0%)

^a Do not differ significantly from each other at the 0.05 level by the chi-square test.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados dessa pesquisa, torna-se relevante reforçar a necessidade da compreensão do real papel da microbiota oral, demonstrando a importância de elaborar estratégias de biossegurança para combater infecções nosocomiais geradas pelos microrganismos estudados nessa pesquisa. A capacidade de aderir a superfícies abióticas e de diminuir o metabolismo basal para sobreviver fora do hospedeiro por um longo período, salienta esse indício de que possa existir uma transmissão horizontal de leveduras no ambiente hospitalar, enfatizando a necessidade de rever as estratégias existentes de biossegurança hospitalares. É importante refletir que a transmissão entre paciente e profissional é de grande preocupação, já que além das características citadas acima, o gênero *Candida* tem a capacidade de se reproduzir de forma sexuada, um tanto quanto problemático, no que se refere a nova espécie desse gênero notificada pela ANVISA, a *Candida auris*, a qual apresenta resistência a vários antifúngicos existentes no mercado. Essa resistência a antifúngico poderia ser facilmente transmitida se essa espécie e outras espécies desse gênero que apresentam resistência intrínseca a antifúngicos trocarem informações com outras espécies que não apresentam essa característica. Em destaque a uma dessas espécies com resistência intrínseca a antifúngico, no grupo caso (PUB, no qual se encontram os pacientes com COVID-19, e PAS, de profissionais que atuam na UTI), a espécie com maior prevalência foi a *Candida glabrata*, a qual apresenta resistência intrínseca a fluconazol (medicamento de primeira escolha para tratamento de infecções fúngicas). Já o grupo controle, *Candida albicans* apresentou maior prevalência, sendo considerada uma espécie comum e sem resistência intrínseca a antifúngicos.

Com os dados obtidos nessa pesquisa, devem ser propostos novos protocolos que possam culminar com um maior controle de transmissão desses microrganismos, visando prevenir, controlar e eliminar riscos de contaminação de superfícies e transmissão de patógenos para o controle de infecções secundárias a COVID-19 que apresentam riscos para a qualidade de vida e saúde humana, resultando em mais segurança tanto para os pacientes internados quanto para os profissionais da área de saúde responsáveis por seus cuidados.

REFERÊNCIAS

AGRESTI, A., KATERI, M. **Categorical Data Analysis**. Gainesville, Florida: John Wiley., v. 45. 2011.

ATAÍDES, F. S. et al. **Identificação de espécies de *Candida* em saliva de profissionais da saúde**. Rev. Eletr. Enf., Goiânia, v. 12, n. 3, p. 498-501, 2010.

AVILA, M., OJCIUS, D. M., YILMAZ, O. **The Oral Microbiota: Living with a Permanent Guest**. J DNA and Cell Biology., v. 28, n. 8, p. 405-411. 2009.

BAUMGAEDNER, D. J. **Oral Fungal Microbiota: Thrush and Beyond**. J Patient Cent Res Rev., v. 6, n. 4, p. 252-61. 2019.

BLISS, JM. et al. **Vertical and horizontal transmission of *Candida albicans* in very low birth weight infants using DNA fingerprinting techniques**. Pediatr Infect Dis J., n. 27, p. 231-5, 2008.

COHEN, J. **Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences**. 1988.

CORTIVO, A. C. M. D. et al. **complicações de cândida em pacientes da uti: uma revisão bibliográfica**. Separata de: DALAZOANA, K. **Fundamentos e Aplicações da Biologia**. Paraná: Atena, cap. 18, p. 167-171. 2019.

DE GROOT, P. W. J. et al. **Adhesins in human fungal pathogens: Glue with plenty of stick**. Eukaryotic Cell, v. 12, n. 4, p. 470–481. 2013.

DOI, A.M. et al. **Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program**. PLoS One, v. 11, n. 1, 2016.

FACCIOLÁ, A. et al. **The role of the hospital environment in the healthcare-associated infections: a general review of the literature**. Eur Rev Med Pharmacol Sci., v. 23, p. 1266-1278. 2019.

FELSENSTEIN J. **Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap**. *Evolution*, v. 39, p. 783-791. 1985.

FERNANDEZ-ARENAS, E. et al. ***Candida albicans* actively modulates intracellular membrane trafficking in mouse macrophage phagosomes**. Cell. Microbiol., v. 11, p. 560 –589. 2009.

FLEISS, J. L. **The Design and Analysis of Clinical Experiments**. New York: John Wiley & Sons. 1989.

GERMANO, V. E. et al. **Microrganismos habitantes da cavidade oral e sua relação com patologias orais e sistêmicas: revisão de literatura**. Rev Cien Sau Nov Esp., v. 16, n. 2, p. 91- 99. 2018.

GHANNOUM, M. A. et al. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. J PLoS Pathog., v. 6, n. 1, 2010.

HE, J. et al. **The oral microbiome diversity and its relation to human diseases**. J Folia Microbiol., v. 60, n. 1, p. 69-80. 2015.

JEFFERY-SMITH, A. et al. ***Candida auris*: A Review of the literature**. Clinical Microbiology Review, v. 31, 2018.

KIMURA M. **A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences**. *Journal of Molecular Evolution*, v.16, p. 111-120. 1980.

KUMAR S., STECHER G., LI M., KNYAZ C., and TAMURA K. **MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms**. *Molecular Biology and Evolution*, v. 35, p. 1547-1549. 2018.

LI, G.; FAN, Y.; LAI, Y. *et al.* Coronavirus infections and immune responses. **Journal of**

MAYER F.L., WILSON, D., HUBE, B. ***Candida albicans* pathogenicity mechanisms**. *Virulence*, v. 4, p. 119–128. 2013.

NETO, M., DANESI, C., UNFER, D. **Candidíase Bucal revisão da literatura**. *Rev. Saúde, RS*, v. 31, n. 1-2, p. 16-26, 2005.

NEVILLE, B. W. *et al.* **Patologia Oral e Maxilofacial**. 4th ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

NUNES, M. **Leveduras clínicas isoladas de pacientes em unidade de terapia intensiva: avaliação quanto à capacidade de aderência**. *Rev. Estácio Recife. Recife*, v. 5, n. 2, p. 1-8, dez. 2019.

PONZONI, A. *et al.* **Qual a importância da Odontologia Hospitalar**. *Rev. Bras. Odontol.*, Rio de Janeiro, v. 69, n. 1, p. 90-3, jun. 2012.

RAY, T.L., PAYNE, C.D. **Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis: a role for *Candida* acid proteinase**. *Infect. Immun.*, v. 56, p. 1942–1949. 1988.

SAITOU N. and NEI M. **The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees**. *Molecular Biology and Evolution*, v. 4, p. 406-425. 1987.

SIQUEIRA, J. et al. **Candidíase oral em pacientes internados em UTI.** Rev. Bras. Odontol., Rio de Janeiro, v. 71, n. 2, p. 176-9, dez. 2014.

SPIVAK, ES., HANSON, KE. ***Candida auris*: an emerging fungal pathogen.** Journal Clinical Microbiology, v. 56, p. 588-17. 2018.

SPOLIDORIO, L. C. et al. **The frequency of *Candida* sp. In biopsies of oral mucosal lesions.** Pesqui Odontol Bras., v. 17, n. 1, p. 89-93. 2003.

SQUERI, R. et al. **“Clean care is safer care”: correct handwashing in the prevention of healthcare associated infections.** Ann Ig., v. 28, p. 409-415. 2016.

STRAMANDINOLI, R.T. et al. **Prevalência de candidose bucal em pacientes hospitalizados e avaliação dos fatores de risco.** Rev. Sul-Bras Odontol., v. 7, n. 1, p. 66-72. 2010.

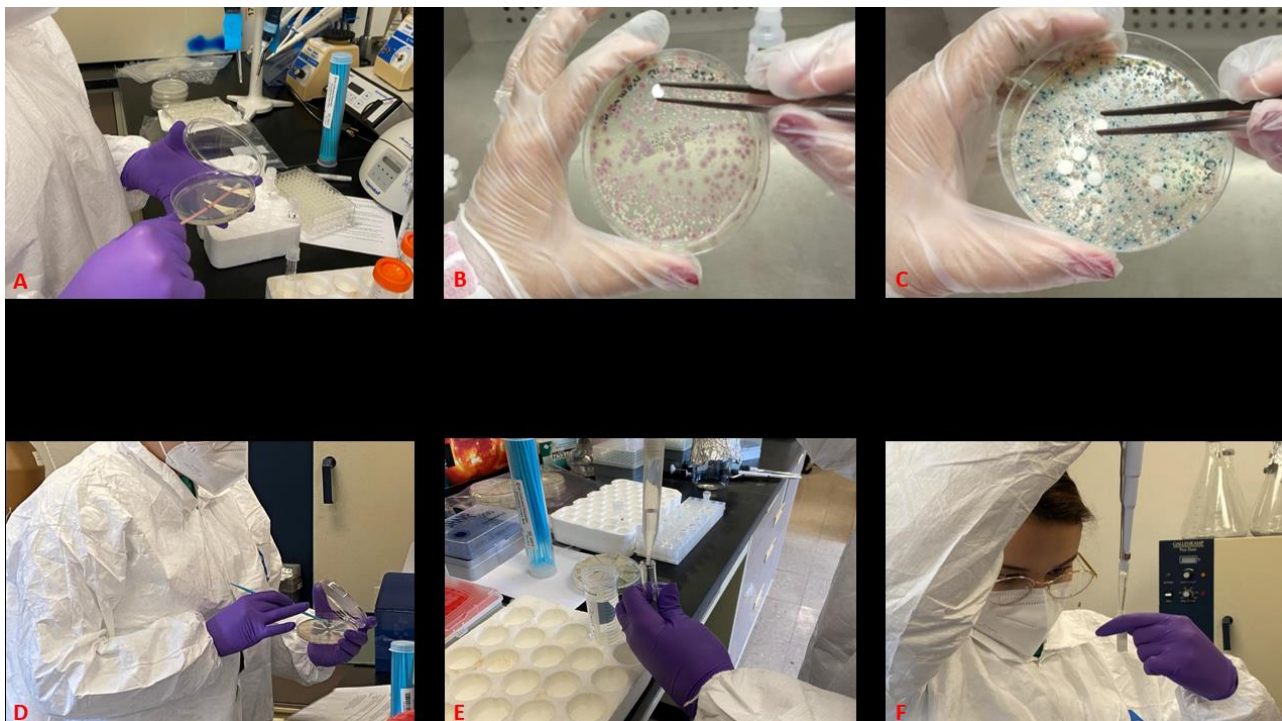
TEIXEIRA KCF, SANTOS LM, AZAMBUJA FG. **Análise da eficácia da higiene oral de pacientes internados em unidade de terapia intensiva em um hospital de alta complexidade do sul do Brasil.** Rev. Odontol. Univ. Cid. São Paulo, v. 31, n. 2, p. 134-44, Abr-jun. 2019.

VALLABHANENI, S. et al. ***Candida auris*: An Emerging Antimicrobial Resistance Threat.** Annals of Internal Medicine, p. 1-2, Jul. 2019.

WADE, W. **The oral microbiome in health and disease.** J Pharmacological Research., v. 69, p. 137-143. 2013.

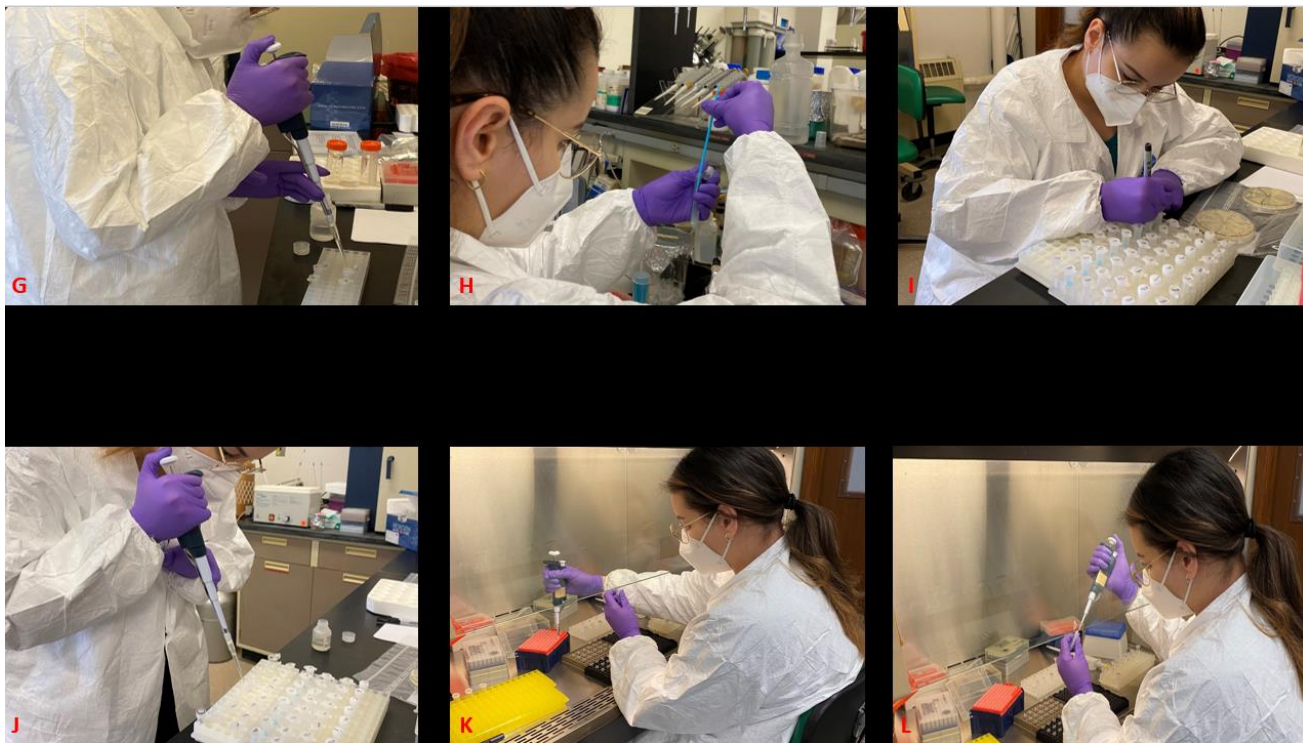
APÊNDICE A – FIGURAS

Figura 8 – Sequência laboratorial do plaqueamento a extração genômica.



A- Plaqueamento. B- Coleta de amostras. C- Coleta de amostras. D, E e F Extração genômica.

Figura 9 -Sequência Laboratorial do PCR.



G, H, I e J- Extração genômica. K e L- PCR

APÊNDICE B - QUESTIONÁRIO EXCLUDENTE PARA POPULAÇÃO ISENTA DE CONTATO HOSPITALAR

Seleção de pacientes para a pesquisa

Número de identificação: _____

Sexo biológico: _____

Idade: _____

() Adultos entre 20 e 55 anos

- Foi realizado tratamento odontológico nos últimos 6 meses?

() Sim

() Não

- Está fazendo uso de algum medicamento atualmente?

() Antibióticos () Corticoides () Imunossupressores.

- É portador de doenças Crônicas, Diabetes, Lúpus, Doenças Infecciosas?

() Sim

() Não

Se sim, qual?

- É Etilista?

() Sim

() Não

- É Fumante?

() Sim

() Não

ANEXO A - CARTA DE ACEITE DA MICHIGAN STATE UNIVERSITY PARA DESENVOLVIMENTO DO PROJETO DE PESQUISA

**MICHIGAN STATE
UNIVERSITY**

September 29, 2019

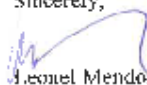
Camila Rocha Vilela
Rua B
Nr. 353 - Condomínio Estâncias das Amendoeiras
Lagoa Santa - Minas Gerais -
Brasil CEP- 33400000

We are pleased to inform that our laboratory at Michigan State University will provide support for your research project on *Candida* species. This will include trips to our research laboratory in East Lansing, Michigan to conduct some of the molecular aspects of the research and the cost of some materials need it to complete the research.

If you have further questions regarding this collaboration, please contact us by e-mail, phone or by regular mail to the below address.

Sincerely,




Leonel Mendoza,
Professor,
Biomedical Laboratory Diagnostics Program,
Department of Microbiology and Molecular Genetics,
Michigan State University
354 Farm Lane, North Kedzie Hall
East Lansing, MI 48824-1031
Tel: (517)432-1234
Fax: (517)432-2006
mendoza9@msu.edu

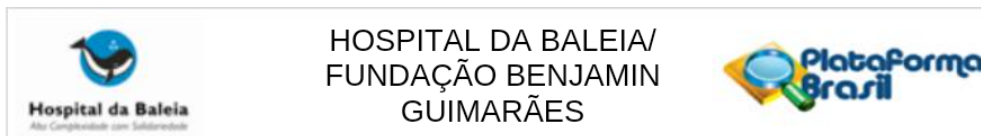
**College of Natural
Science**

**Biomedical Laboratory
Diagnostics
North Kedzie Hall**

354 Farm Lane, Room 1031
East Lansing, MI 48824

517-353-7800
Fax: 517-432-2006
eldmsu.edu

ANEXO B – PARECER APROVAÇÃO CEP – HOSPITAL DA BALEIA E UFMG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo Comparativo da Microbiota Fúngica Oral em Profissionais da área da Saúde, Pacientes de unidade de Terapia Intensiva(Hospital da Baleia) e Indivíduos Isentos de Contato Hospitalar.

Pesquisador: Raquel Virgínia Rocha Vilela

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 31806720.0.0000.5123

Instituição Proponente: Hospital da Baleia/ Fundação Benjamin Guimarães

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Minas Gerais
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.186.449

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de Mestrado da pesquisadora Camila Rocha Vilela, na área de Odontologia Hospitalar com foco em micologia bucal.

As diversas espécies de *Candida* sp habitam a mucosa oral e a depender das condições do indivíduo tais como comorbidades e uso de medicações como antibióticos e corticosteróides pode haver uma desregulação da flora oral que torna estas espécies patogênicas. Isso ocorre especialmente em pacientes graves e polimedicados, como os em Terapia Intensiva. Profissionais expostos a estes pacientes podem potencialmente se contaminar ou ser fonte de contaminação. O estudo proposto visa estudar as espécies de *cândida* que pacientes da UTI do Hospital da Baleia em BH (N= 30), em profissionais de saúde da UTI (N= 30) e controles isentos de contato hospitalar (N= 30).

Objetivo da Pesquisa:

Identificar através de cultura de swab bucal e técnicas de biologia molecular as principais espécies de *Candida* sp presentes em: (1) Profissionais de saúde da UTI do Hospital da Baleia; (2) Pacientes de UTI do H Baleia; (3) Indivíduos da comunidade isentos de contato hospitalar. Serão identificadas as espécies de *cândida* e será feita uma comparação entre os grupos e especialmente tentar

Endereço: Rua Juramento, 1464

Bairro: Saudade

CEP: 30.285-000

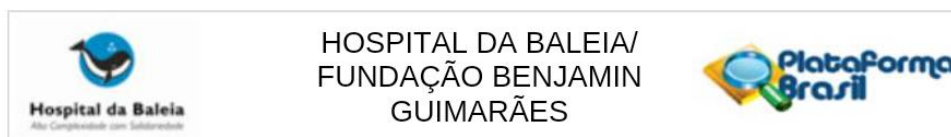
UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3489-1548

Fax: (31)3461-4840

E-mail: cep@hospitaldabaleia.org.br



Continuação do Parecer: 4.186.449

determinar possíveis transmissões nas populações de pacientes de UTI e profissionais de UTI

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Como não haverá intervenção e haverá apenas um teste não invasivo, por swab, não há riscos. Também não há benefícios para os sujeitos de pesquisa. Ademais a coleta será única e o tempo doado será pequeno.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

SOBRE AS PENDÊNCIAS: Respostas no item 3.1 - Materiais e Métodos - da Brochura do estudo.

- Explicar melhor quem serão e onde e como serão abordados/recrutados os controles (indivíduos não expostos a ambiente hospitalar): O grupo controle será formado por indivíduos saudáveis, que serão recrutados e selecionados da Comunidade Morro Alto em Vespasiano, que se encontram isentos de contato com a área hospitalar (ICH) (questionário excludente em anexos página 13).
- Explicar se há questionários ou critérios de inclusão/exclusão específicos para os profissionais de UTI e para os pacientes de UTI: não há questionário para recrutamento destes grupos

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Folha de rosto, Brochura e CV dos pesquisadores adequados
- Carta de anuência da Instituição e da Coordenação da UTI - fornecidas
- TCLE: presente um TCLE para os três grupos
- Cronograma: datas corrigidas

Recomendações:

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (CEP-UFMG) sob o número CAAE: 31806720.0.0000.5123 e aguarda aprovação para início das atividades.

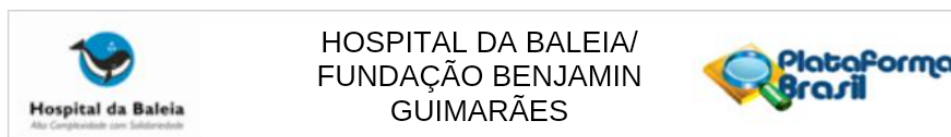
Solicitamos ao(s) pesquisador(es) que o conteúdo do projeto aprovado na UFMG seja idêntico ao aprovado no Hospital da Baleia.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Juramento, 1464
 Bairro: Saudade CEP: 30.285-000
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3489-1548 Fax: (31)3461-4840 E-mail: cep@hospitaldabaleia.org.br



Continuação do Parecer: 4.186.449

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1556262.pdf	26/07/2020 12:03:10		Aceito
Outros	Carta_ao_comite_de_etica.pdf	26/07/2020 12:02:38	Raquel Virgínia Rocha Vilela	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_mestrado_COF.docx	26/07/2020 11:59:20	Raquel Virgínia Rocha Vilela	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	23/06/2020 19:05:35	Raquel Virgínia Rocha Vilela	Aceito
Outros	comunicadointerno.pdf	23/06/2020 19:03:36	Raquel Virgínia Rocha Vilela	Aceito
Outros	cartall.pdf	23/06/2020 19:02:52	Raquel Virgínia Rocha Vilela	Aceito
Outros	cartal.pdf	23/06/2020 19:02:36	Raquel Virgínia Rocha Vilela	Aceito
Outros	QUESTIONARIOEXCLUDENTE PARAP OPULACAOISENTE DECONTATO HOS PITALAR.docx	23/06/2020 19:01:36	Raquel Virgínia Rocha Vilela	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	23/06/2020 18:15:00	Raquel Virgínia Rocha Vilela	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	13/05/2020 15:20:31	Raquel Virgínia Rocha Vilela	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 31 de Julho de 2020

Assinado por:
Geraldo Felício da Cunha Júnior
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Juramento, 1464
Bairro: Saudade **CEP:** 30.285-000
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3489-1548 **Fax:** (31)3461-4840 **E-mail:** cep@hospitaldabaleia.org.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO COMPARATIVO DA MICROBIOTA FÚNGICA ORAL EM PROFISSIONAIS DA ÁREA DA SAÚDE, PACIENTES INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA E INDIVÍDUOS ISENTOS DE CONTATO HOSPITALAR

Pesquisador: Raquel Virgínia Rocha Vilela

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;);
(Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniente com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;);

Versão: 2

CAAE: 45240721.4.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.890.240

Apresentação do Projeto:

Este estudo tem como objetivo mapear e comparar as principais espécies de *Candida* presentes na cavidade oral de profissionais das áreas da saúde que atuam dentro da ala de UTI do Hospital da Baleia (PAS), pacientes internados na UTI do Hospital da Baleia (PUB) e em indivíduos saudáveis isentos de contato hospitalar (ICH). Trata-se de estudo de caso-controle observacional analítico para determinar a presença das espécies de fungos leveduriformes na cavidade orofaríngeas em indivíduos internados na UTI (PUB 30 pacientes) e nos profissionais da área da Saúde que trabalham diretamente na ala da UTI (PAS 30 indivíduos) do Hospital da Baleia incluindo médicos, enfermeiros, técnicos de enfermagem, dentistas e farmacêuticos. Esta pesquisa contará com a participação total de 90 indivíduos, sendo 30 participantes em cada grupo estudado. O cálculo amostral foi obtido pela metodologia proposta por Fleiss, 1989, com referência aos valores de "d" sugeridos por Cohen, 1988, ("d" significa tamanho do fator de risco relativo para comparação entre grupos) de médio risco relativo definido com o valor de 0,5. Aplicando a fórmula de Fleiss, considerando os valores de nível de significância (respectivamente =5%) e o poder do teste

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.890.240

(respectivamente =80%), o resultado gerado para a amostragem do estudo foi de 29 participantes em cada grupo, na qual esse valor foi arredondado para 30 participantes, com a intenção de facilitar a realização da análise dos resultados e elaboração/organização dos dados estatísticos. O grupo controle será previamente selecionado com alguns critérios específicos: os participantes deverão ter entre 20 e 55 anos, não poderão ter realizado tratamento odontológico nos últimos 6 meses, não fazer ou ter feito uso de algum tipo de medicamento, não ser portador de alguma doença sistêmica crônica e não ser etilista e fumante. O grupo controle será formado por indivíduos saudáveis, que serão recrutados e selecionados da Comunidade Morro Alto em Vespasiano, que se encontram isentos de contato com a área hospitalar (ICH) (questionário excludente em anexos página 50). Na população PUB serão excluídos aqueles que estiverem fazendo uso de antifúngicos e a associação de sulfametoxazol + trimetropim (fatores que influenciam na recuperação do microrganismo em cultivo). Já na PAS, não terá questionário excludente, já que o objetivo desse projeto é avaliar se há, na prática do dia a dia, uma transmissão horizontal entre PUB e PAS. Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, os participantes elegíveis serão submetidos a coleta oral, que será realizada com um swab bucal para a obtenção da amostra biológica. Estas amostras serão identificadas utilizando o teste de cultivo CHROMagar. Após a identificação inicial das espécies de *Candida*, as amostras passarão por uma análise genômica, através de testes de biologia molecular que se inicia com a extração do DNA genômico das amostras. Após obter os fragmentos de DNA, por meio do método de PCR, será aplicado a metodologia de RFLP com enzimas de restrição/corte específicas indicadas para espécies de *Candida*. A metodologia relacionada a microbiologia será realizada em dois laboratórios. A primeira parte, de isolamento dos cultivos originais dos indivíduos envolvidos no estudo, serão realizados no laboratório de Micologia da Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte, Brasil, na direção da Profa. Dra. Raquel Vilela. A segunda parte inclui a sessão molecular e MALDI-TOF que serão realizados no laboratório de Micologia Médica, na sessão do Biomedical Laboratory Diagnostics, Michigan State University, East Lansing -Michigan, Estados Unidos, na direção do Prof. Dr. Leonel Mendoza. O resultado do teste de RFLP dos grupos PAS e PUB serão comparados, com a intenção de avaliar se há o mesmo polimorfismo entre as espécies de *Candida* nos diferentes grupos. O desfecho primário previsto será a correlação dos dados encontrados com a determinação de uma possível transmissão horizontal entre as populações PAS e os PUB. O desfecho secundário será a revisão e elaboração de estratégias de biossegurança, para contribuir com um maior controle de uma possível contaminação de superfícies e na transmissão de patógenos que apresentam riscos para a

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Sl 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.890.240

qualidade de vida dos participantes envolvidos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar as principais espécies de *Candida* presentes na cavidade oral de profissionais das áreas da saúde que trabalham dentro da ala de UTI do Hospital da Baleia (PAS), pacientes internados na UTI do Hospital da Baleia (PUB) e em indivíduos saudáveis isentos de contato hospitalar (ICH).

Objetivo Secundário:

1. Identificar as espécies de leveduras do gênero *Candida* utilizando metodologias de cultivo (CHROMagar) e de MALDI-TOF;
2. Analisar os genótipos de RLFP nos isolamentos de *Candida* presentes em cada uma das populações deste estudo;
3. Correlacionar os dados encontrados para determinar possíveis transmissões horizontais nas populações PAS e os PUB. Comparar esses resultados com a microbiota leveduriforme no grupo de indivíduos controle ICH.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O risco para essa pesquisa é o constrangimento dos participantes da pesquisa ao se submeterem a coleta bucal. Nos TCLEs: "Minha participação na pesquisa envolve o risco de desconforto e constrangimento durante a coleta dos dados. Porém, a coleta será feita em local reservado e tranquilo e posso negar a qualquer momento de não participar da coleta se não sentir à vontade."

Benefícios:

A realização do estudo, além de contribuir com o desenvolvimento e melhorias na saúde pública, beneficiará os usuários do Sistema Único de Saúde com a revisão e busca de novas estratégias existentes de biossegurança afim de prevenir, controlar e eliminar riscos de contaminação de superfícies e transmissão de patógenos que apresentam riscos e que possam interferir ou comprometer a qualidade de vida e saúde humana.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante para as áreas de Odontologia Hospitalar, Microbiologia Oral e Saúde Pública. Término previsto para 12/07/2022. O projeto foi aprovado pela câmara departamental em 09/02/2021. Foi apresentado orçamento financeiro, onde observa-se que parte da pesquisa será

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.890.240

financiada pela Michigan State University. O cronograma de execução e o orçamento financeiro foram adequadamente ajustados na Plataforma Brasil.

Parte da pesquisa será desenvolvida em Michigan State University; foi apresentada a carta assinada pelo professor responsável pelo laboratório onde a pesquisa será realizada na Michigan State University, informando que oferecerá o suporte à realização da mesma.

Foi anexado o parecer substanciado do Hospital da Baleia, onde haverá coleta da pesquisa. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo CEP do Hospital da Baleia em 31 de julho de 2020. Foi esclarecido que a UFMG foi colocada como Proponente, e foi realizada a mudança da instituição Hospital da Baleia para centro co-participante.

Foi descrito que haverá retenção de amostra, será coletado swab da mucosa jugal dos participantes da pesquisa, que serão lacrados e transportados ao Laboratório de Micologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, onde será feito o isolamento dos cultivos originais dos indivíduos envolvidos no estudo. Posteriormente, a análise molecular e MALDI-TOF serão realizados no laboratório de Micologia Médica, na sessão do Biomedical Laboratory Diagnostics, Michigan State University, East Lansing - Michigan, Estados Unidos, na direção do Prof. Dr. Leonel Mendoza. Desta forma, foi adequadamente anexado o termo de constituição de biorrepositório.

Os TCLEs foram parcialmente modificados. A partir do tópico 3, o texto continua redigido no formato auto-declarado ("A minha participação na pesquisa envolve o risco de..."; "A minha participação neste projeto deverá ter a duração de..."; "Não terei nenhuma despesa ao participar..."; "Eu fui informado e estou ciente de que não há nenhum valor..."). Reescrever o texto de forma que as pesquisadoras informam ao participante sobre sua participação na pesquisa ("A sua participação na pesquisa envolve o risco de..."; "A sua participação neste projeto deverá ter a duração de..."; "Você não terá nenhuma despesa ao participar..."; "Você não receberá nenhum valor..."). As demais alterações foram satisfatoriamente realizadas nos TCLEs.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Este parecer foi elaborado com base nos seguintes documentos anexados à Plataforma Brasil:

- Informações Básicas do Projeto;
- Carta-resposta às diligências;
- Termo de constituição de biorrepositório;
- Folha de Rosto (não contém os dados do responsável pela instituição: cpf, cargo, data);
- TCLE grupo sem contato hospitalar;
- TCLE grupo pacientes UTI;

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.890.240

financiada pela Michigan State University. O cronograma de execução e o orçamento financeiro foram adequadamente ajustados na Plataforma Brasil.

Parte da pesquisa será desenvolvida em Michigan State University; foi apresentada a carta assinada pelo professor responsável pelo laboratório onde a pesquisa será realizada na Michigan State University, informando que oferecerá o suporte à realização da mesma.

Foi anexado o parecer substanciado do Hospital da Baleia, onde haverá coleta da pesquisa. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo CEP do Hospital da Baleia em 31 de julho de 2020. Foi esclarecido que a UFMG foi colocada como Proponente, e foi realizada a mudança da instituição Hospital da Baleia para centro co-participante.

Foi descrito que haverá retenção de amostra, será coletado swab da mucosa jugal dos participantes da pesquisa, que serão lacrados e transportados ao Laboratório de Micologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, onde será feito o isolamento dos cultivos originais dos indivíduos envolvidos no estudo. Posteriormente, a análise molecular e MALDI-TOF serão realizados no laboratório de Micologia Médica, na sessão do Biomedical Laboratory Diagnostics, Michigan State University, East Lansing - Michigan, Estados Unidos, na direção do Prof. Dr. Leonel Mendoza. Desta forma, foi adequadamente anexado o termo de constituição de biorrepositório.

Os TCLEs foram parcialmente modificados. A partir do tópico 3, o texto continua redigido no formato auto-declarado ("A minha participação na pesquisa envolve o risco de..."; "A minha participação neste projeto deverá ter a duração de..."; "Não terei nenhuma despesa ao participar..."; "Eu fui informado e estou ciente de que não há nenhum valor..."). Reescrever o texto de forma que as pesquisadoras informam ao participante sobre sua participação na pesquisa ("A sua participação na pesquisa envolve o risco de..."; "A sua participação neste projeto deverá ter a duração de..."; "Você não terá nenhuma despesa ao participar..."; "Você não receberá nenhum valor..."). As demais alterações foram satisfatoriamente realizadas nos TCLEs.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Este parecer foi elaborado com base nos seguintes documentos anexados à Plataforma Brasil:

- Informações Básicas do Projeto;
- Carta-resposta às diligências;
- Termo de constituição de biorrepositório;
- Folha de Rosto (não contém os dados do responsável pela instituição: cpf, cargo, data);
- TCLE grupo sem contato hospitalar;
- TCLE grupo pacientes UTI;

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.890.240

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1714278.pdf	14/07/2021 13:56:02		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDetalhadoBrochuraInvestigador.pdf	14/07/2021 13:54:04	Raquel Virgínia Rocha Vilela	Aceito
Outros	CartaResposta.pdf	14/07/2021 13:44:34	Raquel Virgínia Rocha Vilela	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	DeclaracaodeManuseioMaterialBiologicoBiorepositorio.pdf	14/07/2021 13:42:17	Raquel Virgínia Rocha Vilela	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	14/07/2021 13:33:43	Raquel Virgínia Rocha Vilela	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEPopulacaoemcontatohospitalar.docx	14/07/2021 13:32:28	Raquel Virgínia Rocha Vilela	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEpacienteUTI.docx	14/07/2021 13:32:15	Raquel Virgínia Rocha Vilela	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	14/07/2021 13:31:50	Raquel Virgínia Rocha Vilela	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	14/07/2021 13:31:30	Raquel Virgínia Rocha Vilela	Aceito
Brochura Pesquisa	BrochuraPesquisa1.pdf	14/07/2021 13:30:55	Raquel Virgínia Rocha Vilela	Aceito
Folha de Rosto	FolhaderostoProfaRaquelVilela.pdf	31/03/2021 13:56:44	Raquel Virgínia Rocha Vilela	Aceito
Declaração do Patrocinador	Cartadefinanciamentodoanteprojecto.pdf	08/03/2021 17:05:48	Raquel Virgínia Rocha Vilela	Aceito
Outros	QUESTIONARIOEXCLUDENTEPARAPOPULACAOISENTEDECONTATOHOSPITALAR.docx	08/03/2021 16:53:37	Raquel Virgínia Rocha Vilela	Aceito
Parecer Anterior	ParecerCEPhospitaldaBaleia.docx	08/03/2021 16:38:42	Raquel Virgínia Rocha Vilela	Aceito
Parecer Anterior	PARECERCOMISSAOPESQUISA.pdf	08/03/2021 16:36:22	Raquel Virgínia Rocha Vilela	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

ANEXO C – SUBMISSÃO DO ARTIGO

Fwd: Submission Confirmation for Investigation of the fungal oral microbiota among hospitalized patients with COVID-19 and their health professionals

De: Mendoza, Alberto (mendoza9@msu.edu)

Para: camilavilela_odonto@yahoo.com.br

Data: quinta-feira, 14 de julho de 2022 19:36 BRT

[Get Outlook for IQS](#)

From: em.jhi.0.7ca87c.9665b497@editorialmanager.com <em.jhi.0.7ca87c.9665b497@editorialmanager.com>
on behalf of Journal of Hospital Infection <em@editorialmanager.com>

Sent: Thursday, July 14, 2022 6:26:02 PM

To: Mendoza, Alberto <mendoza9@msu.edu>

Subject: Submission Confirmation for Investigation of the fungal oral microbiota among hospitalized patients with COVID-19 and their health professionals

Dear Dr. Mendoza,

Your submission entitled "Investigation of the fungal oral microbiota among hospitalized patients with COVID-19 and their health professionals" has been received by the Editorial Office of the Journal of Hospital Infection (JHI).

You will be able to check on the progress of your submission by logging on to Editorial Manager as an author at

<https://uridefense.com/v3/> <https://www.editorialmanager.com/jhi/> ;!!HXCxUKc!3qZixGc7Fo5V6yxxA83HFSuUXkQAYHvpg0NTTYUaoUGKJ_UYtd5IHITIAEYCfyQ3ju99kpAtXc2ZJ_bKw\$

Please note: due to the outbreak of COVID-19 globally, we are finding it can take longer than usual to find reviewers able to accept review assignments, and in some cases reviewers need additional time to complete their commentaries. There may therefore be some delay to your manuscript if it is sent to peer review. Please do bear with us at this busy time, and if you have any concerns or queries get in touch with the editorial office at admin@his.org.uk.

Thank you for submitting your work to the JHI.

Kind regards,

Editorial Office
Journal of Hospital Infection

FAQ: How can I reset a forgotten password?

<https://uridefense.com/v3/> [https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/kw/editorial%20manager/_Kw!!HXCxUKc!3qZixGc7Fo5V6yxxA83HFSuUXkQAYHvpg0NTTYUaoUGKJ_UYtd5IHITIAEYCfyQ3ju99kpAtXc2ZJ_bKw\\$](https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/kw/editorial%20manager/_Kw!!HXCxUKc!3qZixGc7Fo5V6yxxA83HFSuUXkQAYHvpg0NTTYUaoUGKJ_UYtd5IHITIAEYCfyQ3ju99kpAtXc2ZJ_bKw$)

For further assistance, please visit our customer service site:

<https://uridefense.com/v3/> [https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/_!!HXCxUKc!3qZixGc7Fo5V6yxxA83HFSuUXkQAYHvpg0NTTYUaoUGKJ_UYtd5IHITIAEYCfyQ3ju99kpAtXc2ZJ_bKw\\$](https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/_!!HXCxUKc!3qZixGc7Fo5V6yxxA83HFSuUXkQAYHvpg0NTTYUaoUGKJ_UYtd5IHITIAEYCfyQ3ju99kpAtXc2ZJ_bKw$) . Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL:

<https://uridefense.com/v3/> <https://www.editorialmanager.com/jhi/login.asp?>