



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA
EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

ALESSANDRA LEAL DA SILVA CHAVES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA
DE LEVEDURAS INCOMUNS DA ORDEM *Saccharomycetales*: UMA
SÉRIE DE CASOS DE INFEÇÕES DE CORRENTE SANGUÍNEA EM
PACIENTES COM CÂNCER**

Rio de Janeiro

2021

ALESSANDRA LEAL DA SILVA CHAVES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA
DE LEVEDURAS INCOMUNS DA ORDEM *Saccharomycetales*: UMA
SÉRIE DE CASOS DE INFECÇÕES DE CORRENTE SANGUÍNEA EM
PACIENTES COM CÂNCER**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, para obtenção do grau de Doutor em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadores:
Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Paes
Prof^a. Dr^a. Ianick Souto Martins

Rio de Janeiro

2021

Leal da Silva Chaves, Alessandra.

Caracterização molecular e suscetibilidade antifúngica de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales*: uma série de casos de infecções de corrente sanguínea em pacientes com câncer / Alessandra Leal da Silva Chaves. - Rio de Janeiro, 2021.

170 f.

Tese (Doutorado) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2021.

Orientador: Rodrigo de Almeida Paes.

Co-orientadora: Ianick Souto Martins.

Bibliografia: f. 106-123

1. Saccharomycetales. 2. Leveduras incomuns. 3. Suscetibilidade. 4. Fungemia. I. Título.

ALESSANDRA LEAL DA SILVA CHAVES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE LEVEDURAS
INCOMUNS DA ORDEM *Saccharomycetales*: UMA SÉRIE DE CASOS DE INFECÇÕES DE
CORRENTE SANGUÍNEA EM PACIENTES COM CÂNCER**

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Paes

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Ianick Souto Martins

BANCA EXAMINADORA

Dra. Cristiane da Cruz Lamas

Dr. Carlos Roberto Sobrinho do Nascimento

Dra. Márcia Garnica

Dra. Simone Garruth dos Santos Machado Sampaio

Dra. Maria Helena Galdino Figueiredo de Carvalho

Dr. Fernando Almeida da Silva

Aos meus filhos,
Caio e Julia,
que me ensinam sobre as coisas mais simples e extraordinárias da vida,
que é no presente que está a felicidade de estar vivo
e fazer coisas incríveis acontecer,
a não desistir e sempre tentar mais uma vez.
Ao Professor Dr. Bodo wanke (*in memoriam*),
Mestre e amigo, saudades eternas.

“Um dia de cada vez,
que é pra não perder
as boas surpresas da vida.”

Clarice Lispector
(1920-1977)

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas pela oportunidade oferecida através do curso de pós-graduação em Pesquisa Clínica de Doenças Infecciosas.

Ao corpo docente do curso de pós-graduação em Pesquisa Clínica de Doenças Infecciosas por compartilharem seus conhecimentos.

Ao pesquisador Dr. Bodo Wanke (*in memoriam*) com quem tive a grande oportunidade de aprender e conviver. Obrigada por abrir a porta da Micologia Médica na Fiocruz para mim e me inspirar no diagnóstico micológico. Obrigada pelo carinho, amizade e aprendizado.

Ao meu estimado orientador Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Paes que está sempre de portas abertas para mim. Muito obrigada pela oportunidade de aprendizado, e acima de tudo pelo carinho, compreensão e apoio nos momentos difíceis.

A minha coorientadora Profa. Dra. Ianick Souto Martins com quem tenho a oportunidade de conviver no INCA e dividir não só o trabalho, mas também alegrias, conquistas, perdas e novos desafios. Obrigada pela amizade, carinho, compreensão e constante apoio.

A Prof. Dra. Cristiane Lamas que acompanhou a evolução deste trabalho durante os quatro anos de doutorado. Obrigada pela disponibilidade e atenção dedicadas, com sugestões engrandecedoras.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Sobrinho do Nascimento que participou gentilmente de minha banca de qualificação e contribuiu muito para a finalização deste trabalho. Obrigada pela sua disponibilidade, dedicação e observações.

Aos professores Dra. Cristiane da Cruz Lamas, Dr. Carlos Roberto Sobrinho do Nascimento, Dra. Márcia Garnica, Dra. Maria Helena Galdino Figueiredo de Carvalho Dra. Simone Garruth dos Santos Machado Sampaio e Dr. Fernando Almeida da Silva, por aceitarem participar da minha banca examinadora de doutorado. Obrigada pela troca de conhecimentos, sugestões e críticas fundamentais na finalização deste trabalho.

A Prof^a. Dra. Luciana Trilles que participou ativamente nas análises moleculares deste trabalho. Obrigada por compartilhar seus ensinamentos, pela paciência e disponibilidade.

A coordenadora do Laboratório de Diagnóstico Micológico, Prof^a. Dra. Maria Helena Galdino, obrigada pelo conhecimento partilhado, pela amizade e atenção recebida durante os meus anos de estudo no INI.

Ao pessoal do laboratório de Diagnóstico Micológico, Rowena Alves, Gabriela Alves, Iara, Ingrid, Marcus, Fernando. Obrigada pela atenção, ajuda e companhia sempre que possível.

À plataforma de sequenciamento genômico de DNA PDTIS/Fiocruz por seu excelente trabalho na execução do sequenciamento das amostras deste estudo

Ao pessoal do laboratório de Micologia Ambiental, Profa. Dra. Luciana Trilles, Rosani e Cláudia Vera Pizzini, e também ao pessoal do laboratório de Imunodiagnóstico, Mauro Muniz, Marcos de Abreu Almeida, Vanessa Brito de Souza Rabello, obrigada pela atenção e presteza recebidas.

Aos amigos conquistados durante o trabalho no laboratório de diagnóstico micológico do INI, Fábio Brito, Luã Cardoso, Marcela, Rowena e Mariana, obrigada pela parceria, amizade e pelo incentivo constante durante o curso.

A secretária do curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas Priscila Sá, sempre dedicada e prestativa, obrigada pela atenção.

A querida servidora do RH do INCA, Natália Machado Gomes, muito obrigada pelo apoio, paciência e presteza que permitiram que este curso fosse realizado.

Ao chefe do laboratório de Patologia Clínica do INCA, Jorge de Abreu Dias e aos amigos do laboratório de Patologia Clínica do INCA, obrigada pelo apoio e suporte recebidos com a rotina do laboratório durante minhas atividades no período do curso.

A meu marido, Cláudio, por me incentivar com palavras de força e pelo suporte recebido durante meus estudos. Obrigada pelo carinho e dedicação sempre presentes.

Ao meu pai, Jorge, e a minha mãe, Tania, exemplo de força e dedicação. Muito obrigada por doarem o bem mais precioso de vocês, o tempo, cuidando tão amorosamente de mim e de meus filhos para que eu pudesse trabalhar, estudar e maternar. Sem vocês teria sido impossível.

Aos meus filhos Caio e Julia, meus faróis, que iluminam os meus dias com seus sorrisos e me enchem de amor. Com vocês aprendi que extraordinário é o ordinário que vivemos juntos diariamente. Amo vocês.

A todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, que me incentivaram e me ajudaram a superar esse desafio: muito obrigada!

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	Infecções por <i>Candida</i>	21
1.2	Espécies de <i>Candida</i>	22
1.2.1	Complexo <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	23
1.2.2	Complexo <i>Debaryomyces hansenii</i>	25
1.2.3	<i>Candida auris</i>	25
1.2.4	Complexo <i>Candida haemulonii</i>	27
1.2.5	<i>Candida dubliniensis</i>	28
1.2.6	<i>Candida intermedia</i>	28
1.2.7	<i>Yarrowia lipolytica</i>	29
1.2.8	<i>Kodamaea ohmeri</i>	29
1.2.9	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	30
1.2.10	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	31
1.3	Epidemiologia das Infecções Fúngicas Invasivas por <i>Candida</i> spp.	31
1.4	Fatores de Virulência de <i>Candida</i> spp.....	33
1.5	Métodos de identificação.....	35
1.6	Suscetibilidade aos fármacos antifúngicos.....	37
1.7	Tratamento	38
2	JUSTIFICATIVA.....	40
3	OBJETIVOS.....	41
3.1	Objetivo Geral	41
3.2	Objetivos específicos.....	41
4	MÉTODO	42
4.1	Desenho e período do estudo	42
4.2	Ambiente do estudo	42
4.3	População do estudo.....	42

4.4	Detecção dos casos de fungemia por leveduras incomuns da ordem <i>Saccharomycetales</i>	42
4.5	Critérios de inclusão e exclusão	43
4.6	Materiais, métodos e procedimentos.....	43
4.6.1	Coleta de dados epidemiológicos, clínicos e microbiológicos	43
4.6.1.1	Definições para coleta de dados dos pacientes.....	44
4.6.1.1.1	Infecção de corrente sanguínea (ICS).....	44
4.6.1.1.2	Critérios para ICS com comprovação laboratorial (ICS-CL) ..	44
4.6.1.1.3	Infecção primária de corrente sanguínea (IPCS)	44
4.6.1.1.4	Infecção primária de corrente sanguínea associada ao acesso vascular (IPCS-AV).....	44
4.6.1.1.5	Infecção primária de corrente sanguínea associada a dano de barreira mucosa (IPCS-DBM)	46
4.6.1.1.6	Infecção primária de corrente sanguínea de origem indeterminada (IPCS-IN).....	46
4.6.1.1.7	Infecção secundária de corrente sanguínea (ISCS).....	46
4.6.1.1.8	Estadiamento da doença onco-hematológica.....	48
4.6.1.1.9	Neutropenia.....	48
4.6.1.1.10	Neutropenia profunda.....	48
4.6.1.1.11	Neutropenia febril	48
4.6.1.1.12	Febre.....	49
4.6.1.1.13	Necessidade de terapia intensiva.....	49
4.6.1.1.14	Terapia antifúngica adequada.....	49
4.6.2	Cepas de referência	49
4.6.3	Isolamento e armazenamento das cepas.....	49
4.6.4	Reativação, Viabilidade e Pureza das cepas	50
4.6.5	Autenticação molecular	50
4.6.5.1	Extração do DNA genômico.....	51

4.6.5.2	Amplificação e sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal (rDNA)	51
4.6.5.3	Amplificação e sequenciamento da região D1/D2 da maior subunidade do gene 28S do DNA ribossomal (rDNA)	52
4.6.6	Avaliação de metodologias de determinação da suscetibilidade.....	52
4.6.6.1	Método de diluição - Microdiluição em caldo	52
4.6.6.2	Método de Difusão por Gradiente de Concentração de Antifúngico Pré-definido em Fita - Etest®	53
4.6.6.3	Método automatizado – Sistema VITEK® 2 AST.....	54
4.6.6.4	Comparação das metodologias de determinação da suscetibilidade antifúngica.....	55
4.6.7	Avaliação de fenótipos associados à virulência	55
4.6.7.1	Fatores de virulência.....	55
4.6.7.1.1	Atividade de aspártico protease	56
4.6.7.1.2	Atividade de fosfolipase	56
4.6.7.1.3	Atividade de fitase	57
4.6.7.1.4	Atividade hemolítica	57
4.6.7.1.5	Atividade da catalase ou resistência ao estresse oxidativo...	57
4.6.8	Correlação entre as características clínicas e microbiológicas dos pacientes	57
4.7	Análises Estatísticas.....	58
5	RESULTADOS.....	59
5.1	Descrição da população e cepas selecionados para o estudo.....	59
5.2	Descrição das características epidemiológicas, clínicas e microbiológicas das fungemias por cepas de leveduras incomuns da ordem <i>Saccharomycetales</i>	60
5.3	Cepas.....	65
5.4	Cepas de referência	65
5.5	Autenticação molecular	65

5.5.1	Amplificação e sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal (rDNA).....	65
5.5.2	Amplificação e sequenciamento da região D1/D2 da maior subunidade do gene 28S do DNA ribossomal (rDNA)	66
5.5.3	Comparação dos resultados obtidos por ITS e D1/D2 e do sistema de identificação de leveduras VITEK® 2 YST (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França).....	66
5.6	Avaliação das metodologias de determinação da suscetibilidade	71
5.6.1	Método de diluição - Microdiluição em caldo.....	71
5.6.2	Método de Difusão por Gradiente de Concentração de Antifúngico Pré-definido em fira - Etest®.....	79
5.6.3	Método automatizado - VITEK® 2.....	81
5.7	Avaliação de fenótipos associados à virulência	85
5.7.1	Fatores de Virulência.....	85
5.8	Descrição das características clínicas, microbiológicas e do desfecho....	88
5.9	Análise univariada das características epidemiológicas, clínicas e microbiológicas das variáveis potencialmente associadas ao óbito em 30 dias após o diagnóstico de fugemia por cândidas-não-albicans incomuns.....	93
6	DISCUSSÃO.....	96
7	CONCLUSÃO	104
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
	APÊNDICES.....	124
	ANEXOS.....	168

Chaves, A L S. **Caracterização molecular e suscetibilidade antifúngica de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales*: uma série de casos de infecções de corrente sanguínea em pacientes com câncer**. Rio de Janeiro, 2021. 170 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

RESUMO

A fungemia é uma doença infecciosa grave, e pode se associar a choque séptico, falência múltipla de órgãos e elevada mortalidade. A doença é definida quando ocorre o isolamento de fungo, como *Candida* spp. e outras leveduras a partir de hemoculturas de pacientes. Nos últimos anos, espécies incomuns da ordem *Saccharomycetales* têm sido isoladas em pacientes com câncer. Pouco se sabe sobre estas leveduras emergentes, em especial no estado do Rio de Janeiro. O objetivo deste estudo é avaliar a suscetibilidade aos antifúngicos de espécies emergentes da ordem *Saccharomycetales* causadoras de fungemia em pacientes com câncer. Para isso foram incluídas cepas de leveduras incomuns pertencentes a ordem *Saccharomycetales* isoladas de hemoculturas de pacientes atendidos no Instituto Nacional do Câncer no período de 2002-2017 e excluídas aquelas identificadas fenotipicamente como *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* ou *Candida parapsilosis*. As espécies emergentes foram identificadas através da técnica de “barcoding” de DNA com a amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA ou da região D1/D2, quando necessário. A nomenclatura das leveduras identificadas foi atualizada conforme o banco de dados do NCBI. A suscetibilidade aos fármacos antifúngicos foi realizada de acordo com o protocolo padrão de microdiluição em caldo preconizado pelo BrCAST, e comparada com a técnica de difusão de gradiente em fitas (Etest®) e com método automatizado (VITEK® 2). Esses resultados foram correlacionados com dados clínicos dos pacientes e com aspectos fenotípicos das cepas que pudessem estar associados com virulência ou resistência aos antifúngicos, tais como produção de enzimas hidrolíticas. Espécies do complexo *Meyerozyma guilliermondii* e *Wickerhamomyces anomalus* foram as leveduras mais frequentes. Fluconazol apresentou pouca atividade antifúngica contra as cepas testadas, com concentrações inibitórias mínimas elevadas para o complexo *M. guilliermondii*, *W. anomalus* e *Candida haemulonii* var. *vulnera*. A anfotericina B foi capaz de inibir 100% do crescimento de 96,42% das cepas, em concentrações de 0,032 - 1 µg/mL, demonstrando ser o fármaco com melhor ação terapêutica *in vitro*. Foi verificada associação entre as CIMs de leveduras, de caspofungina e micafungina com a produção de hemolisina. Pacientes que necessitaram de cuidados intensivos tiveram 27 vezes mais chance de óbito em comparação com aqueles que não necessitaram de UTI. Os resultados contribuem para o conhecimento sobre leveduras emergentes em pacientes com câncer, bem como para o entendimento de possíveis resistências dessas leveduras aos fármacos antifúngicos e suas consequências para os pacientes infectados.

Palavras-chave: *Saccharomycetales*; Leveduras incomuns; Suscetibilidade; Fungemia

Chaves, A L S. **Molecular characterization and antifungal susceptibility of uncommon yeasts of the order *Saccharomycetales*: a case series of bloodstream infections in cancer patients.** Rio de Janeiro, 2021. 170 s. Thesis [PhD in Clinic Research in Infectious Diseases] – Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases.

ABSTRACT

Fungemia is a serious infectious disease associated with septic shock, multiple organ failure and high mortality. The disease is defined when a fungus such as *Candida* spp. are isolated from blood cultures of patients. In recent years, unusual species of the order *Saccharomycetales* have been isolated from cancer patients. Little is known about these emerging yeasts, especially in the state of Rio de Janeiro. The aim of this study is to evaluate the susceptibility to antifungal agents of emerging species of the order *Saccharomycetales* that cause fungemia in cancer patients. For this purpose, unusual yeast strains belonging to the order *Saccharomycetales* isolated from blood cultures of patients treated at the Instituto Nacional do Câncer between 2002-2017 were included and those identified phenotypically as *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* or *Candida parapsilosis* were excluded. Emerging species were identified through DNA barcoding with amplification of the ITS1-5.8S-ITS2 DNA region, or D1/D2 region, when necessary. The nomenclature of the identified yeasts was updated according to the NCBI database. Susceptibility to antifungal drugs was performed according to the standard broth microdilution protocol recommended by BrCAST, and compared with the gradient diffusion technique on strips (Etest[®]) and automated method (VITEK[®] 2). These results were correlated with clinical data from patients and with phenotypic aspects of the strains that may be associated with virulence or resistance to antifungal agents, such as production of hydrolytic enzymes. Species of the *Meyerozyma guilliermondii* and *Wickerhamomyces anomalus* complex were the most frequent yeasts. Fluconazol showed little antifungal activity against the tested isolates, with high minimum inhibitory concentrations for the *M. guilliermondii* complex, *W.anomalus* and *Candida haemulonii* var. *vulnera*. Amphotericin B was able to inhibit 100% of the growth of 96.42% of the isolates, at concentrations of 0.032 - 1µg/mL, demonstrating to be the drug with the best therapeutic action in vitro. An association was found between caspofungin and micafungin MICs with hemolysin production. Patients who required intensive care were 27 times more likely to die compared to those who did not need. The results contribute to the knowledge about emerging yeasts in cancer patients, as well as to the understanding of possible resistances of these yeasts to antifungal drugs and their consequences for patients infected by these fungi.

Keywords: *Saccharomycetales*; Uncommon yeasts; Susceptibility; Fungemia

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fatores associados ao desfecho da fungemia por <i>Candida</i> spp.	34
Figura 2	Descrição dos tipos de infecções de corrente sanguínea com comprovação laboratorial (ICS-CL).	48
Figura 3	Pacientes e cepas de leveduras incomuns da ordem <i>Saccharomycetales</i> incluídos no estudo de infecção de corrente sanguínea no INCA-RJ no período de 01/01/2002 a 31/12/2017.	60
Figura 4	Análise filogenética molecular pelo método <i>Likelihood</i> baseada a partir da sequência da região ITS para 26 nucleotídeos de cepas de leveduras incomuns da ordem <i>Saccharomycetales</i> analisadas neste estudo.	71
Gráfico 1	Produção de Catalase de 27 cepas de leveduras incomuns da ordem <i>Saccharomycetales</i> isoladas em sangue periférico dos 19 pacientes, no período de 01/01/2002 a 31/12/2017 no INCA-RJ.	88

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Critérios para avaliação da produção de enzimas hidrolíticas de acordo com o valor de Pz ($Pz = a/b$).	57
Tabela 1	Características demográficas e clínicas de 19 pacientes com infecção de corrente sanguínea por cepas de leveduras incomuns da ordem <i>Saccharomycetales</i> detectadas no Instituto Nacional do Câncer - Hospital do Câncer I, de 01/01/2002 a 31/12/2017.	62
Tabela 2	Frequência das espécies de leveduras incomuns da ordem <i>Saccharomycetales</i> isoladas nos 19 pacientes com fungemia no Hospital do Câncer I do Instituto Nacional do Câncer de 01/01/2002 até 31/12/2017.	63
Quadro 2	Descrição dos 19 casos de infecção de corrente sanguínea por leveduras incomuns da ordem <i>Saccharomycetales</i> detectadas no INCA-RJ no período do estudo.	64
Quadro 3	Comparação dos resultados da autenticação molecular por ITS e D1/D2 e do sistema de identificação de leveduras VITEK® 2 YST (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França), de 27 cepas de leveduras incomuns da ordem <i>Saccharomycetales</i> , obtidos em sangue periférico, de 19 pacientes no período de 01/01/2002 a 31/12/2017 no INCA-RJ.	68
Tabela 3	Distribuição de haplótipos após análise de quatro sequências de ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA de cepas de <i>Meyerozyma caribbica</i> obtidas do caso clínico 9.	72
Tabela 4	Concentração Inibitória Mínima das 27 cepas de leveduras incomuns da ordem <i>Saccharomycetales</i> aos fármacos antifúngicos com a técnica de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo BrCAST, isoladas em sangue periférico dos 19 pacientes, no período de 01/01/2002 a 31/12/2017 no INCA-RJ.	73
Tabela 5	Comparação da distribuição da CIM modal de dez cepas do Complexo <i>M. guilliermondii</i> , isoladas em sangue periférico em pacientes do presente estudo, no período de 01/01/2002 a 31/12/2017 no INCA-RJ, com a distribuição da CIM modal das cepas descritas de acordo com o ponto de corte epidemiológico no protocolo EUCAST.	75
Tabela 6	Comparação da distribuição da CIM modal de duas cepas de <i>Candida dubliniensis</i> , isoladas em sangue periférico em pacientes do presente	76

estudo, no período de 01/01/2002 a 31/12/2017 no INCA-RJ, com a distribuição da CIM modal das cepas descritas de acordo com o ponto de corte epidemiológico no protocolo EUCAST.

Tabela 7	Comparação da distribuição da CIM modal de duas cepas de <i>Kluyveromyces marxianus</i> , isoladas em sangue periférico em pacientes do presente estudo, no período de 01/01/2002 a 31/12/2017 no INCA-RJ, com a distribuição da CIM modal das cepas descritas de acordo com o ponto de corte epidemiológico no protocolo EUCAST.	77
Tabela 8	Valores de CIM e classificação das cepas de leveduras incomuns da ordem <i>Saccharomycetales</i> no INCA de acordo com os valores de ponto de corte epidemiológico propostos pelo EUCAST.	79
Tabela 9	Concentração inibitória mínima das 27 cepas de leveduras incomuns da ordem <i>Saccharomycetales</i> aos fármacos antifúngicos de acordo com a técnica de difusão em fita com gradiente antimicrobiano (Etest®), isoladas em sangue periférico dos 19 pacientes, no período de 01/01/2002 a 31/12/2017 no INCA-RJ.	81
Tabela 10	Concentração Inibitória Mínima das 27 cepas de leveduras incomuns da ordem <i>Saccharomycetales</i> aos fármacos antifúngicos de acordo com a teste de suscetibilidade automatizado realizado no VITEK® 2 AST, isoladas em sangue periférico dos 19 pacientes, no período de 01/01/2002 a 31/12/2017 no INCA-RJ.	83
Tabela 11	Porcentagem de concordância categórica pelos métodos Etest® e VITEK® 2 AST em comparação com o protocolo de microdiluição BrCAST de 14 cepas de leveduras incomuns da ordem <i>Saccharomycetales</i> isoladas em sangue periférico de 10 pacientes, no período de 01/01/2002 a 31/12/2017 no INCA-RJ.	84
Tabela 12	Porcentagem de concordância essencial pelos métodos Etest® e VITEK® 2 AST em comparação com o protocolo de microdiluição BrCAST das 27 cepas de leveduras incomuns da ordem <i>Saccharomycetales</i> isoladas em sangue periférico de 19 Spacientes, no período de 01/01/2002 a 31/12/2017 no INCA-RJ.	85
Tabela 13	Produção enzimática das 27 cepas de leveduras incomuns da ordem <i>Saccharomycetales</i> isoladas em sangue periférico dos 19 pacientes, no período de 01/01/2002 a 31/12/2017 no INCA-RJ.	87

Tabela 14	Associação entre os fenótipos fúngicos relacionados a virulência das cepas de leveduras incomuns da ordem <i>Saccharomycetales</i> e as CIMs dos fármacos antifúngicos testados no protocolo EUCAST.	89
Quadro 4	Correlação entre os dados clínicos e a categorização do fenótipo de virulência, uso prévio de antifúngicos, tratamento e a suscetibilidade antifúngica, no desfecho dos 19 casos de infecção da corrente sanguínea por cepas de leveduras incomuns da ordem <i>Saccharomycetales</i> no INCA no período de 01/01/2002 a 31/12/2017	91
Tabela 15	Análise univariada entre as características microbiológicas das cepas de leveduras incomuns da ordem <i>Saccharomycetales</i> e os dados clínicos dos pacientes com fungemia no INCA-RJ.	95

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
APACHE	<i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation</i>
SDA	Agar sabouraud dextrose
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BrCAST	<i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
bp	Pares de base
CC	Concordância categórica
CE	Concordância essencial
CFP	Coleção de fungos patogênicos
CI	Cuidados intensivos
CIM	Concentração inibitória mínima
CIM50	Concentração inibitória mínima de antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% dos isolados fúngicos
CIM90	Concentração inibitória mínima de antifúngico capaz de inibir o crescimento de 90% dos isolados fúngicos
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNA	<i>Candida não-albicans</i>
CNAI	<i>Candida não-albicans</i> incomuns
CVC	Cateter venoso central
CVC-CP	Cateter venoso central de curta permanência
CVC-LP	Cateter de longa permanência
D1/D2	<i>domain of large-subunit ribosomal DNA</i>
DECH	Doença enxerto contra o hospedeiro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA-r	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EF	<i>Elongator Factor 1 α</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>

EP	Efeito paradoxal
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
ICS	Infecção de corrente sanguínea
ICS-CL	Infecção de corrente sanguínea com comprovação laboratorial
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
IPCS	Infecção primária de corrente sanguínea
IPCS-AV	Infecção primária de corrente sanguínea associada ao acesso vascular
IPCS-AVC	Infecção primária de corrente sanguínea associada ao acesso vascular central
IPCS-AVP	Infecção primária de corrente sanguínea associada ao acesso vascular periférico
IPCS-DBM	Infecção primária de corrente sanguínea associada ao dano de barreira mucosa
ISCS	Infecção secundária de corrente sanguínea
ITS	<i>Internally transcribed spacer</i>
LB	Linfoma de Burkitt
LH	Linfoma Hodgkin
LLA	Leucemia linfóide aguda
LMA	Leucemia mieloide aguda
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MG	Média geométrica
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Non-WT	<i>Non-Wild Type</i> (Tipo não selvagem)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDA	<i>Potato dextrose agar</i>
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
RNA-r	Ácido ribonucleico ribossômico
RPM	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>

TAq	<i>Thermus aquaticus</i>
TES	N-tris [hidroximetil]metil-2-aminoetano sulfonato
Tris base	Hidroximetilaminometano
Tris HCl	Hidroximetilaminometano cloridrato
TSA	Teste de susceptibilidade aos antifúngicos
UFC	Unidade formadora de colônia
UTI	Unidade de terapia intensiva
WT	<i>Wild Type</i> (Tipo selvagem)

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infecções por *Candida*

Candida spp. são leveduras da ordem *Saccharomycetales* ubíquas, amplamente distribuídas, podendo ser encontradas no solo, água, plantas e animais (LACAZ *et al.*, 2002; LIM *et al.*, 2012). Algumas espécies estão presentes no corpo humano como microbiota residente comensal na pele e nas mucosas cavitárias, oral, gastrointestinal e vaginal (KIM; SUDBERY, 2011). Podem se comportar como patógenos oportunistas quando as defesas do hospedeiro estão prejudicadas, ou ainda, quando ocorre ruptura nas barreiras cutâneas e gastrointestinais, promovendo doenças invasivas (KIM; SUDBERY, 2011; LIM *et al.*, 2012). São conhecidas como patógenos emergentes causadores de infecções em centros hospitalares de todo o mundo (PAPPAS *et al.*, 2018).

As infecções por *Candida* têm sido descritas como infecções emergentes, que podem acontecer em qualquer parte do corpo. Quando ocorrem nas membranas mucosas, são chamadas de Candidíase ou Candidose (LEWIS; WILLIAMS, 2017; SOBEL, 2007). Contudo, *Candida* spp. podem migrar para a corrente sanguínea, sendo essa condição denominada fungemia (ARENDRUP *et al.*, 2005). Esta é uma doença infecciosa potencialmente fatal, associada a choque séptico, falência múltipla de órgãos e elevada mortalidade (PAPPAS *et al.*, 2015). A fungemia é definida quando ocorre o isolamento de leveduras como *Candida* spp. a partir de hemoculturas de pacientes com febre (VISCOLI *et al.*, 1999). Esta infecção de corrente sanguínea pode disseminar para outras partes do corpo, como coração, fígado, pulmões, sendo então chamada de fungemia invasiva (KIM; SUDBERY, 2011; LIM *et al.*, 2012). É uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes com câncer. A incidência da doença está aumentando devido à crescente sobrevivência de pacientes imunocomprometidos e aos procedimentos invasivos aos quais são submetidos (ANTINORI *et al.*, 2016; ARENDRUP *et al.*, 2005; ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2009).

Pessoas imunocompetentes, normalmente, não são acometidas pela doença, porém podem desenvolver infecções localizadas, como na mucosa oral e no sistema geniturinário, e mais raramente em pele e unhas (LEWIS; WILLIAMS, 2017; SOBEL, 2007). Os fatores de risco para desenvolver fungemia incluem internação prolongada em UTI por muitos dias, diabetes, imunocomprometimento seja por tratamento quimioterápico, uso de corticoides, ou ainda transplante de medula ou órgão sólido. Outros fatores incluem uso de cateter venoso, cirurgia abdominal, queimadura grave,

hemodiálise, e uso prévio de antibióticos e antifúngicos. Os sinais e sintomas da doença dependem da localização do agente etiológico, e podem incluir febre, hipotensão, erupções cutâneas, cefaleia e dor abdominal (PAPPAS *et al.*, 2015, 2018).

Atualmente as fungemias por leveduras como *Candida* spp. representam cerca de 10% das infecções hospitalares de corrente sanguínea com mortalidade associada (LORTHOLARY *et al.*, 2017). Os fatores de risco para mortalidade são: idade, neoplasias hematológicas, transplante de medula óssea e ausência de terapia antifúngica profilática (VISCOLI *et al.*, 1999). A profilaxia com antifúngicos durante ou após a quimioterapia vem causando resistência em alguns isolados de *Candida* spp., principalmente de espécies não-*albicans*. Recentemente, as equinocandinas têm sido efetivas no tratamento da fungemia por *Candida* spp. em pacientes neutropênicos (GHARAGHANI *et al.*, 2016).

Candida spp. podem ser detectadas nas superfícies mucosas de ~50–70% dos humanos saudáveis. Quando ocorre quebra nas barreiras intestinais, por exemplo, após cirurgia gastrointestinal, *Candida* spp. podem se disseminar diretamente para a cavidade abdominal e invadir a corrente sanguínea, levando a fungemia. Em condições normais, o fungo se comporta como um organismo comensal sem causar doenças. A diminuição da resposta imune, entre outros fatores, pode promover o crescimento excessivo de fungos no intestino e levar a fungemia invasiva, o que pode causar infecções oportunistas profundas em vários órgãos (PAPPAS *et al.*, 2018).

A fungemia é diagnosticada através da coleta de sangue do paciente em frasco de hemocultura aeróbio e posterior isolamento e identificação correta da levedura em meio de cultivo apropriado. O atraso e os erros na identificação das espécies dos isolados por métodos convencionais e a resistência a antifúngicos apresentada por algumas espécies são responsáveis pelo aumento da morbidade e mortalidade por fungemia. Assim, a identificação rápida e correta das espécies isoladas, assim como a determinação do teste de suscetibilidade aos antifúngicos, é determinante para estabelecer o tratamento correto e o sucesso terapêutico de pacientes com fungemia (FATIMA *et al.*, 2017, LEAW *et al.*, 2006).

1.2 Espécies de *Candida*

São cinco as espécies de *Candida* mais incidentes, comumente responsáveis por mais de 90% dos casos de infecções fúngicas invasivas: *Candida albicans*, a mais frequente, seguida das espécies não-*albicans* *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*. As frequências relativas das espécies não-*albicans*

variam dependendo da população envolvida, da região geográfica, do uso prévio de antifúngicos e da idade do paciente. Destas, *C. glabrata* e *C. krusei* costumam ser as mais preocupantes por apresentarem resistência aos antifúngicos derivados azólicos (MARCHETTI *et al.*, 2004, ANTINORI *et al.*, 2016). De fato, estudos epidemiológicos anteriores relataram que estas espécies apresentam elevada incidência em pacientes com câncer que receberam profilaxia com derivados azólicos (MARCHETTI *et al.*, 2004, VISCOLI *et al.*, 1999). Além disso, muitas outras espécies de leveduras incomuns estão emergindo como patógenos humanos, e sua identificação pode representar um desafio (LEAW *et al.*, 2006).

Muitas espécies de ***Candida não-albicans incomuns (CNAI)*** têm emergido como agentes de infecção de corrente sanguínea em pacientes com câncer (LEAW *et al.*, 2006, BRETAGNE *et al.*, 2017). De acordo com um estudo que avaliou 79 cepas de 68 pacientes no período de quinze anos nos Estados Unidos da América (EUA), as espécies emergentes causadoras de fungemia incluem *Candida guilliermondii* (43%), *Candida kefyr* (22%), *Candida lusitanae* (19%) e *Candida famata* (16%). A neutropenia (< 500 células/mm³) estava presente na maioria dos pacientes (JUNG *et al.*, 2015). Na última década, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA – CDC, fez um alerta mundial sobre *Candida auris*, uma levedura emergente e multirresistente, de grande persistência ambiental, sobretudo no ambiente hospitalar, e causadora de infecções invasivas graves e fatais. Esta espécie demonstra resistência ao fluconazol e ainda resistência variável a outros antifúngicos (CDC, 2016). Recentemente, surto por esta espécie ocorreu no Brasil (DE ALMEIDA *et al.*, 2021; ANVISA, 2020).

Nos casos de fungemia por espécies menos frequentes de *Candida*, as recomendações clínicas baseiam-se em estudos retrospectivos, meta-análises e opiniões de especialistas (ANTINORI *et al.*, 2016). A investigação epidemiológica, a suscetibilidade aos antifúngicos utilizados no tratamento destas infecções e os fatores associados à morbidade destes pacientes são fundamentais (JUNG *et al.*, 2015). A seguir, são apresentadas as principais espécies de CNAI encontradas no Brasil. Para fins didáticos, as espécies serão nomeadas como o foram nas suas publicações originais citadas ao longo do texto, até porque na maioria das vezes, sobretudo em estudos mais antigos, distinção molecular não foi realizada. Sempre que possível, o nome científico mais atual das espécies, de acordo com a taxonomia vigente, também será apresentado.

1.2.1 Complexo *Meyerozyma guilliermondii*

O complexo de espécies *M. guilliermondii*, também chamado de Complexo *Candida guilliermondii*, é um conjunto de espécies geneticamente heterogêneas, mas fenotipicamente indistinguíveis, pertencentes à ordem Saccharomycetaceae. Seus membros representam um grupo de leveduras amplamente estudadas na natureza, solo, água e vegetais (DE MARCO *et al.*, 2018; SAVINI *et al.*, 2011). O gênero *Meyerozyma* foi proposto por Kurtzman após autenticação molecular de isolados pela região D1/D2 do RNAr (KURTZMAN; SUZUKI, 2010). São quatro as espécies intimamente relacionadas pertencentes ao complexo de espécies *C. guilliermondii*: *Meyerozyma caribbica* (previamente conhecida como sua forma anamorfa *Candida fermentati*), *Meyerozyma guilliermondii* (previamente conhecida como sua forma anamorfa *C. guilliermondii*), *Meyerozyma carpophila* e *Candida xestobii* (SAVINI *et al.*, 2011; VAUGHAN-MARTINI *et al.*, 2005). Classificações taxonômicas mais atuais apresentam, entretanto, *C. xestobii* como sinônimo heterotípico de *M. carpophila* (TUMBARELLO *et al.*, 2007; SCHOCH *et al.*, 2020).

Espécies pertencentes ao complexo de espécies *M. guilliermondii* foram relatadas como agentes emergentes de infecção fúngica invasiva rara em pacientes com câncer (MARCOS-ZAMBRANO *et al.*, 2017; SAVINI *et al.*, 2011). Essas espécies podem ser isoladas de uma variedade de fontes, ambientais e humanas, em hospitais. Fazem parte da microbiota cutânea, podendo causar ainda infecções de pele e onicomicose (SAVINI *et al.*, 2011). Estão relacionadas à menor suscetibilidade a fármacos antifúngicos, particularmente fluconazol, e concentrações inibitórias mínimas (CIMs) relativamente elevadas para equinocandinas, com desfechos desfavoráveis (LOCKHART *et al.*, 2009).

A literatura sobre *M. caribbica* é escassa em comparação com *M. guilliermondii* e as inferências filogenéticas anteriores não incluíram todos os membros do complexo de espécies, deixando dúvidas sobre a correta caracterização (DE MARCO *et al.*, 2018; KURTZMAN; ROBNETT, 2013; KURTZMAN; SUZUKI, 2010). Estas descobertas recentes impõem a recomendação de que os laboratórios de micologia médica devem usar técnicas moleculares, como forma de autenticação de CNAs, no diagnóstico de doenças fúngicas para superar as limitações dos métodos convencionais (KIM *et al.*, 2014, 2016).

O sistema VITEK® 2, ferramenta bastante utilizada em laboratórios de microbiologia clínica para identificação de leveduras, ainda apresenta *M. guilliermondii* como *C. guilliermondii* em seu banco de resultados, sem distinguir as espécies do complexo, o que pode ser um problema para os médicos ou equipe de laboratório que desconhecem as últimas mudanças taxonômicas no gênero *Candida*.

1.2.2 Complexo *Debaryomyces hansenii*

Debaryomyces hansenii, conhecida também por *Candida famata*, faz parte de um complexo de espécies que inclui até o momento, as seguintes espécies: *C. famata* (*D. hansenii*), *D. fabryi*, *C. flareri* (*D. subglobosus*), *D. macquariensis*, *D. prosopidis*, *D. maramus*, *D. nepalensis*, *D. vietnamensis*, *D. courdetii*, *D. vindobonensis* e *D. tyrocola* (JACQUES; MALLET; CASAREGOLA, 2009; LOPANDIC *et al.*, 2013).

Debaryomyces hansenii é uma levedura que produz toxinas, incluindo micocinas, para destruir espécies de leveduras competitivas. É uma espécie comum usada na indústria alimentícia, incluindo todos tipos de queijo, alimentos embutidos e ainda na produção da fermentação de cervejas (BREUER; HARMS, 2006).

A identificação bioquímica pelo sistema VITEK[®] 2 não é capaz de discriminar quando espécies diferentes têm alta similaridade em reações bioquímicas. Nestes casos, a autenticação molecular por sequenciamento da região ITS (“internal transcribed spacer”) do DNA fúngico é recomendada (IRINYI *et al.*, 2015). Em estudos recentes identificou-se por métodos fenotípicos isolados de levedura como *C. famata*. No entanto, após análises moleculares, esses isolados foram reidentificados como *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. palmioleophila* (KIM *et al.*, 2014, 2016; MELETIADIS *et al.*, 2011).

Um estudo conduzido na Coreia, revelou que 28 cepas de *C. famata*, previamente identificados pelo sistema VITEK[®] 2, foram reidentificados molecularmente como *C. guilliermondii*. Assim, os autores confirmaram que *C. famata* é uma causa rara de fungemia (KIM *et al.*, 2014).

1.2.3 *Candida auris*

Em 2016 o CDC relatou uma espécie de levedura que preocupa todo o mundo, *Candida auris*. Esta espécie incomum emergiu globalmente como um patógeno multirresistente associado a cuidados com a saúde, por apresentar forte potencial de transmissão horizontal nosocomial (CDC, 2016). A levedura é fenotipicamente confundida com *Candida haemulonii*, *Candida famata*, *Candida sake*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhodotorula glutinis* por equipamentos automatizados de identificação microbiana, como o VITEK[®] 2 e o API[®] 20C AUX. Os primeiros casos de infecção de corrente sanguínea pelo fungo foram relatados na Coreia do Sul em 2011. Os isolados obtidos de três pacientes confirmados por análise molecular da região D1/D2 haviam sido erroneamente

identificados como *Candida haemulonii* e *Rhodotorula glutinis* pelos sistemas VITEK® 2 e API® 20C AUX (LEE *et al.*, 2011).

Relatórios recentes destacam os desafios contínuos na identificação correta deste patógeno emergente, devido à identificação incorreta de espécies de organismos nos laboratórios de micologia. As medidas de prevenção e controle previstas no comunicado de risco nº 01/2017 da GVIMS/GGTES/ANVISA tem por fim reforçar a vigilância laboratorial da *C. auris* em todos os serviços de saúde do país, como medidas de prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde e, em caso de suspeita ou confirmação, recomenda a notificação e o envio de qualquer cepa com características fenotípicas de *C. auris* a laboratórios de referência regionais para identificação definitiva da espécie por espectrometria de massa MALDI-TOF e / ou por análise de sequência ITS do rDNA (ANVISA, 2017).

Casos e surtos hospitalares de infecções invasivas por *C. auris* foram relatados em quatro continentes, inclusive no continente americano, principalmente entre pacientes hematológicos, expostos a antibióticos e a procedimentos médicos invasivos, com alta mortalidade. Isto tem levado infectologistas e microbiologistas a discutirem questões relevantes para laboratórios de microbiologia clínica, controle de infecção hospitalar e esforços de administração de antimicrobianos (CALVO *et al.*, 2016; SPIVAK; HANSON, 2018).

A predileção pela transmissão dentro de instituições de saúde é possivelmente promovida por fatores de virulência que facilitam a colonização da pele e a persistência ambiental entre as espécies de *Candida*, levando a outros desafios, que são as altas taxas de resistência a medicamentos antifúngicos e mortalidade significativa de pacientes hospitalizados. (DE CÁSSIA ORLANDI SARDI *et al.*, 2018; SPIVAK; HANSON, 2018).

Em dezembro de 2020, *C. auris* surgiu no Brasil na cidade de Salvador. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, emitiu um alerta aos serviços de saúde sobre a identificação do possível primeiro caso de *C. auris* no Brasil (ANVISA, alerta de risco nº 01/2020). A levedura, chamada de superfungo, foi identificada em paciente adulto internado em UTI em hospital no estado da Bahia. Os primeiros pacientes colonizados por *C. auris* estavam na mesma unidade de terapia intensiva que atendia pacientes com Covid-19. A tipagem de microssatélites revelou cepas clonais pertencentes a clade do Sul da Ásia. As restrições de viagem durante a pandemia de Covid-19 e a ausência de histórico de viagens entre os pacientes colonizados levam à hipótese de que esta espécie foi introduzida antes do reconhecimento do primeiro caso, ou ainda que emergiu localmente no litoral de Salvador (DE ALMEIDA *et al.*, 2021).

A pandemia de Covid-19 pode fornecer condições ideais para surtos de *C. auris* em UTIs de hospitais. A rápida e crescente expansão e transformação das instituições de saúde em todo o mundo para acomodar o número cada vez maior de pacientes forneceu uma base potencial para a transmissão de infecções nosocomiais. Surtos por *C.auris* já foram relatados no México e na Índia em unidades Covid-19. É necessário cuidado extra com as superinfecções em pacientes críticos com Covid-19, relacionadas a altas taxas de mortalidade em 30 dias, geralmente acima de 50% (CHOWDHARY *et al.*, 2020; VILLANUEVA-LOZANO *et al.*, 2021). A possível disseminação de *C. auris* no Brasil em meio à pandemia de Covid-19 pode causar impacto negativo na evolução desses pacientes (DE ALMEIDA *et al.*, 2021).

1.2.4 Complexo *Candida haemulonii*

O complexo de espécies de *Candida haemulonii* (*C. haemulonii*, *C. duobushaemulonii* e *C. haemulonii* var. *vulnera*) emergiu como leveduras oportunistas, multirresistentes, capazes de causar fungemia nos últimos anos. Apresentam um perfil de resistência múltipla a antifúngicos, que inclui CIMs elevados para anfotericina B e resistência cruzada a compostos azólicos, o que prejudica o tratamento de infecções por essas espécies com equinocandinas. Este fato é importante para estabelecer o tratamento correto dos pacientes com infecções fúngicas por essas leveduras (CENDEJAS-BUENO *et al.*, 2012; RAMOS *et al.*, 2020).

Formam biofilme em diferentes tipos de superfícies inertes, o que é um atributo de virulência incontestável associado à fungemia por *Candida* spp. relacionada a dispositivos em indivíduos hospitalizados (RAMOS *et al.*, 2020). São capazes de causar infecções humanas com manifestações clínicas que variam de infecções superficiais a profundas, especialmente em indivíduos imunocomprometidos. Os principais locais de isolamento deste complexo de espécies descritos na literatura são sangue, unhas, ossos, feridas na pele. Há relatos de isolados obtidos de outros fluidos corporais, como líquido cefalorraquidiano, lavado broncoalveolar, secreção vaginal, derrame pleural, fluidos peritoneal e ascítico, bile e urina (CENDEJAS-BUENO *et al.*, 2012).

Apesar da importância clínica destas leveduras emergentes multirresistentes, poucas informações estão disponíveis sobre as características clínicas e perfis de suscetibilidade antifúngica de isolados clínicos do complexo *C. haemulonii*. A experiência clínica com a infecção do complexo *C. haemulonii* é extremamente limitada, sendo a suscetibilidade aos antifúngicos um problema relevante no manejo da infecção invasiva

pelo complexo *C. haemulonii* devido ao seu perfil de resistência a múltiplas drogas (RAMOS *et al.*, 2015).

1.2.5 *Candida dubliniensis*

Candida dubliniensis é uma levedura fenotipicamente semelhante a *C. albicans* (TAHIR; PESESKI; JORDAN, 2020), porém difere em relação à epidemiologia, certas características de virulência e a capacidade de desenvolver resistência *in vitro* ao fluconazol (GUTIERREZ *et al.*, 2002). Acredita-se que seja menos virulenta devido à diminuição da expressão de fosfolipases, aspartil proteinases e genes de virulência (MORAN; COLEMAN; SULLIVAN, 2012).

Candida dubliniensis é uma causa rara de meningite crônica, especialmente em hospedeiros imunocompetentes (TAHIR; PESESKI; JORDAN, 2020). O isolamento de *C. dubliniensis* em espécimes clínicos é raro, porém esta levedura é cada vez mais reconhecida como um patógeno importante em hospedeiros imunocomprometidos. Khan e colaboradores destacaram o papel de *C. dubliniensis* em infecções da corrente sanguínea (KHAN *et al.*, 2012).

É um patógeno colonizador de orofaringe e do trato respiratório de hospedeiros imunocomprometidos e está cada vez mais sendo reconhecido como um patógeno oportunista no sangue, tecidos moles, trato urogenital, gastrointestinal e na córnea (GUTIERREZ *et al.*, 2002). A colonização por *Candida dubliniensis* provavelmente predispõe os indivíduos à fungemia por *Candida* spp. (KHAN *et al.*, 2012).

1.2.6 *Candida intermedia*

Candida intermedia raramente é relatada como um patógeno humano, porém emergiu nas últimas décadas como importante patógeno relatado na literatura como causador de fungemia relacionada ao cateter, e ainda em pacientes pediátricos e idosos (RUAN *et al.*, 2010; TAJ-ALDEEN *et al.*, 2014). A presença desta espécie nas cavidades orais de pacientes imunocomprometidos, já foi relatada em isolados de pacientes brasileiros infectados por HIV (MELO *et al.*, 2004).

Os relatos de infecções de corrente sanguínea por *C. intermedia* são escassos. Hasejima e colaboradores relataram um caso de fungemia por esta levedura em paciente diabético. A confirmação molecular foi necessária, pois o paciente não respondia ao perfil

clínico. A levedura foi erroneamente identificada inicialmente como *Cryptococcus humicola* pelo sistema convencional API® ID32C (HASEJIMA *et al.*, 2011).

Ruan e colaboradores relacionaram *C. intermedia* como um patógeno causador de fungemia relacionada a cateter em pacientes em uso prolongado de nutrição parenteral e/ou uso de cateteres intravenosos por um longo período (RUAN *et al.*, 2010).

1.2.7 *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica, anteriormente conhecida como *Candida lipolytica*, é uma levedura considerada de baixa virulência, encontrada de forma onipresente no meio ambiente. Pertence à microbiota humana normal, mas também é encontrada em substratos com alto teor de lipídeos sendo utilizada também em processos biotecnológicos na indústria alimentícia, incluindo queijos e embutidos, e na indústria farmacêutica (DESNOS-OLLIVIER *et al.*, 2020).

Ocasionalmente, pode ser encontrada como colonizador de pele, nas fezes, e trato respiratório superior de pessoas assintomáticas. Esta levedura raramente isolada no sangue periférico tem sido relatada como um patógeno oportunista e emergente, causador de casos incomuns de sepse e surtos nosocomiais, ao atingir a corrente sanguínea de pacientes imunocomprometidos ou gravemente enfermos durante a hospitalização (WALSH *et al.*, 1989).

O uso de antibióticos de amplo espectro, febre sem resposta à terapia antibacteriana de amplo espectro, dispositivos intravasculares e internação prolongada em UTI são os principais fatores associados ao risco de fungemia por *Candida* spp. por esta espécie (ZHAO *et al.*, 2015; TABELSI *et al.*, 2015; DESNOS-OLLIVIER *et al.*, 2020). A identificação rápida e precisa é especialmente importante para infecções por *Y. lipolytica*, pois a necessidade e a escolha do tratamento antifúngico sistêmico podem diferir entre as infecções causadas por esta levedura e outras *Candida* spp. Em estudo publicado na última década, o cartão VITEK® 2 YST identificou corretamente 100,0% dos isolados testados (ZHAO *et al.*, 2015).

1.2.8 *Kodamaea ohmeri*

Kodamaea ohmeri, anteriormente conhecida como *Candida guilliermondii* var. *membranifaciens*, é uma levedura que pertence a mesma família de outras espécies de *Candida*, e pode causar infecções potencialmente fatais em humanos (DIALLO *et al.*,

2019; IOANNOU; PAPAKITSOU, 2020). Sua distribuição é ubíqua no ambiente, podendo ser encontrada na areia, água do mar, piscina e em alimentos, como as frutas (CHAKRABARTI *et al.*, 2014).

Nas últimas décadas a levedura foi reconhecida como um raro e importante agente etiológico de fungemia em pacientes imunocomprometidos (AL-SWEIH *et al.*, 2011). Pode causar casos fatais em portadores de doenças onco hematológicas, tumores de órgãos sólidos, diabetes ou de insuficiência renal crônica, ocasionando fungemia, endocardite infecciosa e onicomicose (IOANNOU; PAPAKITSOU, 2020). Muitos casos foram relacionados ao cateter e a remoção do dispositivo foi a chave para a cura, assim como o uso de equinocandinas como primeira escolha na terapia empírica deste patógeno (SHANG *et al.*, 2010; KANNO *et al.*, 2017).

Um número crescente de infecções graves por *K. ohmeri* tem sido relatada na literatura, porém a correta identificação desse microrganismo permanece difícil por métodos laboratoriais convencionais (DIALLO *et al.*, 2019). A correta identificação de isolados de leveduras obtidos de espécimens clínicos deve ser imediata, porque muitas espécies raras estão emergindo e são capazes de causar infecções e surtos potencialmente fatais. A resistência aos antifúngicos está aumentando e as espécies emergentes são resistentes a múltiplas drogas (MDR). Consequentemente, o teste de suscetibilidade antifúngica deve ser obrigatório para o manejo eficaz do paciente (PAUL; KANNAN, 2019).

1.2.9 *Wickerhamomyces anomalus*

Wickerhamomyces anomalus, anteriormente conhecida como *Candida pelliculosa*, *Pichia anomala* ou *Hansenula anomala*, é uma levedura encontrada na natureza, nas plantas, no solo e matéria orgânica. Também é utilizada na indústria alimentar, como agente de biocontrole, devido as suas propriedades antimicrobianas (EPIS *et al.*, 2015). Com o crescente número de pacientes imunocomprometidos, esta levedura tem sido citada como patógeno emergente oportunista. Nas últimas décadas houve aumento do isolamento deste patógeno na corrente sanguínea de pacientes hospitalizados, internados em UTI, principalmente oncológicos, com ocorrência de surtos nas unidades pediátricas (TAJ-ALDEEN *et al.*, 2014).

É um patógeno muito raro que causa infecção da corrente sanguínea em neonatos, com poucos casos relatados na literatura. A incidência de fungemia por *Candida* spp. é alta em neonatos internados em unidade de terapia intensiva neonatal, com dificuldade

respiratória, e está associada a taxas significativas de morbimortalidade (YILMAZ-SEMERCI; DEMIREL; TAŞTEKIN, 2017; SHUBHAM *et al.*, 2021). A maior prevalência nesta população está relacionada à história de prematuridade e baixo peso ao nascer. O uso de cateter venoso, nutrição parenteral e imunossupressão também são alguns dos principais fatores associados (RODRIGUES DUTRA *et al.*, 2020).

Estudo brasileiro de surto pelo microrganismo destacou a importância de *Wickerhamomyces anomalus* como um patógeno fúngico emergente nosocomial em unidades de terapia intensiva pediátrica. A mortalidade foi de 41,2%. Os fatores de risco encontrados são semelhantes aqueles pacientes que têm fungemia por *Candida* spp., juntamente a malformações congênitas e doenças neoplásicas (PASQUALOTTO *et al.*, 2005).

1.2.10 *Kluyveromyces marxianus*

Kluyveromyces marxianus, anteriormente chamada de *Candida kefyr*, é uma levedura ascomiceta ocasionalmente isolada de produtos lácteos (FONSECA *et al.*, 2008). É relatado como um patógeno emergente, capaz de causar fungemia em pacientes imunocomprometidos, particularmente aqueles com doenças oncohematológicas e transplantados de medula óssea. Também já foi isolado das mãos de profissionais de saúde (AHMAD *et al.*, 2020; KHAN *et al.*, 2015).

Em recente estudo Hahmad e colaboradores encontraram 0,83% de prevalência de *C. kefyr* entre os isolados clínicos testados, e 0,32% de prevalência para fungemia por esta levedura, respectivamente. A levedura foi isolada em amostras de corrente sanguínea, lavagem broncoalveolar, abscesso abdominal, fluido peritonial e fluido gástrico (AHMAD *et al.*, 2020).

Esta levedura tem se destacado por ser considerada uma espécie de levedura potencialmente multirresistente. Muitos isolados exibem suscetibilidade reduzida à anfotericina B, e tem capacidade de adquirir resistência a equinocandinas rapidamente (DUFRESNE *et al.*, 2014; AHMAD *et al.*, 2020; KHAN *et al.*, 2015; FEKKAR *et al.*, 2013). A epidemiologia deste importante patógeno nosocomial é precária pela falta de estudos bem definidos (AHMAD *et al.*, 2020).

1.3 Epidemiologia das Infecções Fúngicas Invasivas por *Candida* spp.

As infecções fúngicas invasivas causadas por leveduras emergentes e resistentes aumentaram nas últimas décadas. Tornaram-se uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes adultos e pediátricos. A complexidade dos pacientes imunocomprometidos, hospitalizados por períodos prolongados, muitas vezes em unidades de terapia intensiva, e a quimioterapia imunossupressora para o câncer ou transplante de órgãos sólidos, são fatores predisponentes (FATIMA *et al.*, 2017; LEAW *et al.*, 2006; STROLLO *et al.*, 2017).

A epidemiologia da fungemia por *Candida* spp. pode variar de acordo com a região geográfica e a população estudada. Um estudo brasileiro de vigilância prospectiva realizado em 11 centros médicos distribuídos em 9 capitais, avaliou e ressaltou a necessidade de vigilância a fim de monitorar tendências nos centros hospitalares. Foram detectados 712 casos, para uma incidência geral de 2,49 casos por 1.000 internações e 0,37 casos por 1.000 pacientes-dia. A mortalidade bruta em 30 dias foi de 54%, o que demonstra a substancial morbimortalidade da fungemia por *Candida* spp. no Brasil (COLOMBO *et al.*, 2006; NUCCI *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, espécies de *Candida* menos frequentes, principalmente espécies de *Candida* não-*albicans*, como *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida lusitanae*, *Candida famata* e *Candida haemulonii*, entre outras, foram relatadas como agentes emergentes de infecção de corrente sanguínea em pacientes com câncer, demonstrando uma variação na frequência de isolamento deste patógeno (BRETAGNE *et al.*, 2017). A razão para o aumento e variação da incidência dessas espécies não está bem estabelecida, mas pode estar associada à melhor sensibilidade dos métodos diagnósticos e ferramentas de identificação das espécies (TAJ-ALDEEN *et al.*, 2014). *Candida albicans* é a espécie mais prevalente associada à fungemia por *Candida* spp.; no entanto, a distribuição de *Candida* não-*albicans* é variável (PAPPAS *et al.*, 2018).

É importante dizer que a distribuição das espécies de *Candida* está em constante variação, e ainda que o número de relatos de casos de infecção por *Candida auris* é crescente nos últimos anos. Sendo assim, estas informações podem ter mudado desde que os dados foram coletados em 2018.

As infecções de corrente sanguínea por CNAI têm sido atribuídas a hospitalizações prolongadas de pacientes suscetíveis e ao uso prévio de antifúngicos (BRETAGNE *et al.*, 2017; TAJ-ALDEEN *et al.*, 2014). O desfecho da infecção depende de três fatores: gravidade da doença de base do paciente; fatores associados ao fungo, como virulência e resistência; e ainda da escolha terapêutica, tempo de utilização e dose do antifúngico (ARENDRUP, 2013), conforme esquematizado na **Figura 1**.

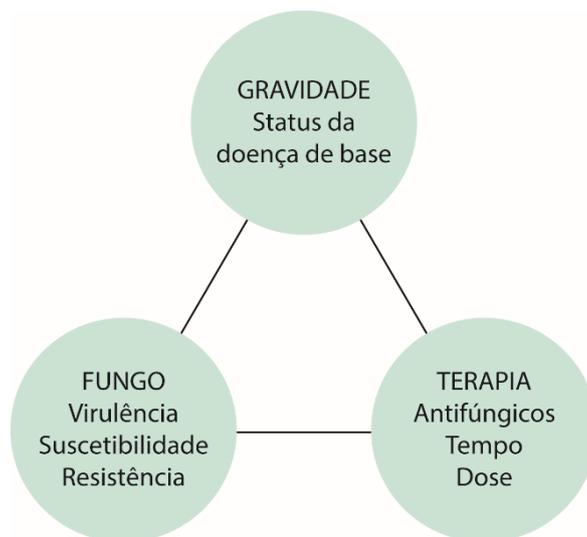


Figura 1. Fatores associados ao desfecho da fungemia por *Candida* spp.. Esquema representativo da tríade para o desfecho da fungemia por *Candida* spp.. Adaptado de Arendrup (2013).

O surgimento de espécies incomuns de *Candida* está associado a resistência aos fármacos antifúngicos. Estudos epidemiológicos demonstram que a taxa de resistência a múltiplas drogas é maior em espécies de *Candida* não-albicans, podendo chegar a 10% em algumas instituições. *Candida* demonstrou resistência *in vitro*, a pelo menos um agente antifúngico, em 27% dos isolados de pacientes hematológicos (GAMALETSSOU *et al.*, 2014; GAMALETSSOU; WALSH; SIPSAS, 2018).

1.4 Fatores de Virulência de *Candida* spp.

A patogenicidade de *Candida* spp. está relacionada às características que os fungos expressam durante o processo infeccioso, as quais são denominados “fatores de virulência”. Estes fenótipos podem estar associados à resistência e variar entre as espécies e cepas, além de dependerem das condições ambientais, como o sítio infeccioso e a resposta imune do hospedeiro (SARDI *et al.*, 2013).

Os fatores de virulência de *Candida* spp. incluem a mudança da fase leveduriforme para hifa, forma infectante com maior capacidade de invadir e afetar células do hospedeiro, e ainda capacidade de aderência às células do hospedeiro e a dispositivos médicos, com formação de biofilmes, secreção de enzimas hidrolíticas, mudança fenotípica e resposta imune do hospedeiro (PARK; DO; JUNG, 2013; SARDI *et al.*, 2013; SILVA; NERY; DIAS, 2014; TUMBARELLO *et al.*, 2007). Pouco se sabe sobre a expressão destes fatores de virulência nas CNAIs.

A adesão é uma importante característica de *Candida* spp., crucial para o início de um processo infeccioso. Dispositivos, como *stents*, *shunts*, próteses, tubos endotraqueais e cateteres vasculares favorecem a colonização e a formação de biofilme por *Candida* (KOJIC; DAROUICHE, 2004). Como resultado, o fungo aumenta sua resistência aos antifúngicos, por limitar a penetração dos agentes antifúngicos através da matriz extracelular e ainda, conferir uma proteção às células fúngicas da resposta imune do hospedeiro (RAMAGE et al., 2005), o que traz importantes repercussões clínicas. As infecções relacionadas a dispositivos médicos são difíceis de tratar e os dispositivos afetados geralmente precisam ser removidos, podendo colocar pacientes críticos em risco (MERMEL et al., 2001).

A terapia antifúngica inadequada e os biofilmes de *Candida* afetam adversamente a saúde de pacientes hospitalizados com alto risco para fungemia, relacionados à persistência do microrganismo no processo infeccioso e são, portanto, preditores de mortalidade em pacientes gravemente enfermos (TUMBARELLO et al., 2007).

Dentre os fatores de virulência destacam-se também a capacidade de *Candida* spp. em produzir e secretar enzimas hidrolíticas, como proteases, fosfolipases, fitases, esterases, hemolisinas e catalases. A secreção destas enzimas pode estar envolvida na capacidade de regulação da resistência antifúngica desses organismos. Relativamente pouco se sabe sobre esse tema com relação às CNAIs (NAGLIK et al., 2004; SARDI et al., 2013; SILVA et al., 2011).

O papel das enzimas lipolíticas extracelulares, as esterases e fosfolipases, é a digestão de lipídios, que são os principais componentes das membranas celulares. Juntamente com as proteases são usados como fonte de nutrientes para o fungo e adesão a células e tecidos, facilitando a invasão tecidual no hospedeiro durante o processo infeccioso (DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014). Em 2017, Figueiredo-Carvalho e colaboradores não encontraram atividade de fosfolipase em isolados de *C. glabrata* em seu estudo (FIGUEIREDO-CARVALHO et al., 2017). Sriphannam e colaboradores não encontraram atividade de fosfolipase e proteinase para *C. guilliermondii*, mas as cepas apresentaram atividade de esterase (SRIPHANNAM et al., 2019). A baixa expressão de enzimas lipolíticas de um isolado sugere uma espécie menos virulenta, quando comparada com uma espécie com alta expressão dessas enzimas (BORST; FLUIT, 2003; DAGDEVIREN; CERIKCIOGLU; KARAVUS, 2005). Um estudo que relacionou o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos à produção de enzimas hidrolíticas relacionadas à virulência em cepas de clínicas de *C. glabrata*, revelou que conforme a CIM da micafungina aumenta, a produção de esterase diminui, o que pode ser reflexo de um maior

conteúdo de quitina nas paredes celulares de cepas resistentes. Novos estudos estão em andamento para verificar essa hipótese (FIGUEIREDO-CARVALHO et al., 2017).

As hemolisinas são proteínas essenciais para a sobrevivência de microrganismos em parasitismo. Sua produção é um dos importantes mecanismos que contribuem para a patogenicidade de *Candida* spp. Está relacionada à captação de ferro, elemento essencial para a sobrevivência das leveduras, primordial durante o processo infeccioso (SARDI et al., 2013).

Por fim, a catalase é um fator de virulência que desempenha importante função antioxidante durante o processo infeccioso, sendo capaz de converter o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é letal para o fungo, em água (H_2O) e oxigênio (O_2), permitindo assim que o patógeno escape da resposta imune do hospedeiro (NAKAGAWA et al., 1999; ROMÁN et al., 2016). A tolerância ao estresse oxidativo está intimamente ligada à defesa do próprio fungo durante uma infecção. Foi demonstrado que as vias antioxidantes dos fungos são importantes para sua sobrevivência, na defesa dos ataques de neutrófilos (LEAL et al., 2012; ZAJC; GOSTINČAR; GUNDE-CIMERMAN, 2019).

1.5 Métodos de identificação

Os métodos de identificação das espécies de *Candida* baseiam-se em características fenotípicas e testes bioquímicos das leveduras. Estas são facilmente isoladas e cultivadas no meio de cultivo agar Sabouraud Dextrose e algumas espécies fenotipicamente identificadas no meio CHROMagar[®] *Candida* (CHROMagar Company, Paris, França) (37 °C / 48 h) e no sistema Vitek[®] 2, cartão VITEK[®] 2 YST (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) (JUNG et al., 2015).

Os fungos leveduriformes são morfologicamente e filogeneticamente diversos. A identificação clássica é baseada nas propriedades bioquímicas (JA-HYUN JANG et al., 2012). A classificação de fungos por estes critérios muitas vezes não é suficiente para identificação do patógeno, tornando-se um desafio na rotina laboratorial. Algumas espécies crípticas, com variantes fenotípicas, podem ser identificadas erroneamente e espécies raras podem permanecer sem identificação (TRABELSI et al., 2019, BALAJEE et al., 2009, JA-HYUN JANG et al., 2012). Os métodos moleculares, como sequenciamento por PCR, contribuem de modo a superar estas dificuldades. Este é considerado o padrão ouro para identificação de espécies de fungos no laboratório clínico (TRABELSI et al., 2019).

Técnicas moleculares demonstram maior acurácia na identificação de fungos quando comparados a métodos fenotípicos. A identificação de leveduras de importância clínica foi padronizada através da análise de sequências da região ITS do DNA cromossomal fúngico (IRINYI *et al.*, 2015). Métodos moleculares também possibilitaram o descobrimento de novas espécies, que por métodos fenotípicos não podem ser diferenciadas. Muitas espécies emergentes de *Candida* formam complexos, como é o caso de *Candida haemulonii*, que por métodos moleculares pode ser dividida nas espécies: *C. haemulonii*, *Candida duobushaemulonii* e *C. haemulonii* var. *vulnera* (RAMOS *et al.* 2015).

Existe um consenso a respeito da utilização da região ITS para sequenciamento como o passo inicial na identificação filogenética. Esta é uma região que apesar de ser conhecida como um “marcador molecular universal”, por ser uma região conservada e presente no genoma da maioria dos fungos e ainda poder ser amplificada de forma confiável, com grande número de sequências disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), o que permite uma comparação direta da sequência de um isolado desconhecido, existem algumas desvantagens no seu uso. Estas incluem a incapacidade de distinguir espécies estreitamente relacionadas e ainda problemas de confiabilidade das sequências depositadas nas bases de dados de referência (BALAJEE *et al.*, 2009). Em tais casos, dependendo do gênero fúngico a ser identificado, outras regiões podem ser utilizadas como alvo, como a região D1/D2 da subunidade 28S, o gene da β -tubulina, ou ainda o gene do fator de alongamento (JA-HYUN JANG *et al.*, 2012).

A identificação de patógenos por espectrometria de massa, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF), é um sistema confiável que está substituindo os métodos de identificação fenotípica convencionais nos laboratórios clínicos (ANNELOES *et al.*, 2014; TAVERNA *et al.*, 2017). Seu uso bem-sucedido deve-se a baixos custos operacionais, a universalidade na detecção de patógenos, bem como melhor especificidade nas identificações e rapidez nas análises, permitindo uma identificação altamente discriminatória de leveduras e fungos filamentosos a partir de colônias isoladas. A identificação de leveduras diretamente de concentrados de hemoculturas positivas é promissora, capaz de reduzir o tempo de identificação e melhorar a discriminação do patógeno, possibilitando o direcionamento terapêutico do paciente, otimizando o diagnóstico laboratorial de fungemia nos centros hospitalares. O sistema MALDI-TOF MS é comercializado por vários fabricantes: MALDI Biotyper (Bruker

Daltonics, Alemanha), VITEK® MS (bioMérieux, França), Axima (Shimadzu)-Saramis e Andromas (Andromas, França) (POSTERARO *et al.*, 2013).

A identificação de leveduras pela técnica de MALDI-TOF MS demonstra ser bem sucedida na discriminação de leveduras, incluindo a espécies intimamente relacionadas (KIM *et al.*, 2016; TAVERNA *et al.*, 2017). MALDI-TOF MS tem um bom potencial para a identificação de CNAIs, principalmente em laboratórios clínicos, por ser uma técnica rápida e de fácil execução. Estudo recente que avaliou o desempenho de MALDI-TOF MS na identificação de todos os membros do Complexo *M. guilliermondii* e do Complexo *C. famata*, demonstrou que esta técnica possui potencial para a diferenciação das espécies destes complexos, usando um banco de dados interno estendido e os valores de pontuação de corte recomendados pelo fabricante (TAVERNA *et al.*, 2019).

1.6 Suscetibilidade aos fármacos antifúngicos

Uma vez confirmado o diagnóstico da fungemia é importante estabelecer o perfil de suscetibilidade das espécies de leveduras identificadas laboratorialmente, a fim de detectar possíveis resistências a fármacos. Existem dois tipos de resistência importantes a serem consideradas: a resistência intrínseca, diagnosticada com a identificação correta da espécie patogênica, e a resistência adquirida do isolado específico, que requer teste de suscetibilidade com interpretação e aplicação de pontos de corte clínicos corretos (PAPPAS *et al.*, 2018). Como exemplo, *C. krusei* é intrinsecamente resistente ao fluconazol, enquanto que *C. glabrata* pode apresentar resistência adquirida.

O padrão ouro na determinação da suscetibilidade antifúngica para espécies de *Candida* é a diluição em caldo, que pode ser avaliada de acordo com o método de referência de microdiluição em caldo, M27-ed4, do Clinical Laboratory Standards Institute - CLSI (CLSI, 2017) e ainda de acordo com o método de diluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima para leveduras do European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST (EUCAST 7.3.1, 2017).

Diante da necessidade de padronizar a interpretação dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos e instituir pontos de corte adequados à realidade brasileira, foi instituído o Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – BrCAST (MELETIADIS *et al.*, 2017), um comitê nacional de testes de suscetibilidade aos antimicrobianos oficialmente reconhecido pelo EUCAST. Atualmente o BrCAST é o documento oficial, reconhecido em portaria pelo Ministério da Saúde - MS, que norteia a utilização das normas de interpretação para os testes de suscetibilidade aos

antimicrobianos nos laboratórios públicos e privados do país (PORTARIA Nº 64, DE 11 DE DEZEMBRO DE 2018).

As metodologias disponíveis são excelentes para identificar isolados resistentes, mas não são fáceis de usar no contexto do laboratório de microbiologia clínica de rotina. Ambos os métodos avaliam a capacidade de isolados de *Candida* spp. crescerem em diluições seriadas do agente antifúngico investigado. A concentração mais baixa que causa inibição do crescimento proeminente ou pelo menos 50% em comparação com um controle não inibido é o resultado da CIM (concentração inibitória mínima) (PAPPAS *et al.*, 2018). Os antifúngicos comumente testados para leveduras no Brasil são anfotericina B, fluconazol, itraconazol, posaconazol, voriconazol, caspofungina e micafungina.

Outros testes de suscetibilidade estão disponíveis no mercado, oferecendo praticidade aos usuários. O teste de difusão em agar que utiliza tiras com gradiente de concentração antifúngico Etest® e o sistema VITEK® 2, cartão VITEK® 2 AST leveduras (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) são os mais empregados no Brasil. Porém são inferiores em relação ao padrão ouro por serem considerados testes operador dependentes, que necessitam de validação local, interpretação e experiência do micologista, o que pode influenciar na leitura do resultado final (PAPPAS *et al.*, 2018).

1.7 Tratamento

A fungemia é uma doença que envolve risco de vida, portanto o tratamento costuma ser iniciado quando há suspeita da infecção. O diagnóstico precoce da doença é desafiador, mas fundamental para o manejo eficaz do tratamento, especialmente quando a levedura se encontra disseminada para outros órgãos (PAPPAS *et al.*, 2018). Inclui encontrar e, se possível, remover a fonte da infecção, que pode ser um cateter venoso implantado, e ainda iniciar a terapia antifúngica adequada (MARTIN-LOECHES *et al.*, 2019).

A escolha da terapia antifúngica mais adequada irá depender do quão doente se encontra o paciente, do sítio de infecção, dos fatores de risco associados do paciente, da espécie identificada laboratorialmente e ainda dos resultados do teste de suscetibilidade aos fármacos antifúngicos (CUENCA-ESTRELLA, 2010; MARTIN-LOECHES *et al.*, 2019). Pappas e colaboradores (PAPPAS *et al.*, 2018) propuseram um algoritmo para o manejo da fungemia por *Candida* spp., com informações baseadas nas diretrizes da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA) e da Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas (ESCMID). A terapia inicial de primeira escolha é com

equinocandinas, seguida de anfotericina B ou voriconazol como alternativa, dependendo da espécie de *Candida* não-*albicans* incomum identificada. A duração total da terapia para fungemia por *Candida* spp. é de 14 dias a partir da primeira hemocultura negativa.

Há uma variedade de classes de fármacos antifúngicos disponíveis para o tratamento das infecções por *Candida* spp. As classes comumente utilizadas incluem: os poliênicos, como a anfotericina B (desoxicolato, complexos lipídicos ou lipossomal); os imidazólicos, como o clotrimazol, cetoconazol e miconazol; os triazólicos, como o fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol; as equinocandinas, como a caspofungina, micafungina e anidulafungina (CUENCA-ESTRELLA, 2010; GAMALETSSOU; WALSH; SIPSAS, 2018).

O mecanismo de ação dos antifúngicos tem como alvo estruturas celulares presentes nas paredes das células fúngicas, que são vitais na manutenção do metabolismo do fungo. Desta forma, podemos citar algumas classes e seus respectivos alvos como os poliênicos (anfotericina B possui atividade fungicida) e azólicos (possuem atividade fungistática), que atuam nos constituintes de membrana celular, e as equinocandinas (também fungistáticas) que interferem na biossíntese de parede celular (STOCKMANN et al., 2014).

Medicamentos de primeira linha, incluindo equinocandinas e azólicos, são eficazes, mas o surgimento de resistência a estas drogas antifúngicas, principalmente entre CNAI, é preocupante e ressalta a necessidade de administração de antifúngicos de forma criteriosa, evitando o uso excessivo quando possível (PAPPAS et al., 2018).

Outro desafio em relação ao tratamento é a disponibilidade limitada de fármacos antifúngicos nos hospitais públicos. A relação nacional de medicamentos essenciais vigente, que norteia os hospitais públicos brasileiros na aquisição de medicamentos, prevê apenas os seguintes anti-infecciosos sistêmicos para o tratamento de micoses sistêmicas: anfotericina B (complexo lipídico, lipossomal e desoxicolato), fluconazol e itraconazol (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

2 JUSTIFICATIVA

A incidência de fungemia por leveduras em pacientes oncológicos é crescente ao longo dos anos (PAPPAS *et al.*, 2018). Representa até 10% das infecções nosocomias de corrente sanguínea (LORTHOLARY *et al.*, 2017; MARRA *et al.*, 2011), que podem evoluir com gravidade e estão associadas a elevada morbidade e mortalidade, principalmente nos pacientes imunocomprometidos com neoplasias hematológicas (FATIMA *et al.*, 2017; LEAW *et al.*, 2006; STROLLO *et al.*, 2017). Esta é uma preocupação em saúde pública em todo o mundo, pois impacta no aumento do tempo de internação e no custo com hospitalização (ZAOUTIS *et al.*, 2005).

As espécies de leveduras da ordem *Saccharomycetales*, que mais comumente causam infecção de corrente sanguínea (ICS) em pacientes com câncer são *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (MARCHETTI *et al.*, 2004). O perfil microbiológico das fungemias causadas por leveduras desta ordem é influenciado pela população envolvida, pelo uso prévio de antifúngicos, e a região geográfica de ocorrência das infecções (COLOMBO *et al.*, 2006; NUCCI *et al.*, 2013).

As espécies de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* emergiram como patógenos humanos em pacientes com câncer (BRETAGNE *et al.*, 2017; LEAW *et al.*, 2006). Porém, a identificação correta e rápida destas espécies é um desafio para os laboratórios de micologia, que aplicam métodos fenotípicos clássicos de identificação. Neste contexto, o conhecimento sobre as características microbiológicas dessas espécies, os fatores determinantes para ocorrência dessas infecções e para os seus desfechos são escassos. Conhecê-los é fundamental para a vigilância da ocorrência dessas infecções, para a prevenção, o diagnóstico e o tratamento adequados.

As seguintes perguntas motivaram o presente estudo: i) Quais as espécies de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* responsáveis pela fungemias nos pacientes com câncer?; ii) Quais os fatores de virulência presentes nestas cepas?; iii) Qual o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos, mais frequentemente utilizados na prática clínica, destas cepas responsáveis pela fungemias nos pacientes com câncer?; iv) Qual a origem topográfica das fungemias causadas por estas leveduras nos pacientes com câncer?; v) Quais os potenciais fatores microbiológicos e clínicos envolvidos na ocorrência e na evolução clínica dos pacientes com câncer e ICS por estas leveduras incomuns? Para responder estas questões, um estudo de série de casos foi conduzido em pacientes com ICS por leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* assistidos no Hospital do Câncer I do Instituto Nacional do Câncer (INCA), Rio de Janeiro.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Confirmar a identificação e a suscetibilidade aos antifúngicos das cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* causadoras de fungemia em pacientes com câncer e descrever as características epidemiológicas e clínica das fungemias por estas leveduras em pacientes com câncer.

3.2 Objetivos específicos

- Autenticar a identificação das cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* por metodologias moleculares de reação em cadeia da polimerase (PCR) e comparar com a identificação prévia pelo sistema automatizado VITEK® 2 YST.
- Realizar e comparar a suscetibilidade das cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* aos antifúngicos pelos métodos da microdiluição em caldo, sistema automatizado VITEK® 2 AST e difusão por gradiente de concentração em fita;
- Investigar os fatores de virulência presentes nas cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales*;
- Analisar a associação entre os fenótipos de virulência das cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* e a suscetibilidade aos fármacos antifúngicos;
- Descrever a origem topográfica das fungemias por leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* nos pacientes com câncer e as variáveis potencialmente associadas a aquisição e ao desfecho clínico destas infecções.
- Descrever a mortalidade em 30 dias das fungemias por leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* nos pacientes com câncer;
- Analisar a potencial associação entre as características microbiológicas e clínicas dos episódios de fungemia causados por leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* e o óbito em 30 dias, nos pacientes com câncer.

4 MÉTODO

4.1 Desenho e período do estudo

Trata-se de uma série de casos de pacientes com fungemia por leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales*, do período de 01/01/2002 – 31/12/2017, com a coleta de dados epidemiológicos, clínicos, e análise microbiológica realizados retrospectivamente, com coleta de dados feita entre agosto de 2017 e março de 2020.

4.2 Ambiente do estudo

O Hospital do Câncer I (HCI) é uma das unidades assistenciais do INCA, referência na prevenção, no diagnóstico e tratamento das doenças oncológicas em crianças e adultos. Realiza tratamentos para os tumores malignos e benignos sólidos (tumores do SNC) e neoplasias hematológicas.

Dos 211 leitos do HCI (203 disponíveis e 08 bloqueados), aproximadamente 162 são destinados à assistência de pacientes adultos (Unidade de terapia intensiva: 10 leitos; Unidade pós-operatória: 09 leitos; Recuperação pós-anestésica: 08 leitos; Serviços de hematologia e oncologia clínica: 31 leitos; Serviços de neurocirurgia e cirurgia torácica: 24 leitos; Serviço de cirurgia em cabeça e pescoço: 27 leitos; Serviço de urologia: 11 leitos; Serviço de abdome: 25 leitos; Serviço de plástica: 03 leitos, Emergência: 08 leitos e Serviço de iodoterapia: 06 leitos (Fonte: Capacidade hospitalar instalada. Divisão de enfermagem do HCI, 2018).

4.3 População do estudo

Pacientes adultos, maiores de 18 anos, com câncer e fungemia por leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales*, atendidos no INCA - HCI, no período do estudo.

4.4 Detecção dos casos de fungemia por leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales*

Com o objetivo de rastrear o total de hemoculturas positivas para leveduras no período do estudo, 01/01/2002 a 31/12/2017, foi realizada uma pesquisa no banco de dados do sistema de informática do Laboratório de Patologia Clínica do INCA - HCI. O

total encontrado foi de 1.174 hemoculturas positivas para leveduras da ordem *Saccharomycetales*, distribuídas entre *Candida albicans*, *Candida não-albicans* e *Candida não-albicans* incomuns (CNAI). Após esta etapa, as cepas de *Candida não-albicans* incomuns oriundas desses exames e armazenadas no Laboratório de Micologia do INCA - HCl que possuíam dados de identificação corretos, como registro de prontuário do paciente, data e registro da amostra no laboratório, foram selecionadas para o presente estudo.

4.5 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos todos os pacientes que no período do estudo apresentaram isolamento de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* em hemoculturas e cujas leveduras estavam armazenadas no Laboratório de Micologia do INCA – HCl.

Foram excluídos os casos de fungemia, inicialmente identificados como causados por CNAI, que foram reidentificados molecularmente como *C. albicans* e os identificados como *Candida não-albicans*: *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata* ou *C. tropicalis*; os casos de fungemias nos quais as cepas não amplificaram nas regiões alvo de identificação molecular do DNA; e os casos de fungemia nos quais as amostras de *Candida* permaneceram contaminadas ou inviáveis após tentativas de recuperação e isolamento.

4.6 Materiais, métodos e procedimentos

4.6.1 Coleta de dados epidemiológicos, clínicos e microbiológicos

A coleta de dados clínicos, epidemiológicos e microbiológicos foi realizada através da revisão dos prontuários no sistema eletrônico do INCA, inseridos em fichas de investigação específica e armazenadas no Software Magpi (**Apêndices A e B**). Dados microbiológicos adicionais foram obtidos a partir das análises laboratoriais realizadas no Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas - INI/ Fiocruz.

Os dados coletados foram: i) dados referentes ao pacientes - data de nascimento, gênero, doença de base, status do câncer (em tratamento, em controle ou sem proposta curativa); ii) dados referentes a ICS - data da ICS (foi considerada a data da coleta da hemocultura positiva), topografia da ICS (primária ou secundária), presença de acesso vascular profundo no momento da ICS, necessidade de admissão em unidade de terapia

intensiva (UTI) para tratamento da fungemia, necessidade de ventilação mecânica e uso de amina vasoativa durante o tratamento da fungemia, valor da proteína C reativa (PCR) na data da ICS ou até 48h antes ou depois, presença de neutropenia, na data da ICS ou 48h antes ou depois, uso de corticoides nos últimos 30 dias, quimioterapia nos últimos 30 dias, uso prévio de antifúngicos nos últimos 30 dias; iii) dados referentes ao tratamento e desfecho - antifúngico utilizado para o tratamento da fungemia, com data de início e fim, e desfecho clínico (óbito, alta ou permaneceu internado) após o 30º dia do diagnóstico à infecção; iv) dados microbiológicos adicionais - identificação molecular da cepa, concentração inibitória mínima aos diversos antifúngicos, presença de fatores de virulência (hemolisina, fitase, esterase, protease, fosfolipase e catalase).

4.6.1.1 Definições para coleta de dados dos pacientes

4.6.1.1.1 Infecção de corrente sanguínea (ICS)

A ICS é definida como a presença de sinais clínicos de infecção sistêmica associada ao isolamento do microrganismo no sistema circulatório do paciente, a partir de diferentes fontes, devido a invasão e multiplicação do agente etiológico na corrente sanguínea (BENNETT; DOLIN; BLASER, 2015).

4.6.1.1.2 Critérios para ICS com comprovação laboratorial (ICS-CL)

Uma ou mais hemoculturas positivas para leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales*, associados a presença de um dos seguintes sintomas: febre (>38 °C), calafrios, ou hipotensão (CDC, 2021).

4.6.1.1.3 Infecção primária de corrente sanguínea (IPCS)

A IPCS foi definida como ICS-CL não relacionada a infecção em topografia extravascular, ou seja, quando o patógeno não esteve relacionado a infecção em sítio anatômico diferente da corrente sanguínea (CDC, 2021).

4.6.1.1.4 Infecção primária de corrente sanguínea associada ao acesso vascular (IPCS-AV)

A ICS-AV é definida como infecção de corrente sanguínea associada ao sítio de inserção dos acessos vasculares com ICS-CL que apresentarem os seguintes critérios (ANVISA, 2009; CDC, 2021):

4.6.1.1.4.1 Infecção primária de corrente sanguínea associada ao acesso vascular central (IPCS-AVC)

- **Cateter venoso central de curta permanência (CVC-CP)**

Pacientes com ICS-CL que estejam em uso de CVC-CP por um período maior que dois dias de calendário (sendo o D1 o dia de instalação do dispositivo), com presença de sinais de flogose no local de inserção ou no trajeto do cateter ou que não apresentaram outro possível foco de origem para o evento infeccioso, apesar de extensa investigação. Foram considerados CVC-CP aqueles cateteres não tunelizados ou não implantados (ANVISA, 2009; CDC, 2021).

- **Cateter de longa permanência (CVC-LP)**

a) Paciente com crescimento de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* em hemocultura coletada pelo cateter pareada temporalmente à hemocultura coletada por veia periférica. Este crescimento deverá ocorrer primeiro na hemocultura coletada pelo cateter, no mínimo 2 horas antes, daquele detectado na hemocultura coletada por veia periférica;

b) Paciente com ICS-CL e com sinais de flogose no sítio do CVC-LP;

c) Paciente com ICS-CL detectada exclusivamente por hemocultura positiva coletada através do cateter (hemoculturas periféricas negativas ou não coletadas), se não houver outro foco de infecção evidente, apesar de extensa investigação;

d) Paciente com crescimento de *Candida* spp. em hemoculturas periféricas sem foco de infecção considerado primário no qual a possível origem da infecção foi o CVC-LP.

Para atenderem esses critérios os CVC-LP permaneceram por um período maior que dois dias de calendário (sendo o D1 o dia de instalação do dispositivo). Foram considerados CVC-LP os cateteres tunelizados e implantados (ANVISA, 2009; CDC, 2021).

4.6.1.1.4.2 Infecção primária de corrente sanguínea associada ao acesso vascular periférico (IPCS-AVP)

Pacientes com ICS-CL que estejam em uso de cateter vascular periférico que apresentem sinais de flogose no local de inserção ou no trajeto do cateter ou que não apresentem outro possível foco de origem para o evento infeccioso, apesar de extensa investigação (ANVISA, 2009; CDC, 2021).

4.6.1.1.5 Infecção primária de corrente sanguínea associada a dano de barreira mucosa (IPCS-DBM)

São as ICS-CL, entretanto apresentam no resultado da cultura somente microrganismos intestinais e nenhum outro microrganismo. Além disso, tem que atender pelo menos um dos seguintes critérios (CDC, 2021):

I. O paciente é receptor de transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênico no último ano com um dos seguintes documentados durante a mesma hospitalização como amostra de sangue positivo:

- a. Doença enxerto contra o hospedeiro (DECH) gastrointestinal, grau III ou IV;
- b. Diarreia \geq 1 litros em um período de 24 horas (ou \geq 20 ml/kg num período de 24 horas para doentes com idade $<$ 18 anos) com início nos 7 dias de calendário antes da data em que a amostra de sangue positiva foi colhida.

II. O paciente é neutropênico, definido como pelo menos dois dias separados com contagem absoluta de neutrófilos e/ou leucócitos $<$ 500 células/mm³ coletados num período de 7 dias que inclui a data de coleta da amostra de sangue positiva, os 3 dias de calendário antes e 3 dias após o calendário (janela da infecção).

4.6.1.1.6 Infecção primária de corrente sanguínea de origem indeterminada (IPCS-IN)

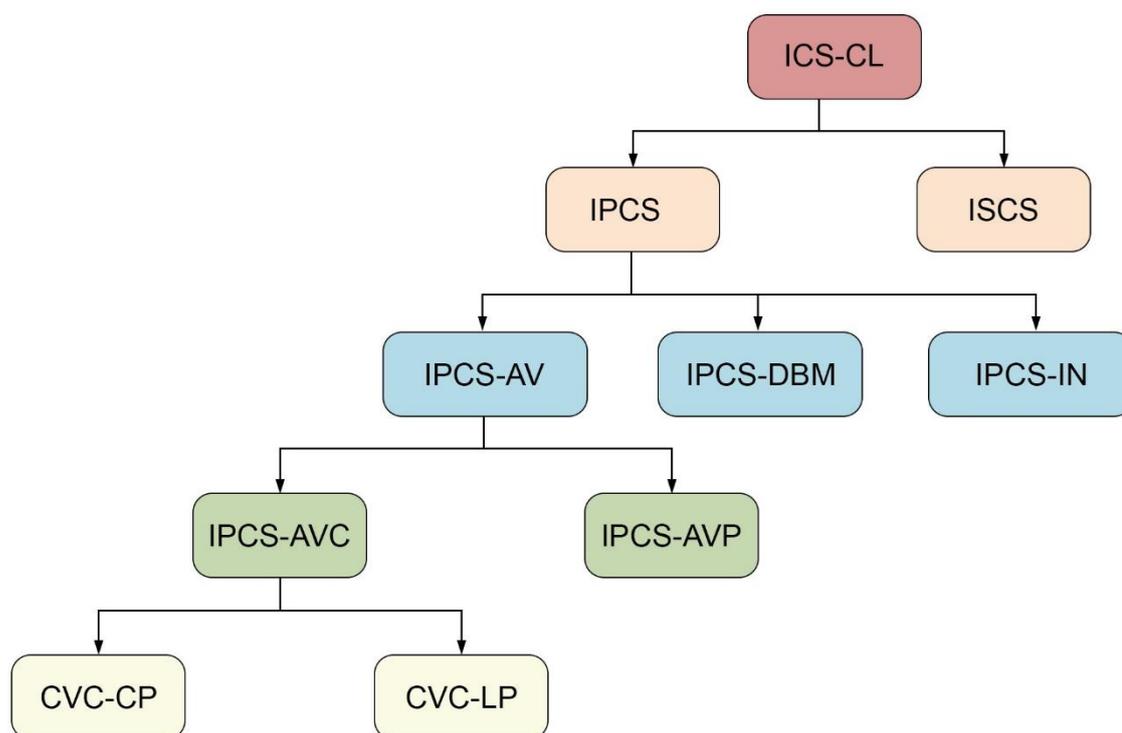
A IPCS-CL não relacionada a infecção em topografia extravascular, a IPCS-AVC ou a IPCS-DBM após investigação.

4.6.1.1.7 Infecção secundária de corrente sanguínea (ISCS)

Foram considerados episódios de ISCS quando houve o crescimento do mesmo microrganismo identificado na corrente sanguínea em um foco secundário de infecção, sendo o microrganismo igual quanto a espécie e perfil de resistência antimicrobiana, ou quando o foco extravascular não foi abordado para coleta de material, mas foi identificado radiologicamente ou clinicamente com crescimento em hemocultura de microrganismo possivelmente causador da infecção na topografia em questão (ANVISA, 2009; CDC, 2021).

Foram focos descritos no presente estudo: trato respiratório, infecções do trato gastrointestinal e infecção de partes moles. As ISCS foram estratificadas da seguinte forma: i) Infecções do trato respiratório: Foram consideradas as infecções do trato respiratório superior e inferior; ii) Infecções de pele: Foram consideradas as infecções de pele, como foliculite e celulite. A **Figura 2** apresenta a descrição dos tipos de infecção de corrente sanguínea com comprovação laboratorial (ICS-CL).

Figura 2. Descrição dos tipos de infecções de corrente sanguínea com comprovação laboratorial (ICS-CL).



Infecção primária de corrente sanguínea (IPCS); infecção secundária de corrente sanguínea (ISCS); infecção primária de corrente sanguínea associada ao acesso vascular (IPCS-AV); infecção primária de corrente sanguínea associada ao dano de barreira mucosa (IPCS-DBM); infecção de corrente sanguínea de origem indeterminada (IPCS-IN); infecção primária de corrente sanguínea associada ao acesso vascular central (IPCS-AVC); infecção primária de corrente sanguínea associada ao acesso vascular periférico (IPCS-AVP); cateter venoso central de curta permanência (CVC-CP); cateter venoso central de longa permanência (CVC-LP). Adaptado de (CDC, 2021).

4.6.1.1.8 Estadiamento da doença onco-hematológica

4.6.1.1.8.1 Doença onco-hematológica em tratamento com proposta curativa

Paciente em tratamento oncológico com proposta curativa para a doença de base, de acordo com o relato em prontuário médico (FERREIRA; MARTINS, 2021).

4.6.1.1.8.2 Doença onco-hematológica em controle

Paciente com tratamento oncológico terminado com sucesso terapêutico, em acompanhamento ambulatorial, de acordo com o relato em prontuário médico (FERREIRA; MARTINS, 2021).

4.6.1.1.8.3 Doença onco-hematológica sem proposta curativa

Paciente em tratamento paliativo, de acordo com relato em prontuário médico (FERREIRA; MARTINS, 2021).

4.6.1.1.9 Neutropenia

Foi considerado neutropênico o paciente com contagem absoluta de neutrófilos menor que 500 células/mm³ (FREIFELD *et al.*, 2011).

4.6.1.1.10 Neutropenia profunda

Foi considerado neutropenia profunda, quando a contagem absoluta de neutrófilos foi menor que 100 células/mm³ (FREIFELD *et al.*, 2011).

4.6.1.1.11 Neutropenia febril

É definida como a associação de febre com o quadro de neutropenia (FREIFELD *et al.*, 2011).

4.6.1.1.12 Febre

É definida como uma medida de temperatura oral única ≥ 38.3 °C (101 °F) ou uma temperatura de maior de ≥ 38 °C (100.4 °F) sustentada durante um período de 1 h. A definição de temperatura retal é evitada durante neutropenia para impedir translocação de bactérias. O uso de temperaturas axilares é desencorajado por *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) porque eles podem não refletir com precisão a temperatura corporal central. Contudo, a temperatura axilar é o método mais utilizado em nossa prática, entretanto apresenta variação de valores ao comparar a temperatura oral, com isso os valores obtidos podem ser 0,5 - 1°C menores. Assim, foi considerada febre quando o paciente apresentou uma temperatura axilar única $\geq 37,8$ °C (FREIFELD *et al.*, 2011; TING, 2007; ROLSTON, 2004; HUGUES *et al.*, 2002).

4.6.1.1.13 Necessidade de terapia intensiva

Necessidade de cuidados intensivos devido a ICS: utilização de aminas vasoativas, ventilação mecânica ou transferência para unidade de terapia intensiva 48h antes ou depois da ICS.

4.6.1.1.14 Terapia antifúngica adequada

A terapia antifúngica foi considerada adequada para os pacientes tratados com antifúngico com a concentração inibitória mínima (CIM) menor do que a mediana das CIMs calculada para o respectivo antifúngico em todas as cepas do estudo. Esta definição foi utilizada pois a maioria das espécies do estudo não apresenta ponto de corte epidemiológico (PCE) definido no EUCAST.

4.6.2 Cepas de referência

C. krusei ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 foram utilizadas como controle de qualidade nos testes de suscetibilidade aos antifúngicos e reidentificação molecular, e ainda como referência nos testes fenotípicos relacionados aos fatores de virulência.

4.6.3 Isolamento e armazenamento das cepas

Todas as cepas foram obtidas a partir de amostras de hemoculturas positivas, em frasco aeróbio, no sistema automatizado de hemocultura BD BACTEC™ (Becton Dickinson, New Jersey, EUA). Não houve mudança na metodologia do sistema automatizado de hemocultura BD BACTEC™ (Becton Dickinson, New Jersey, EUA). Por se tratar de estudo retrospectivo não foi possível rastrear o Delta T (Δt) de positividade das hemoculturas, ou seja, a determinação do tempo diferencial de positividade de hemoculturas, representado pelo intervalo decorrido entre a positividade de uma amostra obtida do CVC e outra colhida simultaneamente de um sítio periférico. Foi realizado a técnica de coloração de Gram para todas as amostras de sangue positivas e após confirmação de estruturas leveduriformes Gram positivas as amostras de sangue foram semeadas em agar sangue de carneiro 5% (Plastlabor, Brasil), incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 24 h. Após isolar a levedura, foi realizada nova semeadura por esgotamento em estrias, em Placas de Petri (90 mm), contendo meio de cultura apropriado Agar Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol (Plastlabor, Brasil) incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 72 h. Posteriormente foram identificados no INCA pelo sistema de identificação de leveduras VITEK® 2 YST (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França), seguindo rigorosamente as recomendações do fabricante. As leveduras foram armazenadas no Laboratório de Micologia do INCA - HCl em água destilada estéril.

4.6.4 Reativação, Viabilidade e Pureza das cepas

Para inclusão nesse estudo foram realizados testes de viabilidade e pureza. As cepas foram semeadas por esgotamento em estrias em Placas de Petri (90 mm) contendo o meio de agar Sabouraud dextrose (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA) e as placas foram incubadas a 35 °C por 72 h para avaliar a viabilidade. A seguir, as cepas foram semeadas no meio CHROMagar® *Candida* (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA) e mantidas sob as mesmas condições de temperatura e tempo para avaliar a pureza. A interpretação dos resultados foi baseada no exame macroscópico das colônias e a cor, no caso do CHROMagar® *Candida*, de acordo com as orientações do fabricante: verde, *C. albicans*; azul metálico, *C. tropicalis*; rosa, rugosa, *C. krusei*; e branca a roxo, demais espécies.

4.6.5 Autenticação molecular

4.6.5.1 Extração do DNA genômico

Antes da extração do ácido nucleico, as cepas foram semeadas em placas de Petri (90 mm) contendo o meio ágar Sabouraud dextrose (Difco). Após crescimento e partindo de uma colônia isolada, foi realizado um repique neste mesmo meio de cultura e o cultivo foi mantido a 35 °C por 24 horas para obtenção de massa celular. O DNA genômico da levedura foi extraído conforme descrito por ALCOBA-FLOREZ e colaboradores (2005). A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão 1 X TBE (0,1 M de Tris-HCl pH 8,4; 0,09 M de ácido bórico; 0,001 M de EDTA) por aproximadamente 1 hora sob uma tensão de 90 V. A seguir, o gel foi submerso numa solução de brometo de etídio (Invitrogen™, Carlsbad, CA USA) a uma concentração final de 0,5 µg/mL por 30 minutos e as bandas visualizadas sob luz ultravioleta (UV) de um transiluminador (HOEFER®, MacroVue UV-20).

4.6.5.2 Amplificação e sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal (rDNA)

A amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 100 ng do DNA genômico de cada cepa, 1X tampão da reação em cadeia da polimerase (PCR) (10 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂; Invitrogen™, Brasil); 0,2 mM de cada dNTP, 2,5 U de *Taq* DNA polimerase recombinante, e 10 pmol dos primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). A PCR foi realizada em termociclador Bio Rad (modelo C 1000) com 5 minutos iniciais de desnaturação a 95 °C; 30 ciclos com 1 minuto de desnaturação a 95 °C, 1 minuto de pareamento a 55 °C e extensão de 1 minuto a 72 °C; seguido de uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. O produto amplificado foi purificado com o QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN®) de acordo com instruções do fabricante e enviado à Plataforma de Sequenciamento Genômico PDTIS/Fiocruz, a qual utiliza o sequenciador ABI-3730 (Applied Biosystems). As sequências foram editadas no software Sequencher™ versão 4.9 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA), alinhadas e analisadas com o programa MEGA versão 6.06 (TAMURA *et al.*, 2013). As sequências obtidas para todas as cepas incluídas no estudo foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados do CBS *database* (<http://www.westerdijknstitute.nl/Collections/>), sendo selecionadas aquelas com 98% a 100% de similaridade. As sequências foram analisadas neste banco de dados por ser um

banco de referência para sequenciamento de DNA de fungos. Assim foi possível realizar as análises filogenéticas e identificar as espécies e complexos de espécies incomuns de *Candida não-albicans*.

4.6.5.3 Amplificação e sequenciamento da região D1/D2 da maior subunidade do gene 28S do DNA ribossomal (rDNA)

A região D1/D2 da subunidade maior do gene 28S do rDNA foi sequenciada para as cepas nos quais não foi possível obter identificação molecular através do sequenciamento da região ITS. O produto da amplificação foi obtido com 50 ng de DNA genômico e 10 pmol de cada primer, NL-1 (50-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-30) e NL-4 (50-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-30). A reação foi realizada sob uma temperatura de anelamento de 60°C conforme descrito por Asadzadeh *et al.*, 2009 (ASADZADEH *et al.*, 2009). As demais condições foram semelhantes às descritas acima para a amplificação da região ITS. O amplicon obtido após a amplificação foi purificado com o QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN®), de acordo com instruções do fabricante, e enviado à Plataforma de Sequenciamento Genômico PDTIS/Fiocruz, a qual utiliza o sequenciador ABI-3730 (Applied Biosystems). A sequência foi editada no software Sequencher™ versão 4.9 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA), alinhada e analisada com o programa MEGA versão 6.06 (TAMURA *et al.*, 2013). A sequência obtida para a cepa foi comparada com as sequências depositadas no banco de dados do CBS *database* (<http://www.westerdijknstitute.nl/Collections/>), sendo selecionadas aquelas com 98% a 100% de similaridade.

4.6.6 Avaliação de metodologias de determinação da suscetibilidade

4.6.6.1 Método de diluição - Microdiluição em caldo

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada por microdiluição em caldo de acordo com o protocolo do *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* – BrCAST (ARENDRUP *et al.*, 2020). Os fármacos antifúngicos testados em dez diferentes concentrações (0,008; 0,016; 0,031; 0,062; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4 mg/L) foram anfotericina B, itraconazol, posaconazol, voriconazol, caspofungina, micafungina e fluconazol (0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64 mg/L).

Não há *clinical break points* estabelecidos no protocolo BrCAST (ARENDRUP *et al.*, 2020) para a maioria das leveduras incomuns, com exceção da *Candida dubliniensis*. Desta forma, as cepas de *C. dubliniensis* do estudo foram classificadas como sensíveis ou resistentes de acordo com o protocolo BrCAST 2020 (ARENDRUP *et al.*, 2020).

O documento EUCAST estabelece o ponto de corte não relacionado a espécies (*Non-species related breakpoints for Candida*), utilizado para avaliar algumas espécies de *Candida* que não possuem ponto de corte clínico no protocolo. Neste caso, para fluconazol, se o valor da CIM for $\leq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ considera-se sensível. E se o valor da CIM for $\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$, resistente (EUCAST, 2018). As cepas reidentificadas como *Y. lipolytica*, *C. dubliniensis* e *K. marxianus* foram classificadas desta forma para fluconazol.

O protocolo EUCAST descreve o ponto de corte epidemiológico – PCE (*epidemiological cut off*) para algumas espécies incomuns de *Candida não-albicans* em relação aos fármacos antifúngicos anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol. Não há classificação de PCE para caspofungina e micafungina (EUCAST, 2018).

Desta forma, de acordo com os pontos de corte epidemiológico (PCE) fornecido pelo EUCAST, na inexistência de *clinical break points*, as cepas do Complexo *M. guilliermondii*, *C. dubliniensis* e *K. marxianus* reidentificadas neste estudo foram classificadas como tipo selvagem (WT) ou tipo não-selvagem (*non-WT*) para os antifúngicos testados previstos no referido protocolo (EUCAST 7.3.1, 2017 PFALLER *et al.*, 2012 e 2014, ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2017).

A fim de verificar se o perfil de suscetibilidade das cepas incluídas neste estudo é compatível com o perfil reportado pelo documento EUCAST (EUCAST, 2018), foi realizada análise comparativa da distribuição da CIM modal das cepas do presente estudo com a distribuição da CIM modal das cepas descritas nas tabelas para interpretação dos pontos de corte epidemiológicos do protocolo EUCAST (EUCAST, 2018).

4.6.6.2 Método de Difusão por Gradiente de Concentração de Antifúngico Pré-definido em Fita - Etest®

Foram utilizadas Placas de Petri 150 x 15 mm contendo meio RPMI 1640, sem vermelho de fenol, com L-glutamina, sem bicarbonato, suplementado com 2% de glicose e 1,5% de ágar e tamponado com 0,165 M de ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico - MOPS. O inóculo foi preparado a partir de uma cultura pura com repique de 24 horas no meio ágar Sabouraud dextrose. A seguir, uma suspensão da levedura foi preparada em 3

mL de solução salina a 0,85% e a densidade ajustada à escala 0,5 McFarland, correspondendo a $1-2 \times 10^6$ UFC/ mL. Com auxílio de um swab estéril, a suspensão foi inoculada em toda superfície do ágar. As tiras do tipo Etest[®] contendo gradientes de concentrações, variando de 0,002 a 32 µg/mL para os antifúngicos anfotericina B, itraconazol, voriconazol, caspofungina, e micafungina, e 0,016 a 256 µg/mL para fluconazol, foram então aplicadas na placa de RPMI 1640, separadas equidistantes uma da outra, e incubadas a 35 °C por 24 h. Após incubação, o valor da CIM foi determinado através da visualização da área de interseção da elipse com a fita de Etest[®], conforme recomendado pelo fabricante (BIOMERIEUX, 2017).

Os resultados das CIM's encontrados no método comercial Etest[®] foram comparados aos encontrados na técnica de microdiluição, recomendada pelo BrCAST, de acordo com FIGUEIREDO-CARVALHO *et al.* (2014), onde atualizamos o protocolo da técnica de microdiluição para o BrCAST, vigente atualmente no Brasil. As comparações foram feitas usando o critério da concordância categórica (CC), quando a CIM apresenta classificação idêntica a categoria interpretativa nas duas técnicas, isto é, suscetível (S), suscetível dependente da dose (SDD), intermediário (I) ou resistente (R), e a concordância essencial (CE), quando a CIM apresenta discrepâncias de mais de duas diluições (dois poços), de acordo com o US Food and Drug Administration (FDA).

4.6.6.3 Método automatizado – Sistema VITEK[®] 2 AST

As cepas foram semeadas em Placas de Petri (90 mm) contendo o meio ágar Sabouraud dextrose para obtenção de massa celular. Após 24h de incubação a 30 °C e partindo de uma colônia isolada, foi preparado o inóculo em um tubo contendo 3 mL de solução salina, para cada amostra, em escala 0,5 McFarland, conforme recomendado pelo fabricante do teste. Os mesmos foram inseridos no equipamento VITEK[®] 2 juntamente com o cartão AST-YS08 leveduras (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France) e incubados por no máximo 24h, até que houvesse liberação do resultado pelo sistema do equipamento. As concentrações da droga neste cartão teste de suscetibilidade variaram de 1 a 32 µg/mL para anfotericina B, de 1 a 8 µg/mL para caspofungina, de 1 a 16 µg/mL para fluconazol e de 0,5 a 8 µg/mL de voriconazol.

Os resultados das CIM's encontrados no método comercial automatizado VITEK[®] 2 foram comparados aos encontrados na técnica de microdiluição recomendada pelo BrCAST de acordo com FIGUEIREDO-CARVALHO *et al.* (2014), onde foram avaliadas a concordância categórica e a concordância essencial, conforme descrito. O cartão VITEK[®]

2 AST leveduras não contém itraconazol. Todos os testes foram realizados em duplicata e, em casos de discrepância foram repetidos mais uma vez.

4.6.6.4 Comparação das metodologias de determinação da suscetibilidade antifúngica

A Concordância essencial (CE) das cepas foi avaliada para todas as espécies do estudo comparando as metodologias de determinação da suscetibilidade antifúngica, método de diluição - microdiluição em caldo, método do gradiente antimicrobiano - Etest® e método automatizado – Sistema VITEK® 2, a fim de verificar se as CIMs entre as metodologias eram concordantes. De acordo com US Food and Drug Administration (FDA) (US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2009) as CIMs são concordantes quando há uma variação de até duas concentrações inibitórias mínimas, acima ou abaixo, entre as metodologias, tendo como padrão ouro o método de diluição - microdiluição em caldo. Discrepâncias acima de duas diluições (dois poços) entre os pontos finais de CIM foram usadas para calcular a CE.

A Concordância Categórica (CC) foi avaliada para as cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* isoladas em sangue periférico dos pacientes, para os métodos Etest® e VITEK® 2 AST, em comparação com as espécies de *Candida* não-*albicans* incomuns descritas no protocolo EUCAST (*C. dubliniensis*, *M. guilliermondii*, *M. caribbica* e *K. marxianus*) classificando as cepas em *Wild Type* (WT) e *non-Wild Type* (non-WT). A CC foi considerada quando os valores de CIM estavam dentro da mesma categoria interpretativa.

4.6.7 Avaliação de fenótipos associados à virulência

4.6.7.1 Fatores de virulência

Foi avaliada a atividade enzimática das cepas através da produção de enzimas hidrolíticas: aspártico protease, fosfolipase, fitase, hemolisina e catalase, conforme descrito previamente (ABI-CHACRA *et al.*, 2013), com algumas poucas modificações, descritas a seguir. A atividade enzimática foi mensurada em Placas de Petri de 150 x 15 mm para aspártico protease, lipase e fitase, e em Placas de Petri de 90 mm para hemolisina e catalase, contendo meios específicos para cada enzima. Alíquotas de 10 µL contendo 1×10^7 células da levedura crescidas em meio de Agar Sabouraud Dextrose

com Cloranfenicol (Plastlabor) foram inoculadas pontualmente na superfície de cada meio e incubadas a 37°C por 7 dias. O diâmetro da colônia (a) e o diâmetro da zona de precipitação (b) foram mensurados com uma régua. As atividades enzimáticas de aspártico proteases, lipases, fitases, e hemolisinas foram expressas como valor de Pz ($Pz=a/b$) (PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982). Valores baixos significam alta produção enzimática e valores altos indicam baixa produção enzimática (**Quadro 1**).

Quadro 1. Critérios para avaliação da produção de enzimas hidrolíticas de acordo com o valor de Pz ($Pz = a/b$).

Atividade enzimática	
Valor de Pz ($Pz = a/b$)	Classificação
1	Negativo
0,700 – 0,999	Baixo
0,400 – 0,699	Moderado
0,100 – 0,399	Alto

Pz, potencial zeta; a: diâmetro da colônia; b: diâmetro da colônia mais a zona de precipitação.

4.6.7.1.1 Atividade de aspártico protease

Como descrito por Rùchel e colaboradores (1982), a produção de aspártico protease foi determinada usando o meio de ágar albumina [contendo 1,17% de meio base de carbono para leveduras [meio *Yeast Carbono Base* (YCB) (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA) suplementado com 0,2% de albumina sérica bovina (BSA) (Sigma–Aldrich, St Louis, USA), pH 4,0] (RÜCHEL; TEGELER; TROST, 1982). Cepas com atividade enzimática de aspártico protease apresentam uma zona clara ao redor da colônia, correspondendo à hidrólise de BSA no meio

4.6.7.1.2 Atividade de fosfolipase

De acordo com Price e colaboradores (1982), a atividade de fosfolipase foi determinada usando o meio ágar gema de ovo [composto de 2% de glicose (Sigma–Aldrich, St Louis, USA); 1% de peptona; 0,5% de extrato de levedura (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA); 4% de NaCl; 0,074% de $CaCl_2$ (Sigma–Aldrich, St Louis, USA); 1,5% de ágar (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA); a seguir, 2% de emulsão da gema do ovo foi adicionado ao meio, pH 7,0) (PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982). Quando a fosfolipase está presente durante o período de incubação é capaz de

promover a clivagem das ligações éster e, então, os ácidos graxos liberados poderão se ligar aos íons cálcio incorporados ao meio, para formar um complexo de cálcio insolúvel, resultando em um halo claro ao redor da colônia.

4.6.7.1.3 Atividade de fitase

Como previamente descrito por Tsang (2011), a atividade da fitase (hexafosfato de mio-inositol fosfo-hidrolase) foi determinada usando o meio contendo ágar fitato de cálcio [composto de 1% de glicose; 0,05% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,02% de KCl; 0,01% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,0005% MnSO_4 ; 0,0005% de FeSO_4 (Sigma–Aldrich, St Louis, USA); 0,2% de fitato de cálcio; 0,05% de extrato de levedura; 1,5% de ágar, pH 7,0] (TSANG, 2011). A atividade da fitase foi diretamente observada ao redor da colônia capaz de solubilizar o fosfato presente no meio.

4.6.7.1.4 Atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi verificada usando o meio comercial ágar sangue de carneiro a 5% em Placa de Petri de 90 mm (Plast Labor, Brasil). A presença de um halo ao redor da colônia indica atividade hemolítica positiva.

4.6.7.1.5 Atividade da catalase ou resistência ao estresse oxidativo

A atividade de catalase foi presumida pela resistência ao peróxido de hidrogênio em meio sólido por difusão em placa de ágar sabouraud, no qual as células de levedura são misturadas com o agar quente até uma concentração final de 1×10^6 leveduras/ ml de meio de cultura. Após a solidificação do ágar em Placas de Petri 150 x 15 mm, foram feitos quatro orifícios de aproximadamente 5 mm de diâmetro, sendo adicionados 65 μl de peróxido de hidrogênio (Proquimios, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As placas foram incubadas a 35 °C e as zonas de inibição de crescimento foram medidas 7 dias após a incubação. Quatro réplicas de três experimentos independentes foram usados para o cálculo das médias e desvios-padrão.

4.6.8 Correlação entre as características clínicas e microbiológicas dos pacientes

A associação de resultados obtidos *in vitro* relativos à espécie da levedura após identificação molecular, concentração mínima inibitória dos fármacos antifúngicos utilizados no tratamento e produção de enzimas hidrolíticas extracelulares com o desfecho clínico dos pacientes foi realizada, a fim de identificar se cepas produtoras de enzimas extracelulares associadas à virulência estão associadas a pior evolução clínica em relação às infecções causadas por cepas sensíveis (ALASTRUEY-IZQUIERDO *et al.*, 2015).

4.7 Análises Estatísticas

Foram calculadas proporções, moda ou mediana (variações) para as variáveis categóricas e contínuas, respectivamente. Para as variáveis categóricas foram utilizados os testes estatísticos de Qui-quadrado (χ^2) ou teste bicaudal de Fisher; e para as variáveis contínuas foram utilizados os testes de Mann-Whitney ou o teste de Correlação de Spearman, conforme apropriado.

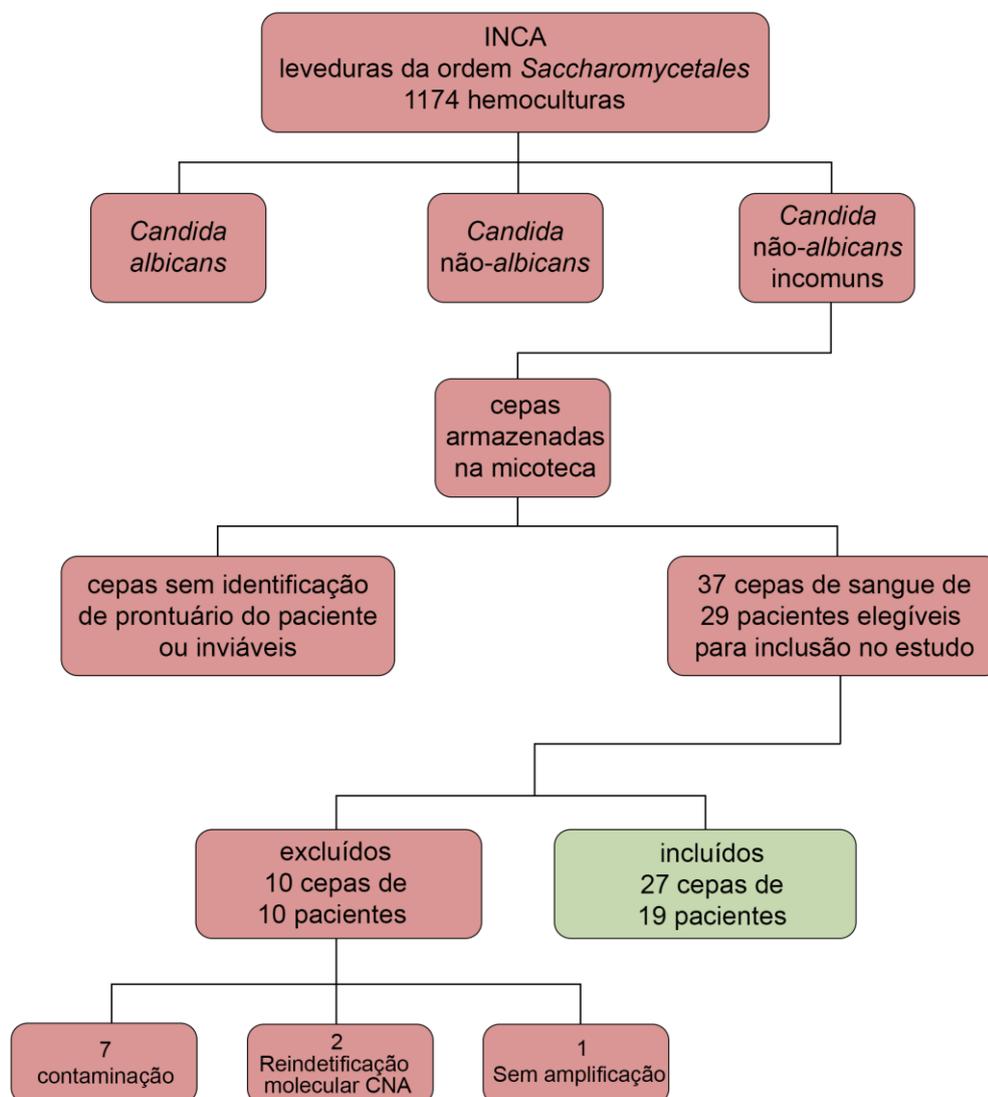
A mortalidade em 30 dias foi calculada através da divisão do número de óbitos em até 30 dias após a data da fungemia pelo número total de ICS por leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales*. Para investigar as variáveis potencialmente associadas ao óbito em 30 dias (variável dependente) após a detecção da fungemia foi feita uma análise tipo caso-controle. Nesta análise, os casos (pacientes com óbito em até 30 dias após a data da fungemia) e controles (pacientes sobreviventes em até 30 dias após a data da fungemia) foram comparados através de análise univariada. As variáveis de exposição (variáveis independentes) investigadas foram: aquelas relacionadas as características do paciente, as características do episódio de ICS e as características microbiológicas das cepas causadoras de infecção. Foram calculados os valores de razão das chances (*Odds Ratio*; OR), intervalo de confiança (IC) de 95% e o valor de *P*. Foi considerado como estatisticamente significativo os valores de $P < 0,05$ e os IC 95% que não incluiu o valor da unidade. As análises foram feitas nos *softwares* GraphPad Prism 8.4 e no Epiinfo 7.

5 RESULTADOS

5.1 Descrição da população e cepas selecionados para o estudo

Inicialmente foram incluídas 37 cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* isoladas de sangue de 29 pacientes elegíveis para o estudo, sendo que 10 cepas provenientes de 10 pacientes foram excluídos. Sendo assim, foram incluídas 27 cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* provenientes de 19 pacientes com fungemia, no período de 01/01/2002 a 31/12/2017, conforme detalhado na **Figura 3**.

Figura 3. Pacientes e cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* incluídas no estudo de infecção de corrente sanguínea no INCA-RJ no período de 01/01/2002 a 31/12/2017.



INCA, Instituto Nacional do Câncer; CNA, *Candida não-albicans*

5.2 Descrição das características epidemiológicas, clínicas e microbiológicas das fungemias por cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales*

Dentre os 19 pacientes incluídos no estudo, 57,9% (n=11) foram do sexo masculino. A mediana da idade foi 35 anos (variação: 18 a 75 anos); 68,4% (n=13) tinham doença de base hematológica; 89,6% (n: 17) tinham proposta curativa para o câncer em tratamento; 79,0% (n: 15) dos casos tiveram ICS de origem primária; 47,4% (n: 9) evoluíram para o óbito em 30 dias após o diagnóstico da ICS, conforma detalhado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Características demográficas e clínicas de 19 pacientes com infecção de corrente sanguínea por cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* detectadas no Instituto Nacional do Câncer - Hospital do Câncer I, de 01/01/2002 a 31/12/2017.

Dados demográficos e clínicos	n = 19 (%)
Idade	
18 - 30	7 (36,8)
31 - 59	6 (31,6)
≥60	6 (31,6)
Gênero	
Masculino	11 (57,9)
Doença de base	
Hematológica	13 (68,4)
Não hematológica	6 (31,6)
Status do Câncer	
Em tratamento	17 (89,6)
Em controle	1 (5,2)
Sem proposta curativa	1 (5,2)
Topografia da infecção	
Infecção primária	
15 (79,0)	
Indeterminada	
9 (47,4)	
Cateter longa permanência	
4 (21,0)	
Dano de barreira mucosa	
2 (10,6)	
Infecção secundária	
4 (21,0)	
Pneumonia	
2 (10,6)	
Foliculite em face	
1 (5,2)	
Sinusite	
1 (5,2)	
Necessidade de terapia intensiva^a	
8 (42,1)	
Acesso vascular profundo no momento da ICS	
15 (78,9)	
Uso prévio de antifúngico últimos 30 dias	
7 (36,8)	
Uso de corticoides nos últimos 30 dias	
11 (57,9)	
Quimioterapia nos últimos 30 dias	
Sim	
8 (42,1)	
Não	
10 (52,6)	
Sem informação	
1 (5,3)	
Neutropenia < 500 células/ mm³	
Presente	
4 (21)	
Ausente	
14 (73,7)	
Sem informação	
1 (5,3)	
Neutropenia profunda < 100 células/ mm³.	
2 (10,5)	
Proteína C reativa	
Acima de 0,3 mg/dL	
14 (73,7)	
Sem informação	
5 (26,3)	
Receberam tratamento para infecção de corrente sanguínea atual	
Sim	
16 (84,2)	
Não	
1 (5,3)	
Sem informação	
2 (10,5)	
Óbito a partir da data da fungemia	
9 (47,4)	
Em até 7 dias	
5 (26,3)	
Em até 30 dias	
4 (21,1)	

^aDefinido como a necessidade de cuidados intensivos (CI) devido a ICS: utilização de aminas vasoativas, ventilação mecânica ou transferência para unidade de terapia intensiva 48h antes ou depois da ICS.

Dentre os 19 episódios de fungemia, 31,6% (n: 06) foram causadas por *Meyerozyma* spp.; 31,6% (n: 06) por *Candida* spp. e 15,8% (n: 03) por *Wickerhamomyces anomalus*, entre outras leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* menos frequentes, conforme detalhado na **Tabela 2**.

Tabela 2. Frequência das espécies de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* isoladas nos 19 pacientes com fungemia no Hospital do Câncer I do Instituto Nacional do Câncer de 01/01/2002 até 31/12/2017.

Levedura (n)	Pacientes (n)	Frequência (%)
<i>Candida</i> spp. (08)	06	31,6
<i>C. dubliniensis</i> (02)	02	
<i>C. haemulonii</i> var. <i>vulnera</i> (05)	03	
<i>C. intermedia</i> (01)	01	
<i>Meyerozyma</i> spp. (10)	06	31,6
<i>M. guilliermondii</i> (05)	04	
<i>M. caribbica</i> (05)	02	
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (05)	03	15,8
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (02)	02	10,6
<i>Kodamaea ohmeri</i> (01)	01	5,2
<i>Yarrowia lipolytica</i> (01)	01	5,2
Total (27)	19	100

Das 15 fungemias de origem primária, 33,3% (n: 05) foram causadas por *Candida* spp, 26,7 % (n:04) por *Meyerozyma* spp. Dos seis pacientes com fungemia por *Meyerozyma* spp, cinco fizeram uso de corticoide ou quimioterapia nos últimos 30 dias antes da fungemia e quatro apresentavam neutropenia no momento da infecção. A descrição dos casos está detalhada no **Quadro 2**.

Quadro 2. Descrição dos 19 casos de infecção de corrente sanguínea por leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* detectadas no INCA-RJ no período do estudo.

Paciente	Data da ICS	Cepa	Idade (anos)	Gênero	Doença de base	Status do câncer ^a	TIPO de ICS ^a	Origem Da infecção ^a	UTI ^b	PCR ^c	Neutropenia (nº de neutrófilos) ^d	Uso prévio de corticóides ^e	QT ^f	Uso prévio de antifúngicos ^g	Tratamento ^h	Desfecho (tempo até o óbito)
1	09/06/2017	<i>Candida dubliniensis</i>	63	M	Leucemia linfomatosa de células T	Em tratamento	ISCS	Pneumonia	sim	1,34	Não (24.566)	Não	não	não	ANI	Óbito (quatro dias)
2	03/11/2016	<i>Candida dubliniensis</i>	60	F	Carcinoma uterino	Em controle	IPCS	IND	sim	0,5	Não (9.756)	Não	não	não	Não tratou	Óbito (dia da hemocultura)
3	12/04/2015	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	27	M	Sarcoma mielóide de amígdala	Em tratamento	IPCS	CVC-LP	Não	3,39	Não (6.954)	Não	Sim	ANI/ VOR	ANI	alta
4	12/13/2015	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	37	F	Carcinoma uterino	Em tratamento	IPCS	IND	não	12,8	Não (11.691)	Sim	Sim	Não	FLU	Óbito (106 dias)
5	12/12/2015	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	24	M	Seminoma	Em tratamento	ISCS	Pneumonia	não	21,99	Não (8.989)	Sim	Sim	Não	FLU	alta
6	27/11/2015	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	24	F	Linfoma Hodgkin	Em tratamento	IPCS	CVC-LP	não	NA	SI	sim	não	não	FLU	alta
7	21/11/2015	<i>Candida haemulonii</i> var. <i>vulnera</i> ^c	18	M	Linfoma linfoblástico não Hodgkin	Em tratamento	IPCS	CVC-LP	não	2,1	Não (2.280)	sim	Sim	não	ANI	alta
8	15/10/2015	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	75	F	Câncer de ovário	Sem proposta curativa	IPCS	IND	sim	68,8	Não (23.670)	não	não	não	MFG	Óbito (nove dias)
9	07/06/2015	<i>Meyerozyma caribbica</i>	19	M	Anemia Aplástica diopática	Em tratamento	ISCS	Foliculite	sim	13,31	Sim (295)	Sim	Não	FLU/ ANF	VOR/ MFG	Óbito (um dia)
10	25/03/2015	<i>Kluyveromyces marxianus</i> ^c	22	F	Estesio neuroblastoma	Em tratamento	IPCS	IND	sim	1,13	Não (14.248)	sim	sim	MFG	MFG	alta

11	21/09/2014	<i>Wickerhamomyces anomalous</i>	25	M	Leucemia Mielóide aguda	Em tratamento	ISCS	Sinusite	não	12,72	Sim (47)	não	não	não	MFG/ ANFB	Óbito (18 dias)
12	10/03/2014	<i>Candida haemulonii</i> var <i>vulnera</i> ^c	32	F	Síndrome mielodidplásica	Em tratamento	IPCS	IND	não	NA	Não (6.920)	sim	SI	não	FLU/ CASPO	alta
13	01/09/2014	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	51	F	Leucemia Mielóide aguda	Em tratamento	IPCS	DBM	sim	26,57	Sim (236)	Sim	Sim	FLU/ ANI/ MFG	ANF	Óbito (três dias)
14	18/02/2013	<i>Candida haemulonii</i> var <i>vulnera</i> ^c	52	M	Leucemia Mielóide aguda	Em tratamento	IPCS	CVC-LP	não	1,25	Não (12.877)	sim	não	não	CASPO	alta
15	13/08/2015	<i>Kodamaea ohmeri</i> ^c	63	M	Mieloma múltiplo	Em tratamento	IPCS	IND	sim	20,36	Não (20.358)	sim	sim	FLU	MFG	Óbito (seis dias)
16	04/29/2016	<i>Meyerozyma caribbica</i>	34	M	Linfoma linfoblástico	Em tratamento	IPCS	DBM	Não	15,2	Sim (Zero) ^b	sim	Sim	Não	ANF/MFG	alta
17	07/12/2009	<i>Yarrowia lipolytica</i> ^c	60	M	Plasmocitoma	Em tratamento	IPCS	IND	não	NA	Não (4.045)	não	não	não	SI	alta
18	25/05/2002	<i>Candida intermedia</i>	43	F	Câncer de esôfago	Em tratamento	IPCS	IND	não	NA	Não (8.219)	não	não	não	SI	Óbito (dez dias)
19	26/01/2002	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	69	M	Linfoma não Hodgkin	Em tratamento	IPCS	IND	não	NA	Não (9.044)	não	não	não	FLU	Óbito (13 dias)

^a Classificação de acordo com o relato em prontuário médico.

^b Definido como a necessidade de cuidados intensivos (CI) devido a ICS: utilização de aminas vasoativas, ventilação mecânica ou transferência para unidade de terapia intensiva 48h antes ou depois da ICS.

^c Nível sérico da Proteína C reativa (PCR, mg/dL) na data da ICS ou até 48h antes ou depois; considerado o maior valor.

^d Neutropenia < 500 células/mm³; Neutropenia profunda <100 células/mm³ na data da ICS ou 48h antes ou depois, considerado o menor valor.

^{e,f,g} Nos últimos 30 dias.

^h Iniciado para a fúlgem atual.

INCA-RJ: Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro; QT: quimioterapia; M: masculino; F: feminino; ISCS: infecção secundária de corrente sanguínea; IPCS: infecção primária de corrente sanguínea; IND: indeterminada; CVC-LP: cateter venoso central de longa permanência; DBM: dano de barreira mucosa; NA: não avaliado; SI: sem informação; ANI: anidulafungina; VOR: voriconazol; FLU: fluconazol; ANF: anfotericina B; MFG: micafungina; CASPO: caspofungina.

5.3 Cepas

Foram incluídos no estudo 37 cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales*, provenientes de hemoculturas positivas em frasco aeróbio no sistema automatizado de hemocultura BD BACTEC™ (Becton Dickinson, New Jersey, EUA), que estavam armazenadas na coleção de culturas do Laboratório de Micologia do INCA. Dez cepas foram excluídas por critérios do estudo: cepas não viáveis após tentativa de recuperação ($n=7$), resultado da reidentificação molecular igual a *Candida tropicalis* ($n=2$), sem amplificação após reidentificação molecular por ITS e D1/D2 ($n=1$). Desta forma o total de 27 cepas foram incluídas no estudo.

Todas as cepas do estudo foram depositadas na Coleção de Fungos Patogênicos - CFP do Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – INI/ FIOCRUZ.

5.4 Cepas de referência

As cepas de referência, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019, utilizadas como controle de qualidade nos testes de suscetibilidade aos antifúngicos, reidentificação molecular e nos testes fenotípicos relacionados aos fatores de virulência se apresentaram dentro dos valores de normalidade, validando estas etapas do estudo.

5.5 Autenticação molecular

5.5.1 Amplificação e sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal (rDNA)

A autenticação molecular pela amplificação e sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal (rDNA) permitiu identificar 26 cepas do estudo: dez cepas do Complexo *Meyerozima guilliermondii*, sendo cinco destes identificados como *Meyerozima guilliermondii* e os outros cinco como *Meyerozima caribbica*; cinco cepas de *Wickerhamomyces anomalus*, cinco cepas *Candida haemulonii* var. *vulnera*, duas cepas de *Kluyveromyces marxianus*, duas cepas de *Candida dubliniensis*, uma cepa de *Kodamaea ohmeri* e uma cepa de *Candida intermedia* (**Quadro 3**).

5.5.2 Amplificação e sequenciamento da região D1/D2 da maior subunidade do gene 28S do DNA ribossomal (rDNA)

Das 27 cepas selecionadas para o estudo, apenas uma não foi identificada pela amplificação e sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 e seguiu para a autenticação molecular pela amplificação e sequenciamento pela região D1/D2 do rDNA, que identificou *Yarrowia lipolytica* (**Quadro 3**).

5.5.3 Comparação dos resultados obtidos por ITS e D1/D2 e do sistema de identificação de leveduras VITEK® 2 YST (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França)

A comparação dos resultados obtidos pela autenticação molecular das regiões ITS e D1/D2, e o sistema de identificação de leveduras VITEK® 2 YST (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) utilizado para identificar previamente as 27 cepas de leveduras incomuns do presente estudo, revelou as seguintes discrepâncias entre as metodologias: duas cepas de *M. guilliermondii* (CFP00917 e CFP00918) foram identificados previamente como *C. famata*; uma cepa de *M. caribbica* (CFP00924) havia sido identificado como *Candida pelliculosa*; e ainda uma cepa de *Candida intermedia* (CFP00982), que foi identificado inicialmente como *C. lusitaniae*.

Os resultados da autenticação molecular pelo sequenciamento das regiões ITS e D1/D2, das 27 cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* obtidas de sangue periférico de 19 pacientes, encontram-se descritos no **Quadro 3**.

Quadro 3 – Comparação dos resultados da autenticação molecular por ITS e D1/D2 e do sistema de identificação de leveduras VITEK® 2 YST (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França), de 27 cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales*, obtidos em sangue periférico, de 19 pacientes no período de 01/01/2002 a 31/12/2017 no INCA-RJ.

Paciente	Cepa	Data da ICS	VITEK® 2	ITS	D1/D2
1	CFP00964	09/06/2017	<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida dubliniensis</i>	NR
2	CFP00965	08/11/2016	<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida dubliniensis</i>	NR
3	CFP00915	04/12/2015	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	NR
	CFP00916	04/12/2015	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	NR
4	CFP00917	13/12/2015	<i>Candida famata</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	NR
5	CFP00918	12/12/2015	<i>Candida famata</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	NR
6	CFP00966	30/11/2015	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	NR
7	CFP00967	21/09/2015	<i>Candida haemulonii</i>	<i>Candida haemulonii</i> var. <i>vulnera</i>	NR
	CFP00968	21/09/2015	<i>Candida haemulonii</i>	<i>Candida haemulonii</i> var. <i>vulnera</i>	NR
8	CFP00969	19/10/2015	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	NR
	CFP00970	19/10/2015	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	NR
9	CFP00919	08/07/2015	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma caribbica</i>	NR
	CFP00920	06/07/2015	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma caribbica</i>	NR
	CFP00921	06/07/2015	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma caribbica</i>	NR
	CFP00922	06/07/2015	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma caribbica</i>	NR
10	CFP00971	26/03/2015	<i>Candida kefyr</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NR
11	CFP00972	21/09/2014	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	NR
	CFP00973	22/09/2014	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	NR
12	CFP00974	10/03/2014	<i>Candida haemulonii</i>	<i>Candida haemulonii</i> var. <i>vulnera</i>	NR
	CFP00975	10/03/2014	<i>Candida haemulonii</i>	<i>Candida haemulonii</i> var. <i>vulnera</i>	NR

13	CFP00923	09/01/2014	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	NR
14	CFP00977	20/02/2013	<i>Candida haemulonii</i>	<i>Candida haemulonii</i> var. <i>vulnera</i>	NR
15	CFP00978	13/08/2015	<i>Kodamaea ohmeri</i>	<i>Kodamaea ohmeri</i>	NR
16	CFP00924	29/04/2016	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Meyerozyma caribbica</i>	NR
17	CFP00979	07/12/2017	<i>Candida lipolytica</i>	SA	<i>Yarrowia lipolytica</i>
18	CFP00982	25/05/2002	<i>Candida lusitanae</i>	<i>Candida intermedia</i>	NR
19	CFP00983	26/01/2002	<i>Candida kefyr</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NR

ICS, infecção de corrente sanguínea; ITS, *Internally transcribed spacer*; D1/D2, large subunit rRNA; CFP, coleção de fungos patogênicos; NR, não realizado; SA, sem amplificação.

Ao analisar a árvore filogenética a partir da região ITS1-5.8S-ITS2 rDNA para as 27 cepas de leveduras identificadas por essa metodologia percebemos sete clados. O primeiro agrupou as cepas de *M. guilliermondii* e *M. caribbica*; o segundo clado agrupou as cepas de *C. dubliniensis*; o terceiro agrupou as cepas de *K. marxianus*; o quarto clado agrupou as cepas de *W. anomalus*; o quinto clado agrupou *K. ohmeri*; o sexto agrupou *C. intermedia*, e por fim, o sétimo clado agrupou as cepas de *Candida haemulonii* var. *vulnera*. A árvore filogenética para a região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA para as leveduras incomuns está representada na **Figura 4**.

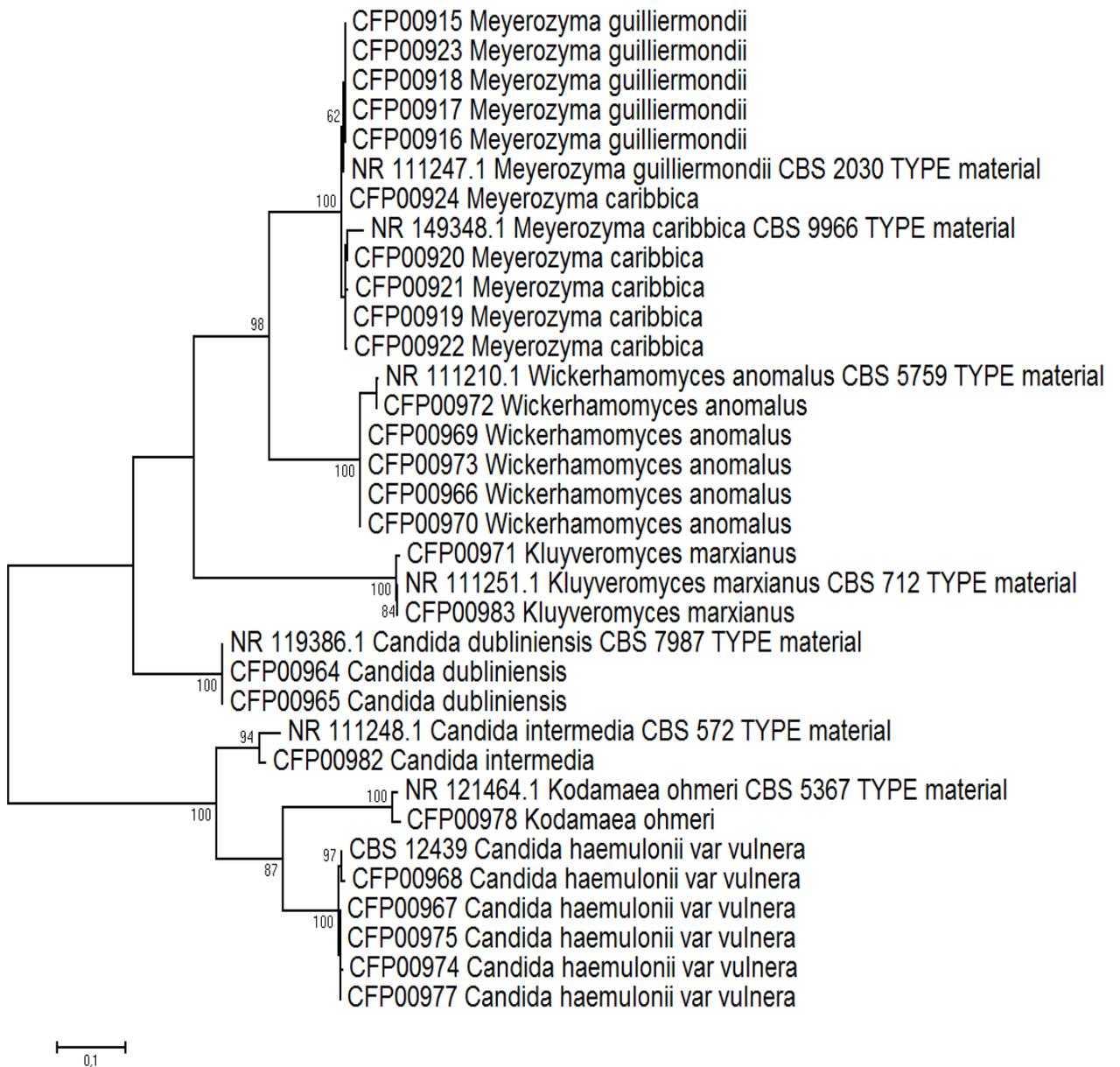


Figura 4. Análise filogenética molecular pelo método *Likelihood* baseada a partir da sequência da região ITS para 26 nucleotídeos de cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* analisadas neste estudo. Os números sobre os ramos são valores de suporte de *bootstraps* obtidos a partir de 1.000 pseudo-repetições. As análises foram conduzidas no Mega 6 (TAMURA *et al.*, 2013; TAMURA; NEI, 1993).

Todas as sequências obtidas no estudo para a região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA, e para a região D1/D2 do rDNA foram depositadas no NCBI/*GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). Os números de acesso são MN658747 a MN658756, OM287563 a OM287578; e OM439636, respectivamente.

A análise das sequências permitiu avaliar a variabilidade genética em uma cepa de *M. caribbica*, isolada de um mesmo paciente (caso clínico 9, Tabela 1). A distribuição dos haplótipos das cepas deste caso está descrita na **tabela 3**.

Tabela 3. Distribuição de haplótipos após análise de quatro sequências de ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA de cepas de *Meyrozyma caribbica* obtidas do caso clínico 9.

Cepa	Posição	
	132	446
<i>M. caribbica</i> CBS9966*	C	T
CFP00919	.	.
CFP00920	.	.
CFP00921	A	G
CFP00922	.	.

A, adenina; G, guanina; C, citosina; T, timina;

(.) nucleotídeo encontra-se na mesma posição da sequência

* cepa de referência.

5.6 Avaliação das metodologias de determinação da suscetibilidade

5.6.1 Método de diluição - Microdiluição em caldo

A técnica de Microdiluição em caldo foi realizada para determinar as CIM's para sete fármacos antifúngicos: anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, caspofungina e micafungina de acordo com o protocolo descrito no documento BrCAST (BrCAST, 2020), para todos as 27 cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* do estudo, provenientes de 19 pacientes. De acordo com o documento, as cepas de *C. dubliniensis* deste estudo foram suscetíveis a anfotericina b (CIM modal: 0,064 µg/ mL), fluconazol (CIM modal: 0,125 µg/ mL) e ao itraconazol (CIM modal: 0,008 µg/ mL), conforme a **Tabela 4**.

Tabela 4. Concentração Inibitória Mínima de 27 cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* aos fármacos antifúngicos com a técnica de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo BrCAST, isoladas em sangue periférico de 19 pacientes, no período de 01/01/2002 a 31/12/2017, no INCA-RJ.

Espécie (n)	CIM (µg/mL) – variação (Moda/ Mediana*)						
	ANF B	FLU	ITR	VOR	POS	CAS	MFG
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (5)	0,064-1 (0,125/ 0,125)	2-64 (8/ 6)	0,064-4 (1/ 0,25)	0,125-2 (0,25/ 0,25)	0,032-4 (0,125/ 0,125)	0,5 –4 (2/ 0,125)	2-4 (4/ 0,375)
<i>Meyerozyma caribbica</i> (5)	0,125-0,25 (0,25/ 0,125)	2-64 (32/ 6)	0,064-5 (0,25/ 0,25)	0,5-4 (1/ 0,25)	0,064-0,5 (0,25/ 0,125)	0,032 –2 (0,5/ 0,125)	1-2 (2/ 0,375)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (5)	0,064-0,125 (0,125/ 0,125)	4-8 (4/ 6)	0,064 (0,064/ 0,25)	0,125-0,25 (0,125/ 0,25)	0,5-1 (0,5/ 0,125)	0,016-0,032 (0,032/ 0,125)	0,016-0,125 (0,064/ 0,375)
<i>Candida haemulonii</i> var. <i>vulnera</i> (5)	0,25-1 (0,5; 1/ 0,125)	64 (64/ 6)	4 (4/ 0,25)	4 (4/ 0,25)	1-4 (4/ 0,125)	0,064-2 (0,064; 0,125/ 0,125)	0,25-0,5 (0,25/ 0,375)
<i>Candida dubliniensis</i> (2)	0,064 (0,064/ 0,125)	0,125 (0,125/ 6)	0,008 (0,008/ 0,25)	0,008 (0,008/ 0,25)	0,008 (0,008/ 0,125)	0,064 (0,064/ 0,125)	0,064-2 (0,064; 2/ 0,375)
<i>Candida intermedia</i> (1)	0,064 - / 0,125	0,5 - / 6	0,25 - / 0,25	0,016 - / 0,25	0,125 - / 0,125	0,064 - / 0,125	0,125 - / 0,375
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (2)	0,125-0,25 (0,125; 0,25/ 0,125)	0,25-0,5 (0,25; 0,5/ 6)	0,016-0,064 (0,016; 0,064/ 0,25)	0,008-0,016 (0,008; 0,016/ 0,25)	0,032-0,125 (0,032; 0,125/ 0,125)	0,016 0,016/ 0,125	0,125 0,125/ 0,375
<i>Kodamaea ohmeri</i> (1)	0,032 - / 0,125	4 - / 6	0,064 - / 0,25	0,032 - / 0,25	0,032 - / 0,125	0,25 - / 0,125	0,5 - / 0,375
<i>Yarrowia lipolytica</i> (1)	1 - / 0,125	4 - / 6	0,5 - / 0,25	2 - / 0,25	0,5 - / 0,125	1 - / 0,125	1 - / 0,375

EUCAST, *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*; INCA-RJ, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro; CIM, Concentração inibitória mínima; ANF B, anfotericina B; FLU, fluconazol; ITR, itraconazol; VOR, voriconazol; POS, posaconazol; CAS, caspofungina; MFG, micafungina.

*A mediana das CIMs foi calculada para o respectivo antifúngico em todas as cepas do estudo. Esta definição foi utilizada pois a maioria das espécies do estudo não apresenta ponto de corte epidemiológico (PCE) definido no EUCAST.

Entre as cepas do Complexo *M. guilliermondii* houve grande variação nos valores de CIM para os sete fármacos antifúngicos. De acordo com o documento, há evidências insuficientes de que este complexo de espécies seja um bom alvo para a terapia com os antifúngicos testados. É recomendado que a CIM seja reportada, porém sem classificação, sensível (S), intermediária (I) ou resistente (R), relatada. Anfotericina B demonstrou as menores CIM's para as leveduras incomuns deste estudo. As cepas do Complexo *M. guilliermondii* e *C. haemulonii* var. *vulnera* demonstraram menor suscetibilidade *in vitro* para os azólicos. Para caspofungina e micafungina, o Complexo *M. guilliermondii* foi menos suscetível.

A comparação da distribuição da CIM modal das cepas do presente estudo com a distribuição da CIM modal das cepas descritas no protocolo EUCAST (EUCAST, 2018) de acordo com o PCE, encontram-se descritas nas **tabelas 5, 6 e 7**.

Tabela 5. Comparação da distribuição da CIM modal de dez cepas do Complexo *M. guilliermondii*, isoladas em sangue periférico em pacientes do presente estudo, no período de 01/01/2002 a 31/12/2017 no INCA-RJ, com a distribuição da CIM modal das cepas descritas de acordo com o ponto de corte epidemiológico no protocolo EUCAST.

Antifúngico ^a	Origem das cepas	Nº de cepas com CIM (µg/mL) modal de:													
		0,016	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
ANF B	EUCAST	0	10	18	25	17	12	10	0	0	0	0	0	0	0
	INCA	-	-	1	4	3	-	1	1	-	-	-	-	-	-
FLU	EUCAST	0	0	0	0	1	2	4	21	44	29	7	8	1	1
	INCA	-	-	-	-	-	-	-	1	2	3		1	3	
ITR	EUCAST	4	1	4	20	40	24	1	0	0	0	1	0	0	0
	INCA	-	-	2	1	2	1	3	-	1	-	-	-	-	-
VOR	EUCAST	4	8	34	7	10	2	2	1	0	0	0	0	0	0
	INCA	-	-	-	1	2	2	1	2	1	1	-	-	-	-
POS	EUCAST	4	23	49	38	25	7	2	2	0	0	3	0	0	0
	INCA	-	1	1	1	5	1	-	-	1	-	-	-	-	-
CAS	EUCAST	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	INCA	-	1	-	-	2	3	-	3	1	-	-	-	-	-
MFG	EUCAST	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	INCA	-	-	-	1	-	-	2	5	2	-	-	-	-	-

CIM, Concentração inibitória mínima; EUCAST, *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*; INCA-RJ, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro; NA, Não avaliado; ANF B, anfotericina B; FLU, fluconazol; ITR, itraconazol; VOR, voriconazol; POS, posaconazol; CAS, caspofungina; MFG, micafungina; Em negrito, a CIM modal para cada fármaco antifúngico. ^apara cada antifúngico foi apresentado a distribuição das cepas do complexo *M. guilliermondii* de acordo com o ponto de corte epidemiológico do protocolo EUCAST e o mesmo foi feito para as cepas do estudo no inca. *Em negrito, representa a prevalência das cepas e a CIM modal correspondente.

Tabela 6. Comparação da distribuição da CIM modal de duas cepas de *Candida dubliniensis*, isoladas em sangue periférico em pacientes do presente estudo, no período de 01/01/2002 a 31/12/2017 no INCA-RJ, com a distribuição da CIM modal das cepas descritas de acordo com o ponto de corte epidemiológico no protocolo EUCAST.

Antifúngico ^a	Origem das cepas	Nº de cepas com CIM (µg/mL) modal de:								
		0,008	0,016	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	1	2
ANF B	EUCAST	0	14	17	7	2	2	1	0	0
	INCA	0	0	0	2	0	0	0	0	0
FLU	EUCAST	0	0	0	0	11	9	2	0	0
	INCA	0	0	0	0	2	0	0	0	0
ITRA	EUCAST	0	6	0	1	0	0	0	0	0
	INCA	2	0	0	0	0	0	0	0	0
VOR	EUCAST	0	59	38	2	1	0	1	0	0
	INCA	2	0	0	0	0	0	0	0	0
POS	EUCAST	0	52	17	5	0	0	0	0	0
	INCA	2	0	0	0	0	0	0	0	0
CAS	EUCAST	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	INCA	0	0	0	2	0	0	0	0	0
MFG	EUCAST	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	INCA	0	0	0	1	0	0	0	0	1

CIM, Concentração inibitória mínima; EUCAST, *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*; INCA-RJ, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro; NA, Não avaliado; ANF B, anfotericina B; FLU, fluconazol; ITR, itraconazol; VOR, voriconazol; POS, posaconazol; CAS, caspofungina; MFG, micafungina; Em negrito, a CIM modal para cada fármaco antifúngico. ^apara cada antifúngico foi apresentado a distribuição das cepas do complexo *M. guilliermondii* de acordo com o ponto de corte epidemiológico do protocolo EUCAST e o mesmo foi feito para as cepas do estudo no inca. *Em negrito, representa a prevalência das cepas e a CIM modal correspondente.

Tabela 7. Comparação da distribuição da CIM modal de duas cepas de *Kluyveromyces marxianus*, isoladas em sangue periférico em pacientes do presente estudo, no período de 01/01/2002 a 31/12/2017 no INCA-RJ, com a distribuição da CIM modal das cepas descritas de acordo com o ponto de corte epidemiológico no protocolo EUCAST.

Antifúngico ^a	Origem das cepas	Nº de cepas com CIM (µg/mL) modal de:											
		0,008	0,016	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16
ANF B	EUCAST	0	0	0	1	6	5	3	5	0	0	0	0
	INCA	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
FLU	EUCAST	0	0	0	1	4	9	5	4	5	1	0	1
	INCA	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
ITRA	EUCAST	0	5	5	4	1	3	1	0	0	0	0	0
	INCA	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
VOR	EUCAST	5	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	INCA	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
POS	EUCAST	1	9	6	9	1	1	1	0	0	0	0	0
	INCA	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
CAS	EUCAST	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	INCA	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MFG	EUCAST	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	INCA	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0

CIM, Concentração inibitória mínima; EUCAST, *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*; INCA-RJ, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro; NA, Não avaliado; ANF B, anfotericina B; FLU, fluconazol; ITR, itraconazol; VOR, voriconazol; POS, posaconazol; CAS, caspofungina; MFG, micafungina; Em negrito, a CIM modal para cada fármaco antifúngico. ^apara cada antifúngico foi apresentado a distribuição das cepas do complexo *M. guilliermondii* de acordo com o ponto de corte epidemiológico do protocolo EUCAST e o mesmo foi feito para as cepas do estudo no inca. *Em negrito, representa a prevalência das cepas e a CIM modal correspondente.

M. guilliermondii e *M. caribbica* apresentaram cepas non-WT para todos os antifúngicos, principalmente entre os azólicos, fluconazol e voriconazol, que apresentaram maior variação de CIM. Os valores de CIM e a classificação das cepas de acordo com os valores de corte epidemiológico propostos pelo EUCAST, encontram-se descritos na **Tabela 8**.

Tabela 8. Valores de CIM e classificação das cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* no INCA de acordo com os valores de ponto de corte epidemiológico propostos pelo EUCAST.

Espécies (n)	CIM (µg/ml)			PCEs (n)	
	Antifúngico	Varição	CIM ⁵⁰	WT	non-WT
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (5)	ANF	0.064 - 1	0.125	3	2
	FLU	2 - 64	8	2	3
	ITR	0.064 - 4	1	1	4
	VOR	0.125 - 2	0.25	0	5
	POS	0.032 - 4	0.125	1	4
	CAS	0.5 - 4	2	-	-
	MFG	2 - 4	4	-	-
<i>Meyerozyma caribbica</i> (5)	ANF	0.125 - 0.25	0.25	2	3
	FLU	8 - 64	32	0	5
	ITR	0.064 - 0.5	0.25	4	1
	VOR	0.5 - 4	1	0	5
	POS	0.064 - 0.5	0.25	1	4
	CAS	0.032 - 2	0.5	-	-
	MFG	1 - 2	2	-	-
<i>Candida dubliniensis</i> (2)	ANF	0,064	-	2	-
	FLU	0,125	-	2	-
	ITR	0,008	-	2	-
	VOR	0,008	-	2	-
	POS	0,008	-	2	-
	CAS	0,064	-	-	-
	MFG	0,064 - 2	-	-	-
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (2)	ANF	0,125 - 0,25	-	2	-
	FLU	0,25 - 0,5	-	2	-
	ITR	0,016 - 0,064	-	2	-
	VOR	0,008 - 0,016	-	2	-
	POS	0,032 - 0,125	-	2	-
	CAS	0,016	-	-	-
	MFG	0,125	-	-	-

CIM, Concentração Inibitória Mínima; PCE, Ponto de Corte Epidemiológico; CIM₅₀, CIM capaz de inibir o crescimento de 50% dos isolados; WT, wild type; non-WT, non-wild type; AMF, amphotericin B; FLU, fluconazol; ITRA, itraconazole; VOR, voriconazole; POS, posaconazole; CAS, caspofungin; MFG, micafungina.

5.6.2 Método de Difusão por Gradiente de Concentração de Antifúngico Pré-definido em fita - Etest®

Anfotericina B apresentou os melhores resultados de CIM para as cepas. *Candida haemulonii* var. *vulnera* apresentou grande variação de CIM para anfotericina (CIM modal de 2, ≥ 4 , 16), fluconazol e itraconazol. O método de difusão em fita com gradiente de concentração de antifúngicos (Etest®) foi realizado para as 27 cepas de leveduras incomuns contra seis antifúngicos: anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol, caspofungina e micafungina, conforme descrito na **Tabela 9**.

Tabela 9. Concentração inibitória mínima de 27 cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales*, causadoras de fungemia, aos fármacos antifúngicos de acordo com a técnica de difusão em fita com gradiente antimicrobiano (Etest®), isoladas em sangue periférico de 19 pacientes, no período de 01/01/2002 a 31/12/2017, no INCA-RJ.

Espécies (n)	CIM (µg/mL) - variação (Moda)					
	ANF B	FLU	ITR	VOR	CAS	MFG
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (5)	0,016-0,19 (0,125)	0,5-1,5 (0,5;1,5)	0,032-0,5 (0,032;0,5)	0,016-0,032 (0,032)	0,19-0,5 (0,25)	0,25-0,38 (0,38)
<i>Meyerozyma caribbica</i> (5)	0,125-0,38 (0,38)	16-≥64 (≥64)	0,5-1,5 (1,5)	0,5-0,75 (0,5)	0,75-2 (2)	0,5 (0,5)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (5)	0,032-0,19 (0,032, 0,19)	1-1,5 (1,5)	0,75-1 (0,75)	0,064-0,125 (0,064, 0,125)	0,064-0,25 (0,064, 0,125)	0,047-0,064 (0,047)
<i>Candida haemulonii</i> var. <i>vulnera</i> (5)	2-16 (2; 6)	3-≥256 (8; ≥256)	0,047-≥32 (0,25; ≥32)	0,032-0,19 (0,094; 0,19)	0,064-0,5 (0,064, 0,125)	0,047-0,064 (0,047)
<i>Candida dubliniensis</i> (2)	0,004-0,008 -	0,125-0,38 -	0,006-0,032 -	0,004-0,012 -	0,006-0,016 -	0,006-0,016 -
<i>Candida intermedia</i> (1)	0,125 -	0,75 -	0,125 -	0,006 -	3 -	0,047 -
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (2)	0,75-1,5 -	0,19 -	0,064-0,125 -	0,004-0,008 -	0,125-0,5 -	0,094 (0,094)
<i>Kodamaea ohmeri</i> (1)	0,023 -	3 -	1 -	0,047 -	0,19 -	0,032 -
<i>Yarrowia lipolytica</i> (1)	0,38 -	2 -	0,38 -	0,004 -	4 -	1 -

INCA-RJ, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro; CIM, Concentração inibitória mínima; ANF B, anfotericina B; FLU, fluconazol; ITR, itraconazol; VOR, voriconazol; POS, posaconazol; CAS, caspofungina; MFG, micafungina.

5.6.3 Método automatizado - VITEK® 2

O teste de suscetibilidade automatizado foi realizado no VITEK® 2 com o cartão VITEK® 2 AST para as 27 cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* contra cinco antifúngicos: anfotericina B, fluconazol, voriconazol, caspofungina e micafungina. *Meyerozyma caribbica* apresentou MICs elevados para fluconazol e voriconazol. *Candida haemulonii* var. *vulnera*, apresentou MICs elevados para anfotericina B, fluconazol e voriconazol. Os resultados estão descritos na **Tabela 10**.

Tabela 10. Concentração Inibitória Mínima das 27 cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* aos fármacos antifúngicos de acordo com o teste de suscetibilidade automatizado realizado com o VITEK® 2 AST, isoladas em sangue periférico dos 19 pacientes, no período de 01/01/2002 a 31/12/2017 no INCA-RJ.

Espécies (n)	CIM (µg/mL) - variação (Moda)				
	ANF B	FLU	VOR	CAS	MFG
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (5)	≤ 0,25 - 0,5 (≤ 0,25)	≤ 0,5 - 2 (2)	≤ 0,12 (≤ 0,12)	≤ 0,12 - 0,5 (≤ 0,12; 0,25)	0,12 - 0,5 (0,5)
<i>Meyerozyma caribbica</i> (5)	≤ 0,25 - 0,5 (≤ 0,25)	2 - 16 (2)	≤ 0,12 - 4 (≤ 0,12; 4)	≤ 0,12 - 1 (0,25)	≤ 0,06 - 0,5 (0,5)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (5)	≤ 0,25 (≤ 0,25)	2 - 4 (2)	≤ 0,12 - 0,25 (≤ 0,12)	≤ 0,12 (≤ 0,12)	≤ 0,06 (≤ 0,06)
<i>Candida haemulonii</i> var <i>vulnera</i> (5)	1 - ≥ 16 (1; 2; 4; 8; ≥ 16)	2 - 8 (4; 8)	≤ 0,12 - ≥ 8 (≤ 0,12)	0,25 - 0,5 (0,25)	0,12 (0,12)
<i>Candida dubliniensis</i> (2)	≤ 0,25 -	1 -	≤ 0,12 -	≤ 0,12 -	≤ 0,06 -
<i>Candida intermedia</i> (1)	≤ 0,25 -	1 -	≤ 0,12 -	≤ 0,12 -	≤ 0,06 -
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (2)	≤ 0,25 - 1 -	1 -	≤ 0,12 -	≤ 0,12 -	0,12 - 0,25 -
<i>Kodamaea ohmeri</i> (1)	≤ 0,25 -	4 -	≤ 0,12 -	≤ 0,12 -	≤ 0,06 -
<i>Yarrowia lipolytica</i> (1)	≤ 0,25 -	2 -	≤ 0,12 -	0,25 -	0,25 -

INCA-RJ, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro; CIM, Concentração inibitória mínima; ANF B, anfotericina B; FLU, fluconazol; VOR, voriconazol; CAS, caspofungina; MFG, micafungina.

A concordância categórica, considerada quando as cepas estão dentro da mesma categoria interpretativa, foi calculada para 14 cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* pelos métodos Etest® e VITEK® 2 AST em comparação com o protocolo de microdiluição BrCAST. Os melhores resultados para Etest® foram observados para *C. dubliniensis* com 100% de concordância para todos os fármacos antifúngicos. Equinocandinas não foram avaliadas por não terem PCE pelo BrCAST. Os resultados estão descritos na **Tabela 11**.

Tabela 11. Porcentagem de concordância categórica pelos métodos Etest® e VITEK® 2 AST em comparação com o protocolo de microdiluição BrCAST de 14 cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* isoladas em sangue periférico de 10 pacientes, no período de 01/01/2002 a 31/12/2017 no INCA-RJ.

Espécies (n)	Método	CC (%)			
		ANF B	FLU	ITRA	VOR
<i>M. guilliermondii</i> (5)	Etest®	80	60	60	100
	VITEK® 2 AST	100	80	NR	100
<i>M. caribbica</i> (5)	Etest®	100	20	20	0
	VITEK® 2 AST	100	100	NR	40
<i>C. dubliniensis</i> (2)	Etest®	100	100	100	100
	VITEK® 2 AST	100	0	NR	100
<i>K. marxianus</i> (2)	Etest®	0	100	100	100
	VITEK® 2 AST	50	100	NR	100

CC, Concordância categórica; ANF B, anfotericina B; FLU, fluconazol; ITRA, itraconazol; VOR, voriconazol; POS, posaconazol; CAS, caspofungina; MFG, micafungina; NR, não realizado; INCA-RJ, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro.

A concordância essencial foi calculada para as 27 cepas de cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* pelos métodos Etest® e VITEK® 2 AST em comparação com o protocolo de microdiluição BrCAST. Houve grande variação entre as espécies para todos os fármacos antifúngicos, principalmente para *C. haemulonii* var. *vulnera* frente a anfotericina b e azólicos. A concordância essencial está descrita na **Tabela 12**.

Tabela 12. Porcentagem de concordância essencial pelos métodos Etest® e VITEK® 2 AST em comparação com o protocolo de microdiluição BrCAST das 27 cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* isoladas em sangue periférico de 19 pacientes, no período de 01/01/2002 a 31/12/2017, no INCA-RJ.

Espécies (n)	Método	CE (%)					
		ANF B	FLU	ITR	VOR	CAS	MFG
<i>M. guilliermondii</i> (5)	Etest®	80	40	40	20	40	40
	VITEK® 2 AST	100	60	NR	80	40	20
<i>M. caribbica</i> (5)	Etest®	100	80	20	80	60	100
	VITEK® 2 AST	100	60	NR	100	60	60
<i>W. anomalus</i> (5)	Etest®	100	80	80	100	80	100
	VITEK® 2 AST	100	100	NR	100	100	100
<i>C. haemulonii</i> var. <i>vulnera</i> (5)	Etest®	40	40	0	0	80	80
	VITEK® 2 AST	60	0	NR	40	80	100
<i>C. dubliniensis</i> (2)	Etest®	100	100	100	100	100	50
	VITEK® 2 AST	100	0	NR	100	100	50
<i>C. intermedia</i> (1)	Etest®	100	100	100	100	0	100
	VITEK® 2 AST	100	100	NR	100	0	0
<i>K. marxianus</i> (2)	Etest®	50	100	50	100	0	100
	VITEK® 2 AST	100	100	NR	100	100	100
<i>Kodamaea ohmeri</i> (1)	Etest®	100	100	0	100	100	0
	VITEK® 2 AST	100	100	NR	100	100	100
<i>Yarrowia lipolytica</i> (1)	Etest®	100	100	100	0	100	100
	VITEK® 2 AST	100	100	NR	0	100	100

INCA-RJ, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro; CC, Concordância categórica; ANF B, anfotericina B; FLU, fluconazol; ITR, itraconazol; VOR, voriconazol; POS, posaconazol; CAS, caspofungina; MFG, micafungina; NR, não realizado; NA, não avaliado.

5.7 Avaliação de fenótipos associados à virulência

5.7.1 Fatores de Virulência

A produção de enzimas é descrita como um importante fator de virulência de leveduras da ordem *Saccharomycetales*. Assim, as atividades hemolítica, proteolítica, fosfolipídica, fitásica e esterásica de todas as cepas de leveduras incomuns deste estudo foram avaliadas. Nenhuma espécie foi capaz de produzir fosfolipase. A atividade enzimática foi determinada pelo valor Pz apresentado para as cepas incluídas nesse estudo na **Tabela 13**.

Tabela 13. Produção enzimática das 27 cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* isoladas em sangue periférico dos 19 pacientes, no período de 01/01/2002 a 31/12/2017 no INCA-RJ.

Espécie (n)	Fator de Virulência			
	Atividade hemolítica	Protease	Fitase	Esterase
Complexo <i>M. guilliermondii</i> (10)	0,37 – 0,73	0,63 - 1	0,54 - 1	0,44 - 1
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (5)	0,65 – 0,85	0,585 - 1	0,45 – 0,605	0,435 - 1
<i>Candida haemulonii</i> var. <i>vulnera</i> (5)	0,64 – 0,77	0,307 - 1	0,55 - 1	0,53 - 1
<i>Candida dubliniensis</i> (2)	0,61 - 1	0,715 - 1	0,735 – 0,74	1
<i>Candida intermedia</i> (1)	0,67	1	1	0,365
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (2)	0,61 – 0,77	0,393 - 1	1	1
<i>Kodamaea ohmeri</i> (1)	1	1	0,64	1
<i>Yarrowia lipolytica</i> (1)	0,71	0,68	0,48	1

INCA-RJ, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro;

Pz = 1, não produtor; Pz = 0,700 – 0,999, fraco; Pz = 0,400 – 0,699, bom produtor; Pz = 0,100 – 0,399, excelente produtor.

Todos os grupos de leveduras incomuns apresentaram atividade hemolítica em meio agar sangue de carneiro, com exceção de *K. ohmeri*. Para esta espécie só foi possível detectar atividade de fitase.

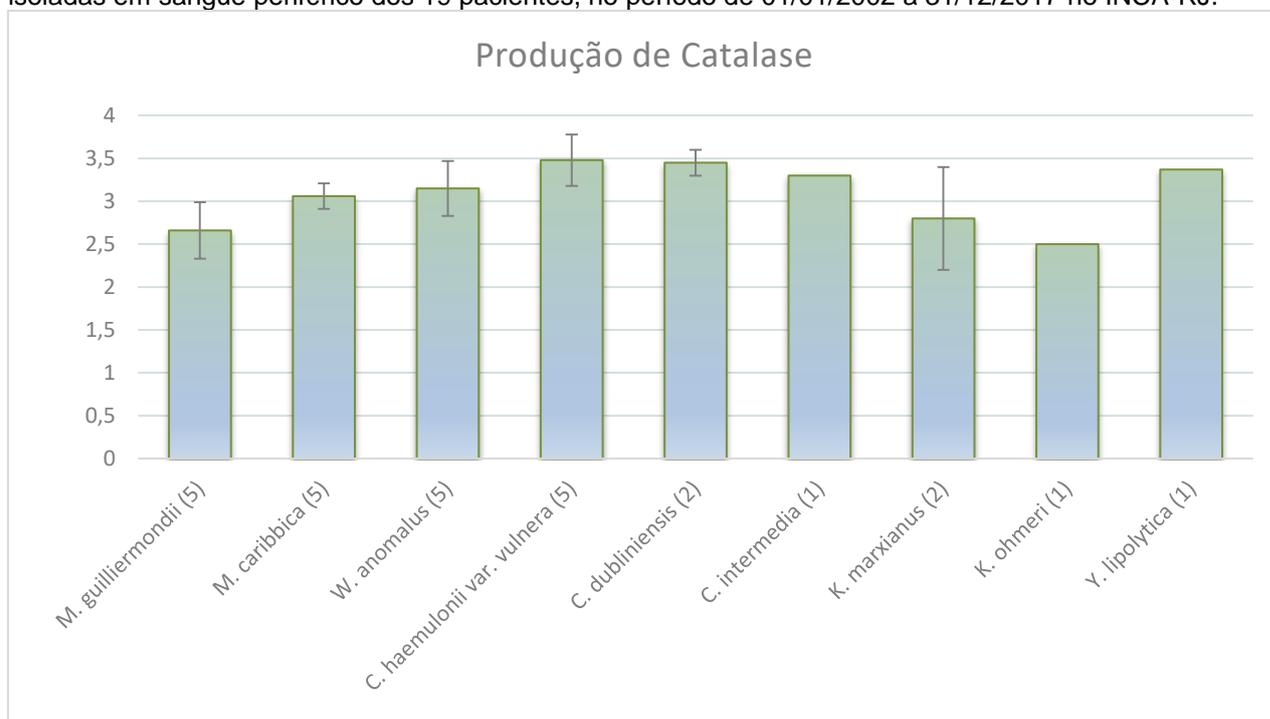
Identificamos uma grande variação na produção de aspártico protease, inclusive com valores negativos, para as cepas de *C. haemulonii* var. *vulnera* e *K. marxianus*, $Pz = 0,307 - 1$ e $Pz = 0,393 - 1$, respectivamente. Apesar desta variação, algumas cepas destas espécies foram classificadas como bons produtores.

O grupo *W. anomalous* (n: 3) e a cepa de *Y. lipolytica* foram bons produtores de fitase, $Pz = 0,45 - 0,57$ e $Pz = 0,48$, respectivamente.

Candida intermedia foi excelente produtor de esterase (PZ = 0,365).

A atividade de catalase foi presumida pela resistência ao peróxido de hidrogênio em meio sólido. Quanto menor o valor do halo de inibição (mm), maior seria a produção de catalase, sendo então os valores inversamente proporcionais. Desta forma podemos observar que *K. ohmeri* foi a espécie com maior produção presumida de catalase. Pelo *n* pequeno em alguns grupos, não foi possível realizar cálculos estatísticos para comparar os resultados das diferentes espécies (**Gráfico 1**).

Gráfico 1. Produção de Catalase de 27 cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* isoladas em sangue periférico dos 19 pacientes, no período de 01/01/2002 a 31/12/2017 no INCA-RJ.



INCA-RJ, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro.

A fim de correlacionar os resultados das CIMs do EUCAST com os valores de Pz encontrados nos testes das enzimas hidrolíticas foi realizado o teste de correlação de Spearman. Os resultados encontram-se descritos na **Tabela 14**.

Tabela 14. Associação entre os fenótipos fúngicos relacionados a virulência das cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* e as CIMs dos fármacos antifúngicos testados no protocolo EUCAST.

Antifúngico	Enzimas hidrolíticas				
	P* (r _s)				
	Protease	Fitase	Esterase	Hemolisina	Catalase
ANF	0,56 (-0,12)	0,63 (0,10)	0,96 (-0,01)	0,16 (-0,28)	0,41 (0,20)
FLU	0,75 (-0,06)	0,88 (0,03)	0,56 (-0,11)	0,38 (-0,17)	0,62 (0,10)
ITR	0,86 (0,03)	0,59 (0,11)	0,08 (-0,34)	0,12 (-0,31)	0,96 (0,01)
VOR	0,69 (-0,08)	0,77 (-0,06)	0,65 (-0,09)	0,37 (-0,18)	0,45 (0,15)
POS	0,37 (-0,18)	0,13 (-0,30)	0,63 (-0,10)	0,77 (0,06)	0,18 (0,26)
CAS	0,15 (0,29)	0,27 (0,22)	0,49 (-0,14)	0,02 (-0,46)*	0,10 (-0,33)
MFG	0,06 (0,36)	0,005 (0,52)*	0,55 (-0,12)	0,002 (-0,66)*	0,08 (-0,34)

CIM, Concentração Inibitória Mínima; EUCAST, European Committee on antimicrobial susceptibility Testing; P*, p valor; R_s, Coeficiente de correlação de Spearman; ANF, anfotericina B; FLU, fluconazol; ITR, itraconazol; VOR, voriconazol; POS, posaconazol; CAS, caspofungina; MFG, micafungina.

*em negrito, valores significativos.

Foi verificada associação entre as CIMs de caspofungina e micafungina com a produção de hemolisina. Quanto maior a CIM, maior a produção de hemolisina. E ainda, a associação entre CIMs de micafungina com a produção de fitase, com valores inversamente proporcionais, quanto maior a CIM, menor produção de fitase.

5.8 Descrição das características clínicas, microbiológicas e do desfecho

Dentre os 19 pacientes com fungemia, as causadas por *M. caribbica*, *M. guilliermondii* e *W. anomalus* ocorreram nos pacientes com neutropenia; as causadas por *M. guilliermondii*, *M. caribbica*, *C. haemulonii* var. *vulnera*, *K. marxianus*, *W. anomalus* e *K. ohmeri* foram detectadas nos pacientes com uso prévio de antifúngico e a causada por *W. anomalus* ocorreu em paciente sem proposta curativa para o câncer. A necessidade de terapia intensiva para o tratamento da fungemia ocorreu em sete pacientes, especificamente naqueles com fungemias causadas pelas espécies *C. dubliniensis*, *W. anomalus*, *M. caribbica*, *K. marxianus*, *M. guilliermondii* e *K. ohmeri*.

Dentre os nove óbitos em 30 dias após o diagnóstico da fungemia, 15,79% (n: 03) ocorreram nos pacientes com ICS por *C. dubliniensis* e *C. intermedia*; 10,5% (n: 02) nos pacientes com ICS por *M. guilliermondii* e *M. caribbica*; e 21% (n: 04) com infecções causadas por diferentes espécies de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales*; 55% (n: 5) dos óbitos ocorreram em 7 dias após a data da fungemia. A neutropenia esteve presente em três pacientes que evoluíram para o óbito, especificamente naqueles ocorridos nos pacientes com fungemia por *M. caribbica*, *W. anomalus* e *M. guilliermondii*. A alta produção de hemolisina esteve presente em dois pacientes que sobreviveram em até 30 dias após o episódio da ICS por *C. guilliermondii*. Três pacientes apresentaram alta produção de protease, todos tiveram alta em 30 dias após o diagnóstico da ICS por *C. haemulonii* var. *vulnera* e *K. marxianus*.

Dentre os pacientes que evoluíram para o óbito em até sete dias após os diagnósticos da fungemia por leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales*: i) o paciente 2 tinha tumor de órgão sólido em controle; evoluiu com óbito no dia do diagnóstico da fungemia por *C. dubliniensis* com moderada produção de hemolisina. Devido ao óbito precoce não houve oportunidade de tratamento com antifúngicos; ii) Os pacientes 9 e 13 morreram em até 3 dias após o diagnóstico de ICS e apresentavam neutropenia associada a neoplasia hematológica no momento do diagnóstico da fungemia: a) O paciente 9 recebia profilaxia antifúngica com FLU e ANFO B; Foi tratado com VCZ e MFG. As quatro cepas de *M. caribbica* detectados nesse paciente eram produtores moderados de hemolisina e um deles (CFP00921) era produtor moderado de esterase. As cepas eram *non-WT* para VCZ (4 µg/ml), tinham CIM elevada para MFG (2 µg/ml) e FLU (8–64 µg/ml), e CIMs baixos para ANF (0,125–0,25 µg/ml); b) O paciente 13, com fungemia por *M. guilliermondii* com produção moderada de protease aspártica, hemolisina e esterase, foi tratado com ANF (0,064 µg/ml). Esta cepa era do tipo selvagem para ANF.

Dentre os pacientes que sobreviveram, o paciente 16 apresentava neutropenia profunda associada a doença de base hematológica. Ele não havia usado antifúngicos anteriormente, e foi tratado com ANF, antifúngico ao qual a cepa foi descrita como WT. A correlação das características clínicas, microbiológicas e do desfecho clínico dos pacientes com fungemia por leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* encontra-se descrita no **Quadro 4**.

Quadro 4. Correlação entre os dados clínicos e a categorização do fenótipo de virulência, uso prévio de antifúngicos, tratamento e a suscetibilidade antifúngica, no desfecho dos 19 casos de infecção da corrente sanguínea por leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* no INCA no período de 01/01/2002 a 31/12/2017.

Dados clínicos						Fenótipo de virulência				Uso de antifúngico/PCE ^a			Desfecho (Tempo até o xóbito)
ID	Cepa	Espécies	Status do câncer	Neutropenia ^b (número de neutrófilos)	Necessidade De UTI	Hemolisina	Esterase	Fitase	Protease	Uso prévio	Tratamento da ICS	PCE ^c	
1	CFP00964	<i>Candida dubliniensis</i>	Em tratamento	Não (24.566)	Sim	baixo	ND	baixo	Baixo	Não	ANI ^d	-	Óbito (Quatro dias)
2	CFP00965	<i>Candida dubliniensis</i>	Em controle	Não (9.756)	Sim	moderado	ND	baixo	ND	Não	Não tratou	-	Óbito (Zero dia)
3	CFP00915	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Em tratamento	Não (6.954)	Não	moderado	moderado	ND ^e	ND	ANI/ VOR	ANI ^d	-	Alta hospitalar
	CFP00916	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>				moderado	ND	ND	ND			-	
4	CFP00917	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Em tratamento	Não (11.691)	Não	alto	moderado	ND	ND	Não	FLU	Non-WT	Óbito (106 dias)
5	CFP00918	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Em tratamento	Não (8.989)	Não	alto	ND	ND	ND	Não	FLU	Non-WT	Alta hospitalar
6	CFP00966	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Em tratamento	SI	Não	baixo	moderado	moderado	ND	Não	FLU	-	Alta hospitalar
7	CFP00967	<i>Candida haemulonii</i> var. <i>vulnera</i>	Em tratamento	Não (2.280)	Não	moderado	moderado	ND	ND	ANI	ANI/ VOR	-	Alta hospitalar
	CFP00968	<i>Candida haemulonii</i> var. <i>vulnera</i>				moderado	moderado	moderado	ND			-	

8	CFP00969	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Sem proposta curativa	Não (23.670)	Sim	baixo	ND	moderado	moderado	Não	MICA	-	Óbito (Nove dias)
	CFP00970	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>				baixo	ND	moderado	ND			-	
9	CFP00919	<i>Meyerozyma caribbica</i>	Em tratamento	Sim (295)	Sim	moderado	ND	ND	ND	FLU/ ANFB	VOR/ MICA ^d	Non-WT/ -	Óbito (Um dia)
	CFP00920	<i>Meyerozyma caribbica</i>				moderado	ND	ND	ND			Non-WT/ -	
	CFP00921	<i>Meyerozyma caribbica</i>				moderado	moderado	ND	ND			Non-WT/ -	
	CFP00922	<i>Meyerozyma caribbica</i>				moderado	ND	ND	ND			Non-WT/ -	
10	CFP00971	<i>Kluyveromyces marxianus^c</i>	Em tratamento	Não (14.248)	Sim	moderado	ND	ND	alto	MICA	MICA ^d	-	Alta hospitalar
11	CFP00972	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Em tratamento	Sim (47)	Não	baixo	ND	moderado	baixo	VOR	VOR/ MICA/ ANFB	-	Óbito (18 dias)
	CFP00973	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>				baixo	ND	moderado	moderado			-	
12	CFP00974	<i>Candida haemulonii</i> var <i>vulnera</i>	Em tratamento	Não (6.920)	Não	baixo	ND	baixo	alto	Não	FLU/ CASPO	-	Alta hospitalar
	CFP00975	<i>Candida haemulonii</i> var <i>vulnera</i>				baixo	moderado	baixo	moderado			-	
13	CFP00923	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Em tratamento	Sim (236)	Sim	médio	moderado	ND	moderado	FLU/ ANI/ MICA	ANF B	WT	Óbito (Três dias)
14	CFP00977	<i>Canida haemulonii</i> var <i>vulnera</i>	Em tratamento	Não (12.877)	Não	baixo	ND	moderado	alto	Não	CASPO	-	Alta hospitalar
15	CFP00978	<i>Kodamaea ohmeri^f</i>	Em tratamento	Não (20.358)	Sim	ND	ND	moderado	ND	FLU	MICA	-	Óbito (Seis dias)
16	CFP00924	<i>Meyerozyma caribbica</i>	Em tratamento	Sim (Zero)	Não	baixo	ND	moderado	ND	Não	ANFB/ MICA ^d	WT/ -	Alta hospitalar

17	CFP00979	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Em tratamento	Não (4.045)	Não	baixo	ND	moderado	moderado	Não	Sem informação	-	Alta hospitalar
18	CFP00982	<i>Candida intermedia</i>	Em tratamento	Não (8.219)	Não	moderado	alto	ND	ND	Não	Sem informação	-	Óbito (Dez dias)
19	CFP00983	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Em tratamento	Não (9.044)	Não	baixo	ND	ND	ND	Não	FLU	WT	Óbito (13 dias)

^a Classificação das cepas de *C. dubliniensis*, *M. guilliermondii*, *M. caribbica* e *K. marxianus* de acordo com o PCE dos fármacos antifúngicos utilizados no tratamento das infecções de corrente sanguínea dos casos.

^b Neutropenia < 500 células/mm³; Neutropenia profunda <100 células/mm³.

^c PCE sem definição no EUCAST.

PCE, ponto de corte epidemiológico; ND, não detectado; ANI, anidulafungina; VOR, voriconazol; FLU, fluconazol; ANF, anfotericina; MFG, micafungina; WT, wild type; Non-WT, non wild type.

5.9 Análise univariada das características epidemiológicas, clínicas e microbiológicas das variáveis potencialmente associadas ao óbito em 30 dias após o diagnóstico de fungemia por cândidas-não-albicans incomuns

A idade mediana dos pacientes que foram a óbito foi 55,5 anos e dentre os pacientes que não morreram foi 29,5 anos.

Após a análise univariada, a variável necessidade de cuidados intensivos para o tratamento da ICS esteve associada ao óbito em 30 dias (OR: 27,00; IC95%: 1,98-368,40; P: 0,01).

A PCR foi 13,01 mg/dl dentre os pacientes que foram a óbito e 3,39 dentre os pacientes que viveram, conforme detalhado na **Tabela 15**.

Tabela 15. Análise univariada entre as características microbiológicas das cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* e os dados clínicos dos pacientes com fungemia no INCA-RJ.

Variável, n (%)	Total* n: 18	Óbito 30 dias n: 08 (44,4)	Não óbito n: 10 (55,6)	OR	IC 95%	Valor de P
Idade, mediana (variação)	35 (18-69)	55,5 (19-69)	29,5 (18 - 60)			0,07
Genero masculino	11 (61,1)	05 (62,5)	06 (60)	1,11	0,16 - 7,51	0,99
Neoplasia hematológica ^a	12 (66,7)	06 (75)	06 (60)	2,00	0,26 - 15,38	0,64
Estadiamento da neoplasia						
Em tratamento ^b	17 (94,4)	07 (87,5)	10 (100)	0,00	indefinido	0,44
Terapias imunossupressoras						
Corticóide, nos 30 dias anteriores	11 (61,1)	03 (37,5)	08 (80)	0,15	0,02 - 1,23	0,14
Quimioterapia, nos 30 dias anteriores	08 (47,1)	02 (25,0)	06 (60)	0,16	0,02 - 1,38	0,15
Neutropenia febril						
Neutropenia grave (neutrófilos < 500 cel/mm ³)	04 (23,5)	03 (37,5)	01 (10)	4,80	0,38 - 59,89	0,29
Neutropenia profunda (neutrófilos < 100 cel/mm ³)	02 (11,8)	01 (50)	01 (10)	1,14	0,06 - 21,87	0,99
Gravidade da ICS						
Necessidade de cuidados intensivos devido a ICS	07 (38,9)	06 (85,7)	01 (10)	27,00	1,98 - 368,40	0,01**
PCR, mediana (Variação) mg/dL	12,72 (0,50 - 26,57)	13,01 (0,5 - 26,57)	3,39 (1,13 - 21,99)			0,67
ICS primária^c	14 (77,8)	05 (62,5)	09 (90)	0,18	0,015-2,29	0,27
Terapia antifúngica	15 (93,75)	6 (75)	09 (90)	0,00	indefinido	0,44
Anfotericina B	03 (16,7)	02 (25,0)	01 (10)	3,00	0,22 - 40,9	0,56
Azólicos	06 (33,3)	02 (25,0)	04 (40)	0,50	0,06 - 3,84	0,63
Equinocandinas	10 (55,6)	04 (50,0)	06 (60)	0,66	0,10 - 4,35	0,99
Tratamento adequado ^d	9 (75,0)	04 (50,0)	05 (50)	1,60	0,10 - 24,70	0,99
Fenótipos de virulência						
Hemolisina alta ^e	02 (11,1)	0	02 (100)	0,00	indefinido	0,48
Produção de esterase	05 (27,8)	02 (25,0)	03 (30)	0,78	0,09 - 6,32	0,99

Produção de protease	07 (38,9)	03 (37,5)	04 (40)	0,90	0,13 - 6,08	0,99
Produção de fitase	10 (55,6)	04 (50,0)	06 (60)	0,67	0,10 - 4,35	0,99
Alta produção de catalase	11 (61,1)	05 (62,5)	06 (60)	1,11	0,16 - 7,50	0,99
Erro de identificação da espécie de levedura	04 (22,2)	01 (12,5)	03 (30)	0,33	0,02-4,04	0,58

^a em comparação ao tumor de órgão sólido.

^b em comparação a neoplasia em controle.

^c em comparação a ICS primária indeterminada.

^d pacientes tratados com antifúngico com a concentração inibitória mínima (CIM) menor do que a mediana das CIMs calculada para o respectivo antifúngico.

^e feita a comparação da alta e comprada a média e a baixa, que teve o menor P valor.

*Foi excluído da análise um paciente sem possibilidade de cura do câncer.

**valores significativos em negrito.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, foram avaliados os aspectos clínicos e microbiológicos das ICS por leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* causadoras de fungemia em pacientes oncológicos, de um centro de referência em oncologia no Rio de Janeiro, Brasil. As espécies encontradas ao longo dos 15 anos do estudo foram *M. guilliermondii*, *M. caribbica*, *C. haemulonii* var. *vulnera*, *W. anomalus*, *K. marxianus*, *C. dubliniensis*, *K. ohmeri*, *Y. lipolytica* e *C. intermedia*. Foram detectados erros de identificação das espécies quando comparada técnica molecular com o sistema automatizado VITEK® 2. Dos casos de ICS por leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* 68,4% ocorreu entre pacientes com neoplasia hematológica, 89,6% estava em tratamento da doença de base e 57,9% usou corticosteroides nos 30 dias anteriores ao diagnóstico da fungemia. Contudo, surpreendentemente, a presença de neutropenia não foi predominante entre os casos. Na maioria dos casos o foco de origem da infecção foi indeterminado. A mortalidade foi elevada e o único fator que esteve potencialmente associado ao óbito foi a gravidade da ICS.

As espécies de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* detectadas no presente estudo foram semelhantes as relatadas em outros estudos como agentes emergentes de infecção fúngica invasiva em pacientes com câncer (LORTHOLARY *et al.*, 2017; ZAMBRANO *et al.*, 2017; BRETAGNE *et al.*, 2017; JUNG *et al.*, 2015; SAVINI *et al.*, 2011). Foi necessário rever a taxonomia das cepas de leveduras incomuns autenticadas neste estudo por método molecular. Apesar deste não ser um dos objetivos principais do estudo, isto foi necessário, uma vez que a nomenclatura das espécies identificadas no presente estudo estarem em atualização. Todas as espécies estudadas são da ordem *Saccharomycetales*. Esta ordem inclui 13 famílias, que tem como característica de suas leveduras a reprodução por brotamento (KURTZMAN; FELL, 1998). Das famílias identificadas no presente estudo, apenas 3 estão incluídas no gênero *Candida*: *Candida dubliniensis*, *Candida haemulonii* var. *vulnera* e *Candida intermedia*. Esta última encontra-se aguardando nova atualização taxonômica para ser posicionada em um gênero mais adequado. Outras leveduras estão aguardando para sair do gênero *Candida* (SCHOCH *et al.*, 2020). Este é um assunto que não está encerrado na comunidade científica. Após a implementação da biologia molecular, muitas espécies semelhantes filogeneticamente passaram por mudanças na taxonomia. Na tentativa de obter uma identificação precisa

das espécies previamente identificadas pelo Sistema comercial VITEK[®] 2, as cepas deste estudo foram autenticadas por meio de marcadores de DNA propostos pelo *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL) e pela *International Society of Human and Animal Mycology* (ISHAM). Esta é uma forma de obter a identificação precisa das espécies com base em uma avaliação comparativa de sequências taxonomicamente relevantes que já encontraram ampla aplicação na biologia (STIELOW *et al.*, 2015). A região ITS foi formalmente proposta como um marcador primário universal de código de DNA fúngico. Por ser uma região com maior probabilidade de sucesso na identificação de uma maior variedade de fungos, com diferenças de código de barras de DNA mais claramente definidas entre as variações inter e intraespecíficas (SCHOCH *et al.*, 2012). Em nosso estudo a região ITS identificou as espécies do Complexo *M. guilliermondii* e as demais leveduras, com exceção da *Y. lipolytica*, que só foi identificada pela região D1/D2. A região ITS é a primeira e melhor opção para identificação molecular de fungos. Porém como nenhuma região é totalmente discriminatória para todos os fungos, em alguns casos é necessário utilizar outras regiões alvo, como a região D1/D2 ou o gene *ACT1*. Adicionalmente, dentro dos complexos *M. guilliermondii* e *C. famata* existem espécies crípticas que necessitam de análises moleculares adicionais para melhor discriminação específica (TAVERNA *et al.*, 2019).

A identificação de algumas espécies foi distinta com análise molecular pelo sequenciamento da região ITS e com o sistema de identificação VITEK[®] 2. As cepas identificadas previamente pelo VITEK[®] 2 como *C. famata* (CFP00917, CFP00918), *C. pelliculosa* (CFP00924) e *C. lusitaniae* (CFP00982) foram reidentificados como *M. guilliermondii*, *M. caribbica* e *C. intermedia*, respectivamente. Algumas cepas de *C. famata* (66,7%) identificadas previamente pelo VITEK[®] 2 foram autenticadas como espécies do Complexo *M. guilliermondii*. Foi observado que o Sistema de Identificação de leveduras VITEK[®] 2 apresentou baixa discriminação para diferenciação destes complexos de espécies. Para as demais espécies autenticadas em nosso estudo houve concordância entre a metodologia molecular e o sistema automatizado de identificação. Porém é necessário investigar um número maior de cepas. Esta foi uma limitação de nosso estudo. Dados similares foram descritos em recente estudo de reidentificação de cepas de *C. guilliermondii* e *C. famata* na Argentina, onde 53% das cepas de *C. guilliermondii* foram identificados erroneamente como *C. famata* pelo método de identificação convencional (TAVERNA *et al.*, 2019). Essa diferença na identificação de espécies foi descrita

previamente. Semelhantemente, em um estudo realizado na Coréia do Sul, 28 cepas de *C. famata* previamente identificadas pelo sistema VITEK® 2 foram reidentificadas molecularmente como *C. guilliermondii*. Assim, os autores concluíram que *C. famata* é uma causa rara de fungemia, sendo provável que isso ocorra quando espécies diferentes têm alta similaridade em reações bioquímicas (KIM *et al.*, 2014). Similarmente, em estudos recentes, métodos fenotípicos identificaram inicialmente cepas de levedura como *C. famata*. No entanto, após análises moleculares, essas cepas foram identificados como *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. palmioleophila* (KIM *et al.*, 2016; MELETIADIS *et al.*, 2011). A identificação correta das espécies de levedura é extremamente relevante para que condutas terapêuticas sejam corretamente feitas. Especificamente a identificação correta de *C. famata*, atualmente *Debaryomyces hansenii*, e do Complexo *M. guilliermondii* é importante, visto que as diferenças na suscetibilidade antifúngica, especialmente com anfotericina B e fluconazol, são significativas (MARCOS-ZAMBRANO *et al.*, 2017). Assim, trata-se de um erro de identificação que pode impactar diretamente na terapêutica das ICSs por leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales*. Contudo, no presente estudo, o erro de identificação detectado em quatro cepas, provenientes de quatro pacientes, não influenciou em um desfecho clínico desfavorável. Logo, os achados do presente estudo reforçam que os métodos comerciais continuam válidos para uma identificação rápida das leveduras nos laboratórios de diagnóstico de doenças micóticas. Porém para fins de investigação epidemiológica, e ainda quando houver a identificação de espécies de leveduras com possibilidade de erro de identificação, pode ser benéfico a confirmação por técnicas moleculares. Recomenda-se que os laboratórios de micologia médica usem técnicas moleculares para o diagnóstico para superar as limitações dos métodos de identificação convencionais (KIM *et al.*, 2014).

No presente estudo, foi observada baixa atividade antifúngica do fluconazol e de equinocandinas contra cepas de *M. guilliermondii* e *M. caribbica*, por teste de susceptibilidade aos antifúngicos realizados conforme as recomendações do BrCAST e as concentrações inibitórias mínimas de acordo com os valores de corte epidemiológico descritos no protocolo (EUCAST 7.3.1, 2017). Não foram observadas diferenças significativas da atividade dos antifúngicos intra espécies. Valores mais elevados de CIMs para fluconazol e equinocandinas contra o complexo de espécies *M. guilliermondii* foram relatados anteriormente na literatura (MARCOS-ZAMBRANO *et al.*, 2014, 2017; PFALLER

et al., 2006). Essa diferença pode estar associada ao uso prévio de antifúngicos, uma vez que, no presente estudo, os pacientes com ICS por leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* com CIMs mais elevados para os antifúngicos tinham feito uso prévio destes medicamentos. Em geral, os pacientes que se submeteram a tratamento antifúngico antes da ICS apresentaram CIMs elevados para os agentes utilizados para o tratamento da infecção por estas espécies.

Especificamente, o paciente 9, infectado por duas cepas de haplótipos distintos de *M. caribbica*, foi tratado com VCZ e MFG. Esta cepa foi caracterizada como tipo não selvagem para VCZ e mostrou uma CIM elevada para MFG. Este achado reforça que a resistência à equinocandina é provável de ocorrer nesta espécie e deve ser detectada precocemente para adequação de conduta terapêutica, com conseqüente melhor desfecho clínico, conforme descrito previamente (PAPPAS *et al.*, 2015). Surpreendentemente, este paciente foi infectado por dois haplótipos diferentes de *M. caribbica*, com base nos resultados da análise das sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA. No presente caso, a cepa mutante de *M. caribbica* apresentou perfil de virulência distinto, com a produção moderada de esterase, enquanto as demais cepas não apresentaram níveis detectáveis desta enzima. Este achado reforça a importância das análises sequenciais de cepas do mesmo paciente, que devem ser realizadas devido a possíveis diferenças na identificação de espécies, suscetibilidade aos antifúngicos e perfil de virulência, conforme observado anteriormente com *Candida tropicalis* (MAGRI *et al.*, 2013).

As cepas do Complexo *M. guilliermondii* apresentaram a CIM modal mais elevada para azólicos, ou seja, acima de duas diluições, comparada às CIMs do estudo multicêntrico do protocolo EUCAST (EUCAST, 2018). Dos quatro pacientes com ICS por *M. guilliermondii*, dois fizeram uso prévio de azólicos. Esses dados sugerem que a pressão seletiva pelo uso de azólicos pode ter contribuído para as CIMs mais elevadas encontradas para esses antifúngicos nestas cepas e que, além disso, um clone de *M. guilliermondii* resistente a estes fármacos poderia estar presente no ambiente de estudo.

Houve discordância no perfil de suscetibilidade aos antifúngicos entre os métodos comerciais quando comparados ao método da microdiluição em caldo (método de referência) nas cepas do Complexo *M. guilliermondii* para os azólicos (com exceção do voriconazol no sistema VITEK[®] 2), e para as equinocandinas, e para as cepas de *C. haemulonii var. vulnera* para anfotericina B e os azólicos. A concordância essencial entre

eles foi discrepante, principalmente para os agentes azólicos. Esses dados são diferentes de estudo prévio que descreveu que as CIMS obtidas pelo VITEK® 2 são reprodutíveis e ligeiramente superiores para *Candida* quando comparadas aos métodos de referência EUCAST para azólicos e anfotericina B (ALASTRUEY-IZQUIERDO *et al.*, 2015). As espécies dos Complexos *M. guilliermondii* e *C. haemulonii* normalmente apresentam resistência a esses fármacos (RAMOS *et al.*, 2015;CEBECI GÜLER; TOSUN; AYDIN, 2017), que provavelmente não estão sendo detectadas nos métodos comerciais utilizados amplamente pela maioria dos laboratórios de microbiologia clínica.

Os dados acima reforçam que a identificação correta das leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales*, realizada juntamente com o teste de suscetibilidade antifúngico são fundamentais para definir a escolha terapêutica apropriada para os pacientes. Uma limitação deste trabalho é que, devido à indisponibilidade de anidulafungina purificada para os testes de susceptibilidade antifúngica *in vitro* durante o desenvolvimento do estudo, esse fármaco antifúngico, utilizado no tratamento de dois pacientes, não foi testado. Foi observado neste estudo que as cepas de levedura dos pacientes que usaram anidulafungina anteriormente a ICS tiveram CIMS elevadas para MFG. Uma vez que a resistência à anidulafungina e à micafungina geralmente ocorrem juntas em cepas de *Candida* (VAN DER GEEST *et al.*, 2016) é provável que o uso profilático de anidulafungina tenha contribuído para elevar as CIMS para MFG nessas cepas. Resultados semelhantes foram relatados em um caso raro de fungemia por *C. guilliermondii* após transplante de sangue de cordão umbilical durante a terapia antifúngica com fluconazol. Os autores demonstraram que a administração profilática de fluconazol parece ter causado uma incidência relativamente maior de infecção por leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* mais resistente (NAKAZAWA *et al.*, 2018). No entanto, o uso racional de agentes antifúngicos deve ser considerado devido à possibilidade de resistência aos poucos fármacos disponíveis capazes de tratar infecções causadas por leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales*. Considerando que azóis e equinocandinas são o tratamento de primeira linha sugerido pelas diretrizes clínicas para *Candida* spp., (MONTOYA *et al.*, 2019; PAPPAS *et al.*, 2015) é necessário cautela para a administração profilática dessas drogas e vigilância adicional deve ser direcionada quando o complexo de espécies *M. guilliermondii* está presente (LOCKHART *et al.*, 2009), devido a baixa sensibilidade deste complexo a esses compostos (SAVINI *et al.*, 2011; TAVERNA *et al.*, 2019). O uso de formulação lipídica de anfotericina é uma alternativa quando a

resistência a azólicos e equinocandinas é detectada, porém esta deve ser a terapia antifúngica de última escolha (PAPPAS *et al.*, 2015).

Em relação aos fatores de virulência, a atividade hemolítica foi detectada em todas as cepas de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales*. A produção de enzimas hidrolíticas extracelulares é um dos fatores de virulência expressos por leveduras do gênero *Candida*. Além da degradação das moléculas do hospedeiro, a secreção dessas enzimas também tem a capacidade de regular a resistência antifúngica desses organismos (NAGLIK *et al.*, 2004; SARDI *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2011). Este fenótipo é um dos mecanismos importantes que contribui para a patogenicidade de *Candida* e espécies relacionadas e está relacionado à aquisição de ferro, que é essencial para a sobrevivência das leveduras (SARDI *et al.*, 2013). A correlação entre a produção de hemolisina e a CIM para micafungina foi descrita previamente sugerindo que a produção de hemolisina estaria diretamente associada a elevação da CIM para os antifúngicos fluconazol e micafungina (FIGUEIREDO-CARVALHO *et al.*, 2017). Diferentemente, no presente estudo, esta associação não foi detectada, possivelmente devido ao *n* reduzido entre as diferentes espécies estudadas. A tolerância ao estresse oxidativo está intimamente ligada à defesa fúngica durante uma infecção. Foi demonstrado que as vias antioxidantes dos fungos, que incluem resistência ao peróxido de hidrogênio, são importantes para sua sobrevivência contra neutrófilos (LEAL *et al.*, 2012; ZAJC; GOSTINČAR; GUNDE-CIMERMAN, 2019). Neste estudo, esses fenótipos com produção de hemolisina não foram associados ao pior desfecho dos pacientes, uma vez que ambos os pacientes infectados com cepas que foram excelentes produtores dessa enzima sobreviveram. Contudo, esse achado não exclui a presença dessa associação, pois trata-se de um estudo com um número pequeno de casos e pouco poder estatístico para excluir algumas associações; e outras variáveis podem ter contribuído para a sobrevivência desses pacientes. A necessidade de cuidados intensivos devido à ICS destes dois pacientes provavelmente contribuiu para o desfecho desfavorável.

A atividade da fosfolipase não foi detectada sob as condições experimentais para as cepas do Complexo *M. guilliermondii* testados. Resultados semelhantes foram descritos por outros autores (FIGUEIREDO-CARVALHO *et al.*, 2017; MONTROYA *et al.*, 2019). Para outras enzimas hidrolíticas foram observadas diferenças entre as espécies deste complexo. Algumas cepas de *M. guilliermondii* apresentaram atividade de aspártico-protease e esterase, enquanto *M. caribbica* apresentou atividade de esterase e

fitase. A produção de esterase foi detectada em três cepas de *M. guilliermondii*, e em uma outra cepa de *M. caribbica*. A atividade de fosfolipase e proteinase não foram descritas previamente para *C. guilliermondii*, mas sim a atividade de esterase (SRIPHANNAM *et al.*, 2019). O papel da esterase, uma enzima extracelular, é a digestão de lipídios usados como fonte de nutrientes pelo fungo durante a invasão do hospedeiro (DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014; SRIPHANNAM *et al.*, 2019). No presente estudo, dois pacientes com doença hematológica, neutropenia, uso prévio de antifúngicos e infectados por cepas produtoras de esterase morreram logo após o diagnóstico de ICS por espécies do Complexo *M. guilliermondii*. Esse fato reforça que esse complexo afeta principalmente pacientes com graves condições debilitantes (MARCOS-ZAMBRANO *et al.*, 2017). Outra observação do presente estudo foi a produção variável desta enzima por cepas de um mesmo paciente. Quatro cepas de *M. caribbica* foram isoladas do paciente 9, mas apenas uma delas apresentou produção de esterase. Diferentes fenótipos de esterase também foram observados em cepas de *M. guilliermondii* do paciente 3, porém suas sequências de ITS foram idênticas, mostrando que, neste estudo, as diferenças no fenótipo de esterase não estão diretamente relacionadas à diversidade da região ITS. Uma maior produção de esterase foi observada em cepas de *C. glabrata* com maior suscetibilidade à micafungina (FIGUEIREDO-CARVALHO *et al.*, 2017). Essa correlação não foi observada em nosso estudo.

No presente estudo foi observado um pequeno número de pacientes com neutropenia. Este achado foi inesperado, visto que a maioria dos pacientes tinha doença de base hematológica em tratamento (68,4%/ n: 13) e a neutropenia em pacientes com doença hematológica é um fator predisponente para a fungemia no hospedeiro, inclusive por espécies de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* (GAMALETSOU *et al.*, 2014; GHARAGHANI *et al.*, 2016). Porém outros fatores, como uso de corticosteróides nos 30 dias prévios à detecção da fungemia (PAPPAS *et al.*, 2018), que foi detectado na maioria dos pacientes inseridos neste estudo, pode ter contribuído para a ocorrência de ICS por leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales*.

O uso prolongado de cateteres venosos centrais é outro fator contribuinte para a fungemia. Dentre as fontes identificadas como topografia da infecção primária de corrente sanguínea esta é a mais comum. Estes dispositivos contribuem para o desenvolvimento de resistência, pois suas superfícies propiciam a formação de biofilme, impedindo a penetração da droga, tornando a infecção refratária ao tratamento (TUMBARELLO *et al.*,

2007). Em estudo prospectivo multicêntrico projetado especificamente para investigar a epidemiologia e os fatores de risco para fungemia por *Candida* spp. entre pacientes hospitalizados com neoplasias hematológicas foi encontrado a presença de cateter venoso central em 78% (n: 31) dos pacientes (GAMALETSOU *et al.*, 2014). Porém, em nosso estudo, apenas 21,0% (n: 4) dos pacientes tiveram o uso de cateter venoso central de longa permanência associado a topografia da infecção primária. A fonte mais frequentemente encontrada foi a indeterminada (47,4%/ n: 9). Parte destas poderia estar relacionada a cateter, porém provavelmente não conseguimos detectar devido a uma limitação do nosso estudo retrospectivo, de 15 anos, onde não conseguimos encontrar os dados sobre uso destes dispositivos intravasculares nestes pacientes.

Neste estudo, encontramos uma potencial associação entre a necessidade de cuidados intensivos e a maior chance de óbito em trinta dias. Este representa um indicador de gravidade da ICS. Foi encontrado tendência de associação entre idade mais elevada e óbito em trinta dias (P próximo de 0,05) e valor de PCR mais elevado entre os óbitos, apesar de não ter significância estatística na análise.

Não encontramos associação entre a produção de enzimas hidrolíticas e o desfecho, considerando todas as leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales*. Porém, devido ao poder estatístico limitado estas associações podem ser excluídas. O pequeno número de pacientes inseridos neste estudo pode ser explicado pelo fato que ICS devido ao complexo de espécies *M. guilliermondii* geralmente correspondem a aproximadamente 2% dos casos de fungemia em pacientes com câncer (CASTANHEIRA *et al.*, 2013; LAN; XU, 2006; VAUGHAN-MARTINI *et al.*, 2005). Essa limitação nos impede de elaborar conclusões sobre a relação dos fenótipos associados à virulência e suscetibilidade antifúngica com o desfecho dos pacientes infectados. No entanto, os resultados deste estudo contribuem com conhecimentos adicionais sobre as espécies circulantes de leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* que são responsáveis por infecções potencialmente graves, comparação entre técnicas distintas de identificação, atualização em taxonomia, mensuração de susceptibilidade aos antifúngicos, fatores de virulência e fatores determinantes para óbito.

7 CONCLUSÃO

As espécies de leveduras incomuns causadoras de fungemia em pacientes com câncer neste estudo foram todas da ordem *Saccharomycetales*: *Meyerozyma guilliermondii*, *Meyerozyma caribbica*, *Candida haemulonii* var. *vulnera*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Klueyveromyces marxianus*, *Candida dubliniensis* e *Yarrowia lypolitica*, além de uma espécie de *Kodamaea ohmeri*.

As espécies do Complexo *Meyerozyma guilliermondii* e *Wickerhamomyces anomalus* foram as leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* mais prevalentes neste estudo.

Os achados do presente estudo reforçam que os métodos comerciais continuam válidos para uma identificação rápida das leveduras nos laboratórios de diagnóstico de doenças fúngicas.

As técnicas moleculares permitem uma diferenciação mais adequada para a identificação de algumas espécies da ordem *Saccharomycetales*, que por limitação da técnica, não podem ser detectadas por métodos comerciais de identificação.

Não houve concordância essencial no perfil de suscetibilidade aos antifúngicos entre os métodos comerciais, quando comparados ao método de referência da microdiluição em caldo nas cepas do Complexo *M. guilliermondii* para os azólicos e para as equinocandinas, e ainda nas cepas de *C. haemulonii* var. *vulnera* para a anfotericina B e os azólicos.

As menores CIMs foram observadas para anfotericina B entre os métodos de suscetibilidade aos antifúngicos analisados, demonstrando que este é um fármaco adequado para o tratamento das ICS por leveduras da ordem *Saccharomycetales* identificadas neste estudo.

Os níveis de produção de hemolisina não parecem estar relacionados a um pior prognóstico neste estudo, uma vez que ambos os pacientes infectados com alta produção desta enzima sobreviveram.

A produção de hemolisina está diretamente associada a elevação da CIM para as equinocandinas nas cepas de leveduras da ordem *Saccharomycetales* estudadas.

As ICS por leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales* foram detectadas principalmente entre os pacientes com neoplasias hematológicas com uso de corticoesteróides nos últimos 30 dias.

As ICSs primárias por leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales*, especificamente as de origem indeterminada e as associadas ao acesso vascular de longa permanência, foram as mais frequentes.

A necessidade de internação em UTI esteve associada ao aumento na chance de óbito dos pacientes com ICS por leveduras incomuns da ordem *Saccharomycetales*. Houve tendência de associação entre idade elevada e óbito, assim como entre valor de PCR elevado e óbito.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABI-CHACRA, É. A.; SOUZA, L. O. P.; CRUZ, L. Phenotypical properties associated with virulence from clinical isolates belonging to the *Candida parapsilosis* complex. **FEMS Yeast Research**, 13(8), 831–848, 2013.

ALCOBA-FLOREZ, J.; DEL PILAR AREVALO, M.; GONZALEZ-PAREDES, J. *et al.* PCR protocol for specific identification of *Candida nivariensis*, a recently described pathogenic yeast. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n.12, p. 6194–6196, 2005.

AHMAD, S.; KHAN, Z.; AL-SWEIH, N. *et al.* *Candida kefyr* in Kuwait: Prevalence, antifungal drug susceptibility and genotypic heterogeneity. **Plos One**, 2020.

AL-SWEIH, N.; KHAN, Z. U.; AHMAD, S. *et al.* *Kodamaea ohmeri* as an emerging pathogen: a case report and review of the literature. **Medical Mycology**, v. 49, n. 7, p. 766–770, 1 out. 2011.

ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; MELHEM, M. S. C.; BONFIETI, L. X. *et al.* Teste de suscetibilidade para fungos: Correlações clínicolaboratoriais em Micologia médica. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 57, n. 2, p. 57–64, 1 set. 2015.

ANNELOES, V.; KOLECKA, A.; KHAYHAN, K. *et al.* Interlaboratory comparison of sample preparation methods, database expansions, and cutoff values for identification of yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry using a yeast test panel. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 8, p. 3023–3029, 2014.

ANTINORI, S.; MILAZZO, L.; SOLLIMA, S. *et al.* Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. **European Journal of Internal Medicine**, v. 34, p. 21-28, 1 out. 2016.

ANVISA. Corrente Sanguínea. Critérios Nacionais de Infecções Relacionadas à assistência à Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2009.

ANVISA. Comunicado de risco nº01/2017 - GVIMS/GGTES/ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2017. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/comunicados-de-risco-1/comunicado-de-risco-no-01-2017-gvims-ggtes-anvisa-1>>. Acesso em: 25 out. 2021

ANVISA. Identificação de possível caso de *Candida auris* no Brasil. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/identificacao-de-possivel-caso-de-candida-auris-no-brasil/ALERTA012020CANDIDAAURIS07.12.2020_2.pdf>. Acesso em: 30 mar. 2021.

ARENDRUP, M. C. *et al.* Seminal surveillance of fungemia in Denmark: Notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4434–4440, set. 2005.

ARENDRUP, M. C. *Candida* and Candidaemia: Susceptibility and Epidemiology. **Danish Medical Journal**, v. 60, n. 11, p. 1–32, 2013.

ARENDRUP, M. C., MELETIADIS, J., MOUTON, J. W., *et al.* EUCAST E.DEF 7.3.1 Antifungal MIC method for yeasts. **Clin Microbiol Infect**, 18, 246–247, 2017.

ARENDRUP, M. C., MELETIADIS, J., MOUTON, J. W. *et al.* EUCAST-Documento Definitivo E.DEF. 7.3.2-Abril 2020 Método para determinação de concentração inibitória mínima em caldo dos agentes antifúngicos para leveduras. **BrCAST**, p. 1–19, 2020.

ASADZADEH, M.; AHMAD, S.; AL-SWEIH, N. *et al.* Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* strains isolated from clinical specimens in Kuwait. **Journal of medical microbiology**, v. 58, n. Pt 6, p. 745–752, jun. 2009.

BALAJEE, S. A., BORMAN, A. M., BRANDT, M. E. *et al.* Sequence-based identification of *aspergillus*, *fusarium*, and *mucorales* species in the clinical mycology laboratory: Where are we and where should we go from here? **In Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 877–884, 2009.

BENNETT E. J.; DOLIN, R.; BLASER, M. J. **Mandell, Douglas and Bennett`s. Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia, PA: Elsevier Health Sciences. Elsevier, 8th edition, 2015.**

BORST, A.; FLUIT, A. C. High levels of hydrolytic enzymes secreted by *Candida albicans* isolates involved in respiratory infections. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, n. 11, p. 971–974, nov. 2003.

BRETAGNE, S. *et al.* Predisposing factors and outcome of uncommon yeast species-related fungaemia based on an exhaustive surveillance programme (2002-14). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 6, p. 1784–1793, 2017.

BREUER, U.; HARMS, H. *Debaryomyces hansenii*--an extremophilic yeast with biotechnological potential. **Yeast**, v. 23, n. 6, p. 415–437, 30 abr. 2006.

CALVO, B. *et al.* First report of *Candida auris* in America: Clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia. **Journal of Infection**, v. 73, n. 4, p. 369–374, 1 out. 2016.

CASTANHEIRA, M.; WOOSLEY, L. N.; DIEKEMA, D. J. *et al.* *Candida guilliermondii* and other species of *Candida* misidentified as *Candida famata*: Assessment by Vitek 2, DNA sequencing analysis, and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in two global antifungal surveillance programs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 117–124, jan. 2013.

CEBECI GÜLER, N.; TOSUN, I. ONTOYA; AYDIN, F. The identification of *Meyerozyma guilliermondii* from blood cultures and surveillance samples in a university hospital in Northeast Turkey: A ten-year survey. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 27, n. 4, p. 506–513, 1 dez. 2017.

CENDEJAS-BUENO, E. *et al.* Reclassification of the *Candida haemulonii* Complex as *Candida haemulonii* (*C. haemulonii* Group I), *C. duobushaemulonii* sp. nov. (*C. haemulonii* Group II), and *C. haemulonii* var. *vulnera* var. nov.: Three Multiresistant Human Pathogenic

Yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 11, p. 3641, nov. 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Clinical Alert to U.S. Healthcare Facilities - June 2016 | *Candida auris* | Fungal Diseases | **CDC**, 2016. Disponível em: <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/candida-auris-alert.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Ffungal%2Fdiseases%2Fcandidiasis%2Fcandida-auris-alert.html>. Acesso em: 4 mar. 2021.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC/ NHSN Surveillance Definitions for Specific Types of Infection. **CDC**, 2021.

CHAKRABARTI, A. *et al.* Epidemiological study of a large cluster of fungaemia cases due to *Kodamaea ohmeri* in an Indian tertiary care centre. **Clinical microbiology and infection**, v. 20, n. 2, 2014.

CHOWDHARY, A. *et al.* Multidrug-Resistant *Candida auris* Infections in Critically Ill Coronavirus Disease Patients, India, April-July 2020. **Emerging infectious diseases**, v. 26, n. 11, p. 2694–2696, 1 nov. 2020.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 4th Edition. CLSI DOCUMENT M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2017.

COLOMBO, A. L. *et al.* Epidemiology of candidemia in Brazil: A nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816–2823, ago. 2006.

CUENCA-ESTRELLA, M. Antifungal agents in the treatment of systemic infections: [Relevance of mechanism of action, activity profile and resistances]. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 23, n. 4, p. 169–176, 2010.

DAGDEVIREN, M.; CERIKCIOGLU, N.; KARAVUS, M. Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalised patients. **Mycoses**, v. 48, n. 5, p. 321–326, set. 2005.

DE ALMEIDA, J. N. JR.; FRANCISCO, E. C.; HAGEN, F. *et al.* Emergence of *Candida auris* in Brazil in a COVID-19 **Intensive Care Unit**. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 3, 1 mar. 2021.

DE MARCO, L. *et al.* The genomes of four *Meyerozyma caribbica* isolates and novel insights into the *Meyerozyma guilliermondii* species complex. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 8, n. 3, p. 755–759, 1 mar. 2018.

DEORUKHKAR, S. C.; SAINI, S.; MATHEW, S. Virulence factors contributing to pathogenicity of *Candida tropicalis* and its antifungal susceptibility profile. **International Journal of Microbiology**, v. 2014.

DESNOS-OLLIVIER, M.; LETSCHER-BRU, V.; NEUVÉGLISE, C.; DROMER, F. *Yarrowia lipolytica* causes sporadic cases and local outbreaks of infections and colonisation. **Mycoses**, v. 63, n. 7, p. 737–745, 1 jul. 2020.

DIALLO, K. *et al.* A case report of fungemia due to *Kodamaea ohmeri*. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, 1 jul. 2019.

DUFRESNE, S. F. *et al.* Epidemiology of *Candida kefyr* in patients with hematologic malignancies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 1830–1837, 2014.

EPIS, S. *et al.* A rapid qPCR method to investigate the circulation of the yeast *Wickerhamomyces anomalus* in humans SuMMARy. **New Microbiologica**, v. 38, p. 577–581, 2015.

ESPINEL-INGROFF, A. *et al.* Comparison of 24-hour and 48-hour voriconazole MICs as determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute Broth Microdilution Method (M27-A3 document) in three laboratories: Results obtained with 2,162 clinical isolates of *Candida* spp. and other yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 9, p. 2766–2771, set. 2009.

ESPINEL-INGROFF, A., ARENDRUP, M., CANTON, E. *et al.* Multicenter study of method-dependent epidemiological cutoff values for detection of resistance in *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. to amphotericin B and echinocandins for the Etest agar diffusion method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 1, 2017.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. Content Antifungal Agents European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs. **EUCAST**, 2018. Disponível em: <https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/Antifungal_breakpoints_v_9.0_180212.pdf>, 2018 Acesso em: 5 nov. 2021.

FATIMA, A. *et al.* Molecular identification of *Candida* species isolated from cases of neonatal candidemia using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in a tertiary care hospital. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 61–65, 1 jan. 2017.

FEKKAR, A. *et al.* Rapid emergence of echinocandin resistance during *Candida kefyr* fungemia treatment with caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2380–2382, maio 2013.

FERREIRA, T. C.; MARTINS, I. S. Risk factors of death in bloodstream infections caused by ampc β -lactamase-producing enterobacteriales in patients with neoplasia. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, p. 3083–3097, 2021.

FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G.; BARBEDO, L.; OLIVEIRA, M. M. E. *et al.* Comparison of Commercial Methods and the CLSI Broth Microdilution to Determine the Antifungal Susceptibility of *Candida parapsilosis* Complex Bloodstream Isolates from Three Health Institutions in Rio de Janeiro, Brazil. **Mycopathologia**, v. 178, n. 1–2, p. 27–35, 2014.

FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G.; RAMOS, L. S.; BARBEDO, L. S. *et al.* Relationship between the Antifungal Susceptibility Profile and the Production of Virulence-Related Hydrolytic Enzymes in Brazilian Clinical Strains of *Candida glabrata*. **Mediators of**

Inflammation, v. 2017.

FONSECA, G. G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A. K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 339–354, 1 jun. 2008.

FREIFELD, A. G., BOW, E. J., SEPKOWITZ, K. A. *et al.* Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v.52, n.4, p. e56–e93, 2011.

GAMALETSSOU, M. N.; WALSH, T. J.; ZAOUTIS, T. *et al.* A prospective, cohort, multicentre study of candidaemia in hospitalized adult patients with haematological malignancies. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 1, 2014.

GAMALETSSOU, M. N.; WALSH, T. J.; SIPSAS, N. V. Invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: Emergence of resistant pathogens and new antifungal therapies. **Turkish Journal of Hematology**, v. 35, n. 1, p. 1-11, 2018.

GHARAGHANI, M.; REZAEI-MATEHKOLAEI, A.; MAHMOUDABADI, A. Z. *et al.* The frequency, antifungal susceptibility and enzymatic profiles of *Candida* species isolated from neutropenic patients. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 9, n. 11, p. e41446, 1 nov. 2016.

GUTIÉRREZ, J., MORALES, P., GONZÁLEZ, M.A., QUINDÓS, G. *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. **J. Basic Microbiol**, v.42, n. 3, p. 207-227, 2002.

HASEJIMA. *et al.* The first case of bloodstream infection by *Candida intermedia* in Japan: the importance of molecular identification. **Journal of infection and chemotherapy**, v. 17, n. 4, p. 555–558, 2011.

HUGUES, W. T. *et al.* 2002 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. **Clinical infectious diseases**, v. 34, n. 6, p. 730–751, 15 mar. 2002.

IOANNOU, P.; PAPAITSOU, I. *Kodamaea ohmeri* infections in humans: A systematic review. **Mycoses**, v. 63, n. 7, p. 636–643, 1 jul. 2020.

IRINYI, L. *et al.* International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database - The quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. **Medical Mycology**, V. 53; n. 4; p. 313-337, 27 jan. 2015.

JACQUES, N.; MALLET, S.; CASAREGOLA, S. Delimitation of the species of the *Debaryomyces hansenii* complex by intron sequence analysis. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 59, n. Pt 5, p. 1242–1251, 2009.

JANG, J. H.; LEE, J. H.; Ki, C. S. *et al.* Identification of clinical mold isolates by sequence analysis of the internal transcribed spacer region, ribosomal large-subunit D1/D2, and β -tubulin. **Annals of Laboratory Medicine**, V. 32, n. 2, p. 126–132, 2012.

JUNG, D. S. *et al.* Uncommon *Candida* species fungemia among cancer patients, Houston, Texas, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 11, p. 1942–1950, 1 nov. 2015.

KANNO Y.; WAKABAYASHI, Y., IKEDA, M. *et al.* Catheter-related bloodstream infection caused by *Kodamaea ohmeri*: A case report and literature review. **Journal of infection and chemotherapy**, v. 23, n. 6, p. 410–414, 1 jun. 2017.

KHAN, Z.; AHMAD, S.; JOSEPH, L.; CHANDY, R. *Candida dubliniensis*: an appraisal of its clinical significance as a bloodstream pathogen. **PloS one**, v. 7, n. 3, 2 mar. 2012.

KHAN, Z. *et al.* *Candida kefyr* as a cause of bloodstream infection and adjunctive role of biomarkers in its diagnosis. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 25, n. 1, p. 71–75, 1 mar. 2015.

KIM, J.; SUDBERY, P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. **J Microbiol**, v. 49, n. 2, p. 171-177, abr. 2011.

KIM, S. H. *et al.* Misidentification of *Candida guilliermondii* as *C. Famata* among strains

isolated from blood cultures by the VITEK 2 system. **BioMed Research International**, 2014.

KIM, T. H. *et al.* Identification of uncommon *Candida* species using commercial identification systems. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 12, p. 2206–2213, 1 dez. 2016.

KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R. O. *Candida* Infections of Medical Devices. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 17, n. 2, p. 255-267. abr. 2004.

KURTZMAN, C.; FELL, J. **The Yeasts - A Taxonomic Study**. Elsevier. 4th. p. 1076, 1998.

KURTZMAN, C. P.; SUZUKI, M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. **Mycoscience**, v. 51, n. 1, p. 2–14, 2010.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Relationships among genera of the *Saccharomycotina* (*Ascomycota*) from multigene phylogenetic analysis of type species. **FEMS Yeast Research**, v. 13, n. 1, p. 23–33, jan. 2013.

LACAZ, C. S. *et al.* Tratado de Micologia Médica. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 5, p. 297–298, out. 2002.

LAN, L.; XU, J. Multiple gene genealogical analyses suggest divergence and recent clonal dispersal in the opportunistic human pathogen *Candida guilliermondii*. **Microbiology**, v. 152, n. 5, p. 1539–1549, maio 2006.

LEAL, S. M.; VAREECHON, C., COWDEN, S. *et al.* Fungal antioxidant pathways promote survival against neutrophils during infection. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 7, p. 2482–2498, 2 jul. 2012.

LEAW, S. N. *et al.* Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3,

p. 693–699, mar. 2006.

LEE, W. G. *et al.* First three reported cases of nosocomial fungemia caused by *Candida auris*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 9, p. 3139–3142, set. 2011.

LEWIS, M. A. O.; WILLIAMS, D. W. Diagnosis and management of oral candidosis. **British Dental Journal**, v. 223, n. 9, p. 675–681, 10 nov. 2017.

LIM, C. S. Y. *et al.* *Candida* and invasive candidiasis: Back to basics. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, n. 1, p. 21-31, jan. 2012.

LOCKHART, S. R.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A. *et al.* Identification and Susceptibility Profile of *Candida fermentati* from a Worldwide Collection of *Candida guilliermondii* Clinical Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 242–244, 2009.

LOPANDIC, K. *et al.* Molecular characterization of the closely related *Debaryomyces* species: Proposition of *D. vindobonensis* sp. nov. from a municipal wastewater treatment plant. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 49–58, 22 mar. 2013.

LORTHOLARY, O. *et al.* The risk and clinical outcome of candidemia depending on underlying malignancy. **Intensive Care Medicine**, v. 43, n. 5, p. 652-662, 2017.

MARCHETTI, O. *et al.* Epidemiology of Candidemia in Swiss Tertiary Care Hospitals: Secular Trends, 1991-2000. **Clin Infect Dis**, v. 38, n. 3, p. 311-320, 1 fev. 2004.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J., ESCRIBANO, P., SANCHEZ, C. *et al.* Antifungal Resistance to Fluconazole and Echinocandins Is Not Emerging in Yeast Isolates Causing Fungemia in a Spanish Tertiary Care Center. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4565–4572, ago. 2014.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J.; PUIG-ASENSIO, M.; PEREZ-GARCIA, FELIPE. *et al.* *Candida guilliermondii* complex is characterized by high antifungal resistance but low

mortality in 22 cases of candidemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 7, 1 jul. 2017.

MARRA, A. R. *et al.* Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2,563 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Journal of clinical microbiology**. v. 49, n. 5, p. 1866–1871, 2011.

MARTIN-LOECHES, I. *et al.* ESICM/ESCMID task force on practical management of invasive candidiasis in critically ill patients. **Intensive Care Medicine**, v. 45, n. 6, p. 789–805, 25 mar. 2019.

MELETIADIS, J., ARABATZIS M., BOMPOLA M. *et al.* Comparative evaluation of three commercial identification systems using common and rare bloodstream yeast isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 7, p. 2722–2727, jul. 2011.

MELO, N. *et al.* Oral *Candida* flora from Brazilian human immunodeficiency virus-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 4, p. 425–431, 2004.

MERMEL, L. A. *et al.* Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. **Clinical Infectious Diseases**. v. 32, n. 9, p. 1249-1272, 1 maio 2001.

MAGRI, M. M. C., GOMES-GOUVEA, M. S., DE FREITAS, V. L. T. *et al.* Multilocus Sequence Typing of *Candida tropicalis* Shows the Presence of Different Clonal Clusters and Fluconazole Susceptibility Profiles in Sequential Isolates from Candidemia Patients in São Paulo, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, p. 268–277, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. RELAÇÃO NACIONAL DE MEDICAMENTOS ESSENCIAIS 2020. **Ministério da Saúde**, 2020. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/assistencia-farmaceutica/medicamentos-rename>>. Acesso em: 17 mar. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. PORTARIA Nº 64, DE 11 DE DEZEMBRO DE 2018 - Imprensa

Nacional. **Ministério da Saúde**, 2018. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/55217765/do1-2018-12-14-portaria-n-64-de-11-de-dezembro-de-2018-55217696>. Acesso em: 30 mar. 2021.

MONTOYA, A. M.; LUNA-RODRIGUEZ, C. E.; GRACIA-ROBLES, G. *et al.* In vitro lytic activity and antifungal susceptibility of infrequently isolated yeasts. **Archives of Microbiology**, v. 201, p. 1147–1149, 2019.

MORAN, G. P.; COLEMAN, D. C.; SULLIVAN, D. J. *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: Why Is *Candida albicans* More Pathogenic? **International journal of microbiology**, 2012.

NAGLIK, J.; AKBRECHT, A.; BADER, O. *et al.* *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 915-926, out. 2004.

NAKAGAWA, Y. *et al.* The expression of the pathogenic yeast *Candida albicans* catalase gene in response to hydrogen peroxide. **Microbiology and Immunology**, v. 43, n. 7, p. 645–651, 1999.

NAKAZAWA, H., NISHINA, S., SENOO, Y. *et al.* Breakthrough *Candida guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*) fungemia after cord blood transplantation for extranodal NK-cell lymphoma with azole prophylaxis. **Transplant Infectious Disease**, v. 20, n. 4, 1 ago. 2018.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; ALVARADO-MATUTE, T. *et al.* Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

PASQUALOTTO, A. C.; SUKIENNIK, T. C. T.; SEVERO, L. C.; AMORIN, C. S., COLOMBO, A. L. An Outbreak of *Pichia anomala* Fungemia in a Brazilian Pediatric Intensive Care Unit. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 26, n.6, p. 553-558, 2004.

PAPPAS, P. G. *et al.* Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016

Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. e1-e50, 4 nov. 2015.

PAPPAS, P. G. *et al.* Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1–20, 11 maio 2018.

PARK, M.; DO, E.; JUNG, W. H. Lipolytic enzymes involved in the virulence of human pathogenic fungi. **Mycobiology**, v. 41, n. 2, p. 67-72, 2013.

PAUL, S.; KANNAN, I. Molecular identification and antifungal susceptibility pattern of *Candida* species isolated from HIV infected Patients with candidiasis. **Current Medical Mycology**, v. 5, n. 1, p. 21, 1 mar. 2019.

PFALLER, M. A., DIEKEMA, D. J., MENDEZ, M. *et al.* *Candida guilliermondii*, an Opportunistic Fungal Pathogen with Decreased Susceptibility to Fluconazole: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3551–3556, 2006.

PFALLER, M. A., ESPINEL-INGROFF, A., CANTON, E. *et al.* Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine, and itraconazole and *Candida* spp. as determined by CLSI broth microdilution. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 2040–2046, 2012.

PFALLER, M. A., ESPINELL-INGROFF, A., BUSTAMANTE, B. *et al.* Multicenter study of anidulafungin and micafungin MIC distributions and epidemiological cutoff values for eight *candida* species and the CLSI M27-A3 broth microdilution method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 916–922, 2014.

POSTERARO, B. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: Identification of fungi and beyond. **Expert Review of Proteomics**, v. 10, n. 2, p. 151-164, abr. 2013.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of

phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, n. 1, p. 7–14, mar. 1982.

RAMAGE, G. *et al.* *Candida* biofilms: An update. **Eukaryotic Cell**. v. 4, n. 4, p. 633-638. abr. 2005.

RAMOS, L. S., FIGUEIREDO-CARVALHO, M. BARBEDO, L. *et al.* *Candida haemulonii* complex: species identification and antifungal susceptibility profiles of clinical isolates from Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 1, p. 111–115, 1 jan. 2015.

RAMOS, L. S., MELLO, T., BRANQUINHA, M. *et al.* Biofilm Formed by *Candida haemulonii* Species Complex: Structural Analysis and Extracellular Matrix Composition. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 2, 1 jun. 2020.

RODRIGUES DUTRA, V. *et al.* Fatal Case of Fungemia by *Wickerhamomyces anomalus* in a Pediatric Patient Diagnosed in a Teaching Hospital from Brazil. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 147, 2020.

ROLSTON, K. V. The Infectious Diseases Society of America 2002 guidelines for the use of antimicrobial agents in patients with cancer and neutropenia: salient features and comments. **Clinical infectious diseases**, v. 39, n. SUPPL. 1, p. s44-s48, 2004.

ROMÁN, E. *et al.* Role of catalase overproduction in drug resistance and virulence in *Candida albicans*. **Future Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 1279–1297, 1 out. 2016.

RUAN, S. Y.; CHIEN, J. C.; HOU, Y. C.; HSUEH, P. R. Catheter-related fungemia caused by *Candida intermedia*. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. e147–e149, 1 fev. 2010.

RÜCHEL, R., TEGELER, R., & TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 20, n. 3, p. 233–244, 1982.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T. *et al.* *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new

therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 10-24, jan. 2013.

SARDI, J. C. O.; SILVA, D. R.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. *et al.* *Candida auris*: Epidemiology, risk factors, virulence, resistance, and therapeutic options. **Microbial Pathogenesis**, v. 125, p. 116–121, 1 dez. 2018.

SAVINI, V.; CATAVITELLO, C.; ONOFRILLO, D. *et al.* What do we know about *Candida guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. **Mycoses**, v. 54, p. 434–441, 2011.

SCHOCH, C. L. *et al.* The internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Fungal Barcoding Consortium**, v. 109, n. 16, p. 6241–6246, 17 abr. 2012.

SCHOCH, C. L. *et al.* NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. **The journal of biological databases and curation**, p. 1-21, 2020.

SHUBHAM, S. *et al.* *Wickerhamomyces anomalus*: A Rare Fungal Sepsis in Neonates. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 88, n. 8, p. 838, 2021.

SILVA, N. C.; NERY, J. M.; DIAS, A. L. T. Aspartic proteinases of *Candida* spp.: Role in pathogenicity and antifungal resistance. **Mycoses**, v. 57, n. 1, p. 1-11, jan. 2014.

SILVA, S. *et al.* Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Trends in Microbiology**, v.19, n. 5, p. 241-247, maio 2011.

SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. **Lancet**. v. 369, n. 9577, p. 1961-1971, 9 jun 2007.

SPIVAK, E. S.; HANSON, K. E. *Candida auris*: an Emerging Fungal Pathogen. **Journal of clinical microbiology**, v. 56; n. 2, p. e01588-17, 2018.

SRIPHANNAM, C.; NUANMUANG, N.; SAENGSAWANG, K. *et al.* Anti-fungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp. isolated from blood cultures. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 29, p. 325–330, 2019.

SHANG, ST. *et al.* The emerging life-threatening opportunistic fungal pathogen *Kodamaea ohmeri*: optimal treatment and literature review. **Journal of microbiology, immunology, and infection**, v. 43, n. 3, p. 200–206, jun. 2010.

STIELOW, J. B. *et al.* One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 35, n. 1, p. 242–263, 1 dez. 2015.

STOCKMANN, C. *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antifungals in children and their clinical implications Clinical Pharmacokinetics. **Springer International Publishing**, v. 53, n. 5, p. 429-454, 2014.

STROLLO, S. *et al.* Epidemiology of hospitalizations associated with invasive candidiasis, United States, 2002-2012. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 7–13, 1 jan. 2017.

TAHIR, M.; PESESKI, A. M.; JORDAN, S. J. Case Report: *Candida dubliniensis* as a Cause of Chronic Meningitis. **Frontiers in neurology**, v. 11, 8 dez. 2020.

TAJ-ALDEEN, S. J. *et al.* Uncommon opportunistic yeast bloodstream infections from Qatar. **Medical Mycology**, v. 52, n. 5, p. 552–556, 2014.

TAMURA, K. *et al.* MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, dez. 2013.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions in the Control Region of Mitochondrial DNA in Humans and Chimpanzees. **Molecular biology and evolution**, v. 10, nnnnnn, p. 512-526, 1993

TAVERNA, C. G.; MAZZA, M.; REFOJO, N. *et al.* A Comprehensive Analysis of MALDI-TOF MS and Ribosomal DNA Sequencing for Identification of Clinical Yeasts. **Current Fungal Infection Reports**, v. 11, p. 184-189. 1 dez. 2017.

TAVERNA, C. G.; CORDOBA, S.; VIVOT, M. *et al.* Reidentification and antifungal

susceptibility profile of *Candida guilliermondii* and *Candida famata* clinical isolates from a culture collection in Argentina. **Medical Mycology**, v. 57, n. 3, p. 314–323, 1 abr. 2019.

TING, J. **Neutropenia febril**. In: **Tratado de medicina de urgencias pediátricas**. [s.l.: s.n.], 2007.

TRABELSI, H. *et al.* Fungemia caused by *Yarrowia lipolytica*. **Mycopathologia**, v. 179, n. 5–6, p. 437–445, 3 fev. 2015.

TRABELSI, H., NEJI, S., HADRICH, I. *et al.* Contribution of the internal transcribed spacer regions to the detection and identification of human fungal pathogens. **Current Research in Translational Medicine**, V. 67, n. 3, P. 100–106, 2019.

TSANG, P. W. K. Differential Phytate Utilization in *Candida* species. **Mycopathologia**, v. 172, n. 6, p. 473–479, 2011.

TUMBARELLO, M.; POSTERARO, B.; TRECARCHI, E. *et al.* Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1843–1850, jun. 2007.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Antimicrobial Susceptibility Test (AST) Systems - Class II Special Controls Guidance for Industry and FDA | **FDA**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/medical-devices/guidance-documents-medical-devices-and-radiation-emitting-products/antimicrobial-susceptibility-test-ast-systems-class-ii-special-controls-guidance-industry-and-fda>>. Acesso em: 27 out. 2021.

VAN DER GEEST, P. J., HUNFELD, N. G. M., LADAGE, S. E. *et al.* Micafungin versus anidulafungin in critically ill patients with invasive candidiasis: A retrospective study. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, p. 490, 15 set. 2016.

VAUGHAN-MARTINI, A.; KURTZMAN, C. P.; MEYER, S. A. *et al.* Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. nov., the ascosporic state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila* comb. nov. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 4–5, p.

463–469, fev. 2005.

VILLANUEVA-LOZANO, H.; TREVINÑO-RANGEL, R.; GONZÁLEZ, G. M. *et al.* Outbreak of *Candida auris* infection in a COVID-19 hospital in Mexico. **Clinical microbiology and infection**, v. 27, n. 5, p. 813–816, 1 maio 2021.

VISCOLI, C. *et al.* Candidemia in Cancer Patients: A Prospective, Multicenter Surveillance Study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, n. 5, p. 1071–1079, 1 maio 1999.

YILMAZ-SEMERCI, S.; DEMIREL, G.; TAŞTEKIN, A. *Wickerhamomyces anomalus* blood stream infection in a term newborn with pneumonia. **The Turkish Journal of Pediatrics**, v. 59, p. 349-351, 2017.

WALSH, T. J., SALKIN, I. F., DIXON, D. M., HURD, N. Clinical, microbiological, and experimental animal studies of *Candida lipolytica*. **Journal of clinical microbiology**, v. 27, n. 5, p. 927–931, 1989.

ZAJC, J.; GOSTINČAR, C.; CEMOSA, A. *et al.* Stress-Tolerant Yeasts: Opportunistic Pathogenicity Versus Biocontrol Potential. **Genes**, v. 10, 2019.

ZAOUTIS, T. E.; ARGON J.; CHU, J. *et al.* The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. **Clinical infectious diseases**, v. 41, n. 9, p. 1232–1239, 1 nov. 2005.

ZHAO, Y.; CHAN, J. F. W.; TSANG, C. C. *et al.* Clinical characteristics, laboratory identification, and in vitro antifungal susceptibility of *Yarrowia (Candida) lipolytica* isolates causing fungemia: A multicenter, prospective surveillance study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 11, p. 3639–3645, 1 nov. 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE A – FICHA DE INVESTIGAÇÃO DE INFECÇÃO POR *Candida não-albicans* incomuns

CODEBOOK for form: BSI_INCA_MICOLOGIA_FORM1

Description	
Created	2019-01-28 18:15:29.0
Last edited	2019-06-28 17:50:13.0
Owner	alessa.leal@hotmail.com
Tags	
GPS stamp	No
Questions	52

1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

2.REGISTRO LABORATÓRIO

Question Type= Text

Data Field Name : LABORATÓRIO

3.PRONTUARIO

Question Type= numeric

Data Field Name : PRONTUARIO

4.DATA DE NASCIMENTO

Question Type= date

Data Field Name : DATA_DE_NASCIMENTO

5.DATA DA HEMOCULTURA

Question Type= date

Data Field Name : DATA_DA_HEMOCULTURA

6. DADOS DE GRAVIDADE DE COMORBIDADES, DO CÂNCER E IMUNOSSUPRESSÃO

7. ESCORE DE CHARLSON (o número antes das doenças devem ser somados para a próxima pergunta)

Em pacientes pediátricos pular essa pergunta e colocar 99 na soma

Question Type= checkbox

Data Field Name : ESCORE_CHARLSON

Choose all that apply:

- 1- IAM (1__IAM)
- 1- Ins. Card. Cong. (1__Ins__Card__Cong_)
- 1-D. Vasc. Perif. (1_D__Vasc__Perif_)
- 1-D. cérebro vasc (1_D__c_rebro_vasc)
- 1-Demência (1_Dem_ncia)
- 1-DPOC (1_DPOC)
- 1-D. tecido conectivo (1_D__tecido_conectivo)
- 1-Úlcera (1__lcer)
- 1-D. Hepática leve (1_D__Hep_tica_leve)
- 1-Diabetes (1_Diabetes)
- 2-Hemiplegia (2_Hemiplegia)
- 2-Insf. renal grave/mod (2_Insf__renal_grave_mod)
- 2-DM c/ lesão de órgão (2_DM_c__les_o_de__rg_o)
- 2-Qquer tumor (2_Qqer_tumor)
- 2-Leucemia (2_Leucemia)
- 2-Linfoma (2_Linfoma)
- 3-D. hep. mod/grave (3_D__hep__mod_grave)
- 6-AIDS (6_AIDS)
- 6-Tumor sólido metast. (6_)

8.soma charlson

Question Type= numeric

Data Field Name : soma_charlson

9.Status do cancer

Question Type= radio

Data Field Name : STATUS_DO_CANCER

Choose one response:

- EM TRATAMENTO (EM_TRATAMENTO)
- EM CONTROLE (EM_CONTROLE)
- SEM PROPOSTA CURATIVA (SEM_PROPOSTA_CURATIVA)

10.Paciente acamado

Question Type= radio

Data Field Name : Paciente_acamado

Choose one response:

- SIM (SIM)
- NÃO (N_O)
- NA (NA)
- PULADO (PULADO)

11.Presença de metástase

Question Type= radio

Data Field Name : Metastase

Choose one response:

- SIM (SIM)
- NAO (NAO)
- NA (NA)
- PULADO (PULADO)

12.Diagnóstico sindrômico do motivo da internação

Question Type= Text

Data Field Name : Diag_internacao

13.tipo de internação

Question Type= radio

Data Field Name : tipo_de_internacao

Choose one response:

- ELETIVA (0)
- EMERGENCIA (1)
- NA (99)
- PULADO (PULADO)

14.QT nos últimos 6 meses?

Question Type= radio

Data Field Name : QT_6meses

Choose one response:

- SIM (1)
- NÃO (0)
- PULADO (PULADO)

15.Usou corticóide(>20mg pred para cças 1mg/kg/dia) por pelo menos14dias até 30 dias antes da hemo pos?

Question Type= radio

Data Field Name : CORTICOIDE_30DIAS

Choose one response:

- SIM (1)
- NÃO (0)
- PULADO (PULADO)

16.radioterapia nos últimos 6 meses

Question Type= radio

Data Field Name : radioterapia_6meses

Choose one response:

- SIM (1)
- NÃO (0)
- PULADO (PULADO)

17.QT NO ULTIMO MES

Question Type= radio

Data Field Name : QT_30DIAS

Choose one response:

- SIM (SIM)
- NÃO (NAO) If this response, jump to 20
- SEM INFORMAÇÃO (SEM_INFORMACAO) If this response, jump to 20
- PULADO (PULADO)

18.Quimioterápicos da ultima sessão

Question Type= Text

Data Field Name : Quimoterapico_ultimos

19.data da última sessão quimioterápico1

Question Type= date

Data Field Name : Dt_ultimoQT

20. DADOS DE GRAVIDADE DA ICS

21.Necessidade de terapia intensiva devido a ICS

(Solicitação de UTI, reposição volêmica, uso de aminas (nora, dobutamina), suporte ventilatório devido à ICS atual, no momento da coleta da hemocultura ou nas 48h próximas)

Question Type= radio

Data Field Name : NECESSIDADE_DE_UTI

Choose one response:

- SIM (1)
- NÃO (0)
- SEM INFORMACAO (SEM_INFORMACAO)
- PULADO (PULADO)

22. DADOS SOBRE TRATAMENTO

23.USO DE ANTIMICROBIANO (ANTIBACTERIANO E ANTIFUNGICO) 30 DIAS ANTES DA ICS

Question Type= radio

Data Field Name : USO_ATB_ULTIMOS30DIAS

Choose one response:

- SIM (1)

- NÃO (0)
- PULADO (PULADO)

24.USO DE ANTIFUNGICO PARA TRATAMENTO DA ICS ATUAL

Question Type= radio

Data Field Name : TRAT_ANTIFUNGICO_ICS_ATUAL

Choose one response:

- SIM (1)
- NÃO (0)
- PULADO (PULADO)

25.ESQUEMA INICIAL ADEQUADO

Question Type= radio

Data Field Name : ESQUEMA_INICIAL_ADEQUADO

Choose one response:

- SIM (1)
- NÃO (0)
- PULADO (PULADO)

26.ANTIFUNGICO1 INICIADO

Question Type= Text

Data Field Name : ANTIFUNGICO1

27.DATA DE INÍCIO ANTIFUNGICO1 (ATF)

Question Type= date

Data Field Name : DT_INICIO_ATF1

28.DATA DE TÉRMINO ATF1

Question Type= date

Data Field Name : DATA_TERMINO_ATF1

29.POSOLOGIA ATF1

Question Type= Text

Data Field Name : POSOLOGIA_ATF1

30.ATF1 FOI EMPIRICO?

Question Type= radio

Data Field Name : ATF1_EMPIRICO

Choose one response:

- SIM (1)
- NÃO (0)
- PULADO (PULADO)

31.ANFIFUNGICO2 INICIADO

Question Type= Text

Data Field Name : ANTIFUNGICO2

32.DATA DE INÍCIO ATF2

Question Type= date

Data Field Name : DATA_INICIO_ATF2

33.DATA DE TÉRMINO ATF2

Question Type= date

Data Field Name : DATA_TERMINO_ATF2

34.POSOLOGIA ATF 2

Question Type= Text

Data Field Name : POSOLOGIA_ATF2

35.ATF2 FOI EMPIRICO?

Question Type= radio

Data Field Name : ATF2_EMPIRICO

Choose one response:

- SIM (1)
- NÃO (0)
- PULADO (PULADO)

36.RETIRADA CAT VASC

Question Type= radio

Data Field Name : RETIRADA_CAT_VASC

Choose one response:

- SIM (1)
- NÃO (0)
- NA (NA)
- PULADO (PULADO)

37.DATA DE RETIRADA CAT VASC

Question Type= date

Data Field Name : DATA_RETIRADA_CAT_VASC

38.TROCA CAT VESICAL

Question Type= radio

Data Field Name : TROCA_CAT_VESICAL

Choose one response:

- SIM (1)
- NÃO (0)
- NA (99)
- PULADO (PULADO)

39.DATA RET CAT VESICAL

Question Type= date

Data Field Name : DATA_RET_CAT_VESICAL

40.DRENAGEM ABSCESSO

Question Type= radio

Data Field Name : DRENAGEM_ABSCESSO

Choose one response:

- SIM (1)
- NAO (0)
- NA (99)
- PULADO (PULADO)

41.DATA DA DRENAGEM ABSCESSO

Question Type= date

Data Field Name : DATA_DRENAGEM_ABSCESSO

42.RETIRADA DE PRÓTESE

Question Type= radio

Data Field Name : RETIRADA_PROTESE

Choose one response:

- SIM (1)
- NÃO (0)
- NA (99)
- PULADO (PULADO)

43.DATA RETIRADA DE PRÓTESE

Question Type= date

Data Field Name : DATA_RETIRADA_PROTESE

44.COMPLICAÇÕES AO LONGO DA ICS

Question Type= checkbox

Data Field Name : COMPLICACOES

Choose all that apply:

- ABSCESSO (ABSCESSO)
- MENINGITE (MENINGITE)
- ENDOCARDITE (ENDOCARDITE)
- TROMBOFLEBITE (TROMBOFLEBITE)
- NENHUMA (NENHUMA)
- OUTRAS (OUTRAS)

45.OUTRAS COMPLICAÇÕES

Question Type= Text

Data Field Name : OUTRAS_COMPLICACOES

46.ATF APÓS O RESULTADO DA HCT

Question Type= radio

Data Field Name : ATF_APOS_HCT

Choose one response:

- NÃO DESCALONOU (N_O_DESCALONOU)
- DESCALONOU GUIADO (DESCALONOU_GUIADO)
- DESCALONOU PARCIAL (DESCALONOU_PARCIAL)
- ESCALONOU GUIADO (ESCALONOU_GUIADO)
- ESCALONOU EMPIRICO (ESCALONOU_EMPIRICO)
- MANTEVE GUIADO (MANTEVE_GUIADO)
- NA (NA)
- PULADO (PULADO)

47. EVOLUÇÃO CLÍNICA

48.ÓBITO

Question Type= radio

Data Field Name : OBITO

Choose one response:

- SIM (1)
- NÃO (0)

49.ÓBITO ASSOCIADO Á ICS

(aquele ocorrido em 7 dias da ICS, sem outra causa detectada)

Question Type= radio

Data Field Name : OBITO_ASSOCIADO

Choose one response:

- SIM (1)

- NÃO (0)

50.ALTA

Question Type= radio

Data Field Name : ALTA

Choose one response:

- SIM (1)

- NÃO (0)

51.DATA DO DESFECHO EM 30 DIAS

Question Type= date

Data Field Name : DATA_DESFECHO_30DIAS

52.PERMANECEU INTERNADO APOS 30 DIAS DA DATA DA ICS

Question Type= radio

Data Field Name : INTERNADO_APOS30DIAS

Choose one response:

- SIM (1)

- NÃO (0)

APÊNDICE B – FICHA DE INVESTIGAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE INFECÇÃO POR
Candida não-albicans incomum

CODEBOOK for form: BSI_INCA_MICOLOGIA_FORM2

Description	
Created	2019-01-28 18:08:19.0
Last edited	2019-05-02 18:03:39.0
Owner	alessa.leal@hotmail.com
Tags	
GPS stamp	no
Questions	58

1. A) DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

2.REGISTRO LABORATÓRIO

Question Type= Text

Data Field Name : Laboratório

3.NUMERO DO PRONTUARIO

Question Type= Text

Data Field Name : Prontuario

4.DATA DE NASCIMENTO

Question Type= date

Data Field Name : DN

5.GENERO

Question Type= radio

Data Field Name : GENERO

Choose one response:

- FEMININO (1)
- MASCULINO (0)

6.DATA DA COLETA HEMOCULTURA

Question Type= date

Data Field Name : DATA_HEM

7.SERVIÇO QUE PERTENCE

Question Type= radio

Data Field Name : SERVICO

Choose one response:

- ONCOLOGIA ADULTO (ONCOLOGIA_ADULTO)
- ONCOLOGIA PEDIATRICA (ONCOLOGIA_PEDIATRICA)
- HEMATOLOGIA ADULTO (HEMATOLOGIA_ADULTO)
- HEMATOLOGIA PEDIATRICA (HEMATOLOGIA_PEDIATRICA)
- ABDOME (ABDOME)
- UROLOGIA (UROLOGIA)
- NEUROCIRURGIA (NEUROCIRURGIA)
- CABEÇA E PESCOÇO (CABE_A_E_PESCO_O)
- TORAX (TORAX)
- PLASTICA (PLASTICA)
- HCII (HCII)
- HCIII (HCIII)
- HCIV (HCIV)

8.DOENÇA DE BASE

Question Type= radio

Data Field Name : DOENCA_BASE

Choose one response:

- ANGIOFIBROMA (ANGIOFIBROMA) If this response, jump to 10
- APLASIA DE MEDULA (APLASIA_DE_MEDULA) If this response, jump to 10
- ASTROCITOMA (ASTROCITOMA) If this response, jump to 10
- CA ASSOALHO BOCA (CA_ASSOALHO_BOCA) If this response, jump to 10
- CA BEXIGA (CA_BEXIGA) If this response, jump to 10
- CA CANAL ANAL (CA_CANAL_ANAL) If this response, jump to 10
- CA CAVUM (CA_CAVUM) If this response, jump to 10
- CA CECO (CA_CECO) If this response, jump to 10
- CA CERVICAL (CA_CERVICAL) If this response, jump to 10
- CA CANAL (CA_CANAL) If this response, jump to 10
- CA DE BEXIGA (CA_DE_BEXIGA) If this response, jump to 10
- CA CAVUM (CA_CAVUM_)
- CA CECO (CA__CECO) If this response, jump to 10
- CA CERVICAL (CA_CERVICAL_)
- CA BEXIGA (CA_BEXIGA_)
- CA DE COLON (CA_DE_COLON) If this response, jump to 10
- CA DE PROSTATA (CA_DE_PROSTATA) If this response, jump to 10
- CA ESOFAGO (CA_ESOFAGO) If this response, jump to 10
- CA GASTRICO (CA_GASTRICO) If this response, jump to 10
- CA GENGIVA (CA_GENGIVA) If this response, jump to 10
- CA GLOTE (CA_GLOTE) If this response, jump to 10
- CA INTESTINAL (CA_INTESTINAL) If this response, jump to 10
- CA LARINGE (CA_LARINGE) If this response, jump to 10
- CA LINGUA (CA_LINGUA) If this response, jump to 10
- CA MAMA (CA_MAMA) If this response, jump to 10
- CA MUCOJUGAL (CA_MUCOJUGAL) If this response, jump to 10
- CA NEURONDOCRINO (CA_NEURONDOCRINO) If this response, jump to 10
- CA ORAL (CA_ORAL) If this response, jump to 10

- CA OROFARINGE (CA_OROFARINGE) If this response, jump to 10
- CA PANCREAS (CA_PANCREAS) If this response, jump to 10
- CA PULMAO (CA_PULMAO) If this response, jump to 10
- CA RETO (CA_RETO) If this response, jump to 10
- CA SEIO MAXILAR (CA_SEIO_MAXILAR) If this response, jump to 10
- CA SUPRAGOTE (CA_SUPRAGOTE) If this response, jump to 10
- CA SUPRARENAL (CA_SUPRARENAL) If this response, jump to 10
- CA TESTICULO (CA_TESTICULO) If this response, jump to 10
- CA TIREOIDE (CA_TIREOIDE) If this response, jump to 10
- CA TORAX (CA_TORAX) If this response, jump to 10
- COLANGIOCARCINOMA (COLANGIOCARCINOMA) If this response, jump to 10
- CRANIOFARINGIOMA (CRANIOFARINGIOMA) If this response, jump to 10
- EPENDIMONA (EPENDIMONA) If this response, jump to 10
- GERMINOMA (GERMINOMA_) If this response, jump to 10
- GLIOBLASTOMA (GLIOBLASTOMA_) If this response, jump to 10
- GLIOMA (GLIOMA) If this response, jump to 10
- HEPATOCARCINOMA (HEPATOCARCINOMA) If this response, jump to 10
- HIPERNEFROMA (HIPERNEFROMA) If this response, jump to 10
- LEIOMIOSSARCOMA (LEIOMIOSSARCOMA) If this response, jump to 10
- LH (LH) If this response, jump to 10
- LINFOMA (LINFOMA) If this response, jump to 10
- LINFOMA BURKITT (LINFOMA_BURKITT) If this response, jump to 10
- LINFOMA FOLICULAR (LINFOMA_FOLICULAR) If this response, jump to 10
- LINFOMA LINFOBLASTICO (LINFOMA_LINFOBLASTICO) If this response, jump to 10

- LIPOSSARCOMA RETROPERIOTNIAL (LIPOSSARCOMA_RETROPERIOTNIAL) If this response, jump to 10
- LLA (LLA) If this response, jump to 10
- LLC (LLC) If this response, jump to 10
- LMA (LMA_) If this response, jump to 10
- LMC (LMC) If this response, jump to 10
- LNH (LNH_) If this response, jump to 10
- MEDULOBLASTOMA (MEDULOBLASTOMA) If this response, jump to 10

- MENINGIOMA (MENINGIOMA) If this response, jump to 10
- MICOSE FUNGOIDE (MICOSE_FUNGOIDE) If this response, jump to 10
- MIELOMA (MIELOMA_) If this response, jump to 10
- NEUROBLASTOMA (NEUROBLASTOMA) If this response, jump to 10
- NEUROGLIOMA (NEUROGLIOMA) If this response, jump to 10
- OSTEOSARCOMA (OSTEOSARCOMA) If this response, jump to 10
- PNET (PNET) If this response, jump to 10
- POLIPOSE INTESTINAL FAMILIAR (POLIPOSE_INTESTINAL_FAMILIAR) If this response, jump to 10
- RABDOMIOSARCOMA (RABDOMIOSARCOMA) If this response, jump to 10
- RETINOBLASTOMA (RETINOBLASTOMA) If this response, jump to 10
- SARCOMA EWING (S_EWING) If this response, jump to 10
- S SEZARY (S_SEZARY) If this response, jump to 10
- SINDROME MIELODISPLASICA (SINDROME_MIELODISPLASICA) If this response, jump to 10
- TU CEREBRAL (TU_CEREBRAL) If this response, jump to 10
- TU CEREBELAR (TU_CEREBELAR) If this response, jump to 10
- TU TRONCO CEREBELAR (TU__TRONCO_CEREBELAR) If this response, jump to 10
- TU DESMOIDE (TU_DESMOIDE) If this response, jump to 10
- TU FOSSA POSTERIOR (TU_FOSSA_POSTERIOR) If this response, jump to 10
- TU GERMINATIVO DE TESTICULO (TU_GERMINATIVO_DE_TESTICULO) If this response, jump to 10
- TU HEPÁTICO (TU_HEP_TICO) If this response, jump to 10
- TU INTRACRANIANO (TU_INTRACRANIANO) If this response, jump to 10
- TU OPTICO (TU_OPTICO) If this response, jump to 10
- TU PINEAL (TU_PINEAL) If this response, jump to 10
- TU WILLMS (TU_WILLMS) If this response, jump to 10
- OUTRO (OUTRO)

9. OUTRA DOENÇA BASE

Question Type= Text

Data Field Name : OUTRA_DOENCA_BASE

10.TIPO DE NEOPLASIA

Question Type= radio

Data Field Name : TIPO_NEOPLASIA

Choose one response:

- T SOLIDO (1)
- HEMATOLOGICO (0)

11.Topografia do tumor sólido

Question Type= radio

Data Field Name : Topografia_tumor_solido

Choose one response:

- SNC (SNC)
- CP (CP)
- ABDOME (ABDOME)
- OCULAR (OCULAR)
- TÓRAX (T_RAX)
- TOC (TOC)
- URO (URO)
- MAMA (MAMA)
- GINECOLOGICO (GINECOLOGICO)

12. B) DADOS SOBRE A ICS

13.SETOR DE AQUISIÇÃO

Question Type= radio

Data Field Name : SETOR__AQUIS

Choose one response:

- 4A (4A)
- 4B (4B)
- 5A (5A)
- 5B (5B)
- 6A (6A)
- 6B (6B)
- 7A (7A)
- 7B (7B)
- 8A (8A)
- 8B (8B)
- CENTRO CIRURGICO (CENTRO_CIRURGICO)
- CTI ADULTO (CTI_ADULTO)
- UPO (UPO)
- EMERGENCIA ADULTO (EMERG_ADULTO)
- EMERGENCIA PEDIATRICA (EMERG_PEDIATRICA)
- CTI PEDIATRICA (CTI_PEDIATRICA)
- AMBULATORIO ADULTO (AMBULATORIO_ADULTO)
- AMBULATORIO PEDIATRICO (AMBULATORIO_PEDIATRICO)
- COMUNIDADE (COMUNIDADE)
- INDEFINIDO (INDEFINIDO)

14.SETOR DE COLETA

Question Type= radio

Data Field Name : SETOR_COLETA

Choose one response:

- 4A (4A)
- 4B (4B)
- 5A (5A)
- 5B (5B)
- 6A (6A)

- 6B (6B)
- 7A (7A)
- 7B (7B)
- 8A (8A)
- 8B (8B)
- CENTRO CIRURGICO (CENTRO_CIRURGICO)
- CTI ADULTO (CTI_ADULTO)
- UPO (UPO)
- EMERGENCIA ADULTO (EMERG_ADULTO)
- EMERGENCIA PEDIATRICA (EMERG_PEDIATRICA)
- CTI PEDIATRICA (CTI_PEDIATRICA)
- AMBULATORIO ADULTO (AMBULATORIO_ADULTO)
- AMBULATORIO PEDIATRICO (AMBULATORIO_PEDIATRICO)
- COMUNIDADE (COMUNIDADE)
- INDEFINIDO (INDEFINIDO)

15.INTERNAÇÃO DEVIDO ICS

Question Type= radio

Data Field Name : INTERNA_POR_ICS

Choose one response:

- SIM (1)
- NÃO (0)

16.DATA DE INTERNAÇÃO

Question Type= date

Data Field Name : DATA_INT

17.DATA POSITIVAÇÃO DA HEMOCULTURA

Question Type= date

Data Field Name : DATA_POS_HEMOCULTURA

18.EPISODIO DA ICS

Question Type= radio

Data Field Name : Episodio_de_ICS

Choose one response:

- PRIMEIRO (PRIMEIRO)
- SEGUNDO (SEGUNDO)
- TERCEIRO (TERCEIRO)
- SEM INFORMACAO (SEM_INFORMACAO)

19.NEUTROPENIA FEBRIL

Question Type= radio

Data Field Name : NF

Choose one response:

- SIM (1)
- NÃO (0) If this response, jump to 23

20.NUMERO NEUTROFILOS

Question Type= numeric

Data Field Name : NUMERO_NEUTROFILOS

21.DATA DO INICIO DA NEUTROPENIA

Question Type= date

Data Field Name : DATA_INICIO_NEUTROPENIA

22.DATA DO FINAL DA NEUTROPENIA

Question Type= date

Data Field Name : DATA_FINAL_NEUTROPENIA

23.PROTEÍNA C REATIVA NO DIA DA COLETA DA HCT

Question Type= decimal

Data Field Name : PTNCREATIVA_DIA_HCT

24.TOPOGRAFIA DA ICS

Question Type= radio

Data Field Name : TOPOGRAFIA_ICS

Choose one response:

- PRIMARIA (PRIMARIA)
- SECUNDARIA (SECUNDARIA) If this response, jump to 27
- TOPOGRAFIA INDETERMIANDA (TOPOGRAFIA_INDETERMIANDA) If this response, jump to 32

25.ORIGEM DA INFECÇÃO PRIMARIA

Question Type= radio

Data Field Name : ORIGEM_INF_PRIMARIA

Choose one response:

- CVPERIFERICO (CVP)
- CVP_CP (CVP_CP)
- CLP_SEMI (CLP_SEMI)
- CLP_TI (CLP_TI)
- PICC (PICC)

- CHD (CHD)
- ENDOCARDITE (ENDOCARDITE) If this response, jump to 32
- INFUSÃO DE SOLUÇÃO (INFUSAO_SOL) If this response, jump to 32
- NPT (NPT) If this response, jump to 32
- HEMODERIVADO (HEMODERIVADO) If this response, jump to 32
- INDEFINIDA (INDEFINIDA) If this response, jump to 32
- CATETER ARTERIAL (CATETER_ARTERIAL_)
- CVP DISSECÇÃO (CVP_DISSEC__O)

26.SE SIM PARA CATETER VENOSO-SÍTIO DE PUNÇÃO

Question Type= radio

Data Field Name : CATETER_VENOSO_SITIO_PUNCAO

Choose one response:

- FEMURAL (FEMURAL) If this response, jump to 32
- SUBCLÁVIA (SUBCL_VIA) If this response, jump to 32
- JUGULAR INTERNA (JUGULAR_INTERNA) If this response, jump to 32
- MMSS (MMSS) If this response, jump to 32
- TÓRAX (T_RAX) If this response, jump to 32
- OUTRO (OUTRO) If this response, jump to 32

27.TOPOGRAFIA DA INFECÇÃO SECUNDARIA

Question Type= radio

Data Field Name : TOPOGRAFIA_INF_SECUNDARIA

Choose one response:

- ITU (ITU) If this response, jump to 32
- PNM (PNM) If this response, jump to 32
- PNM BRONCO-ASPIRAÇÃO (PNM_BRONCO_ASP) If this response, jump to 32
- PNM_VAP (PNM_VAP) If this response, jump to 32
- SINUSITE (SINUSITE) If this response, jump to 32

- ABDOME (ABDOME) If this response, jump to 29
- MUCOSITE (MUCOSITE) If this response, jump to 32
- DIARREIA (DIARREIA) If this response, jump to 32
- PARTES MOLES (PARTES_MOLES) If this response, jump to 29
- MENINGITE (MENINGITE) If this response, jump to 29
- VIAS BILIARES (VIAS_BILIARES) If this response, jump to 29
- OSTEOARTICULAR (OSTEOARTICULAR) If this response, jump to 29
- OUTRA (OUTRA)

28.OUTRA SECUNDARIA

Question Type= Text

Data Field Name : OUTRA_SECUNDARIA

29.ICS POR CIRURGIA INFECTADA

Question Type= radio

Data Field Name : CIRURGIA_INFECTADA

Choose one response:

- SIM (1)
- NÃO (0) If this response, jump to 32

30.DATA CIRURGIA INFECTADA

Question Type= date

Data Field Name : DATA_CIRURGIA_INFECTADA

31. C) DADOS MICROBIOLÓGICOS

32.NUMERO DE AMOSTRAS COLETADAS

Question Type= numeric

Data Field Name : NUMERO_COLETADAS

33.NUMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS

Question Type= numeric

Data Field Name : NUMERO_POSITIVAS

34.FRASCO COLETADO

Question Type= radio

Data Field Name : FRASCO_COLETADO

Choose one response:

- (AEROB)+(AEROB)+(FUNGO) (AEROB_AEROB_FUNGO)
- FUNGO (FUNGO)
- SEM INFORMACAO (SEM_INFORMACAO)

35.TIPO DE FRASCO POSITIVO

Question Type= radio

Data Field Name : TIPO_FRASCO_POSITIVO

Choose one response:

- AEROBIO (AEROB)
- ANAEROBIO (ANAER)
- FUNGO (FUNGO)
- AEROBIO+FUNGO (AEROB_FUNGO)
- AEROBIO+AEROBIO+FUNGO (AEROB_AEROB_FUNGO)
- SEM INFORMACAO (SEM_INFORMACAO)

36.ORIGEM DA AMOSTRA POSITIVA

Question Type= radio

Data Field Name : AMOSTRAS_POSITIVAS

Choose one response:

- PAREADAS (SP+CLPSEMI) (PAREADAS_SP_CLPSEMI)
- PAREADAS (SP+CLPTI) (PAREADAS_SP_CLPTI)
- PAREADAS (SP+PICC) (PAREADAS_SP_PICC)
- SP (SP) If this response, jump to 40
- CCP (CCP) If this response, jump to 40
- CLP_SEMI (CLP_SEMI) If this response, jump to 40
- CLP_TI (CLP_TI) If this response, jump to 40
- PICC (PICC) If this response, jump to 40
- PAREADAS (SP+CCP) (PAREADAS__SP_CCP_)

37.CRITERIO TEMPORAL

(CONSIDERAR SEMI, TI, E PICC)

Question Type= radio

Data Field Name : CRITERIO_TEMPORAL

Choose one response:

- SIM (1)
- NÃO (0)

38.TEMPO POSITIVAÇÃO SP PAREADO EM HORAS

Question Type= numeric

Data Field Name : POS_SP_MINUTOS

39.TEMPO DE POSITIVAÇÃO CLP PAREADO EM HORAS

(SIDERAR SEMI, TI, E PICC)

Question Type= numeric

Data Field Name : TEMPO_CLP_MINUTOS

40.TEMPO POSITIVAÇÃO AMOSTRA NÃO PAREADA

Question Type= numeric

Data Field Name : TEMPO_POS_AMOSTRA_NAO_PAREADA

41.MICRORGANISMO DE INFECÇÃO MONOMICROBIANA

Question Type= radio

Data Field Name : MICRORGANISMO_INFEC_MONO

Choose one response:

- C. parapsilosis (C__parapsilosis)
- C. tropicalis (C__tropicalis)
- C. dubliniensis (C__dubliniensis)
- Meyerozyma guilliermondii (Meyerozyma_guilliermondii)
- Wickerhamomyces anomalus = Pichia anomala (Wickerhamomyces_anomalus)
- C.haemulonis var vulnera (C_haemulonis_var_vulnera)
- Meyerozyma caribbica = anamorfo C. fermentati (Meyerozyma_caribbica)
- Kluyveromyces marxianus = C. kefir (Kluyveromyces__marxianus)
- Clavispora lusitaniae = C. lusitaniae (Clavispora_lusitaniae)
- C.haemulonii (C_haemulonii)
- C. guilliermondii (C__guilliermondii)
- S.cerevisae (S_cerevisae)
- K.ohmeri (K_ohmeri)
- Debaryomyces hansenii (Debaryomyces_hansenii)
- C.intermedia (C_intermedia)
- C.lusitaniae (C_lusitaniae)
- OUTROS (OUTROS)

42.MULTIRRESISTENTE

Question Type= radio

Data Field Name : MDR

Choose one response:

- SIM (1)
- NÃO (0) If this response, jump to 43
- NA (NA)

43. D) PERFIL DE SENSIBILIDADE

44.TSA

Question Type= checkbox

Data Field Name : TSA

Choose all that apply:

- R AMP/SULB (R_AMP_SULB)
- R FLUCONAZOL (R_FLUCONAZOL)
- R VORICONAZOL (R_VORICONAZOL)
- R CASPOFUNGINA (R_CASPOFUNGINA)
- R MICAFUNGINA (R_MICAFUNGINA)
- R ANFOTERICINA B (ANFOTERICINA_B)
- R ITRACONAZOL (R_ITRACONAZOL)
- R POSACONAZOL (R_POSACONAZOL)

45.MIC FLUCONAZOL

Question Type= decimal

Data Field Name : MIC_FLUCONAZOL

46.MIC VORICONAZOL

Question Type= decimal

Data Field Name : MIC_VORICONAZOL

47.MIC POSACONAZOL

Question Type= decimal

Data Field Name : MIC_POSACONAZOL

48.MIC CASPOFUNGINA

Question Type= decimal

Data Field Name : MIC_CASPOFUNGINA

49.MIC MICAFUNGINA

Question Type= decimal

Data Field Name : MIC_MICAFUNGINA

50.MIC ANFB

Question Type= decimal

Data Field Name : MIC_ANFB

51.MIC_ITRACONAZOL

Question Type= decimal

Data Field Name : MIC_ITRACONAZOL

52.TSA2

Question Type= checkbox

Data Field Name : TSA_2

Choose all that apply:

- R AMP/SULB (R_AMP_SULB)
- R FLUCONAZOL (R_FLUCONAZOL)
- R VORICONAZOL (R_VORICONAZOL)
- R CASPOFUNGINA (R_CASPOFUNGINA)
- R MICAFUNGINA (R_MICAFUNGINA)
- R ANIDULAFUNGINA (R_ANIDULAFUNGINA)
- R ANFOTERICINA B (ANFOTERICINA_B)
- R ITRACONAZOL (R_ITRACONAZOL)
- R POSACONAZOL (R_POSACONAZOL)

53. E) INVASÕES E SUPORTES NO ÚLTIMO MÊS

54.ACESSO VASCULAR PROFUNDO

Question Type= radio

Data Field Name : ACESSO_VASC_PROF_1MES

Choose one response:

- SIM (1)
- NÃO (0)
- SI (99)

55.HEMODIALISE

Question Type= radio

Data Field Name : HD

Choose one response:

- SIM (1)

- NÃO (0)

- SI (99)

56.NUTRIÇÃO PARENTERAL

Question Type= radio

Data Field Name : NPT

Choose one response:

- SIM (1)

- NÃO (0)

- SI (99)

57.VENTILAÇÃO MECÂNICA

Question Type= radio

Data Field Name : VENTIL_MECANICA

Choose one response:

- SIM (1)

- NÃO (2)

- SI (99)

58.FINAL DOS QUEST

Question Type= radio

Data Field Name : FINAL_DO_QUESTION

Choose one response:

- SIM (1)
- NÃO (0)

APÊNDICE C – Artigo 1. A case-series of bloodstream infections caused by the *Meyerozyma guilliermondii* species complex at a reference center of oncology in Brazil.

CHAVES, A. L. S.; ZAJC, L.; ALVES, G. M.; FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G.; BRITO-SANTOS, F.; COELHO, R. A.; MARTINS, I. S.; ALMEIDA-PAES, R.

Medical Mycology, v. 59, n. 3, p. 235–243, mar. 2021



Original Article

A case-series of bloodstream infections caused by the *Meyerozyma guilliermondii* species complex at a reference center of oncology in Brazil

Alessandra Leal Silva Chaves^{1,2,*}, Luciana Trilles², Gabriela Machado Alves², Maria Helena Galdino Figueiredo-Carvalho², Fábio Brito-Santos², Rowena Alves Coelho², Ianick S. Martins^{3,4} and Rodrigo Almeida-Paes²

¹Clinical Pathology Laboratory, HCI, National Cancer Institute, Rio de Janeiro, Brazil, ²Mycology Laboratory, Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, ³Nosocomial Infection Surveillance and Control Program, National Cancer Institute, Rio de Janeiro, Brazil and ⁴Medical School of Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil

*To whom correspondence should be addressed. Alessandra L. S. Chaves, National Cancer Institute - Laboratório de Patologia Clínica – Praça da Cruz Vermelha, 23 - 3º andar, Rio de Janeiro – RJ – Brasil – CEP 20230-130. Tel: +55-21-3207-1621-55-21-99355-4946; E-mail: alessandra.chaves@inca.gov.br

Received 18 March 2020; Revised 6 May 2020; Accepted 12 May 2020; Editorial Decision 11 May 2020

Abstract

Bloodstream infections (BSI) caused by *Candida* species are the fourth cause of healthcare associated infections worldwide. Non-*albicans* *Candida* species emerged in the last decades as agents of serious diseases. In this study, clinical and microbiological aspects of six patients with BSI due to the *Meyerozyma (Candida) guilliermondii* species complex from an oncology reference center in Brazil, were evaluated. To describe demographic and clinical characteristics, medical records of the patients were reviewed. Molecular identification of the isolates was performed by ITS1-5.8S-ITS2 region sequencing. Antifungal susceptibility was evaluated by the EUCAST method and the minimal inhibitory concentrations (MIC) assessed according to the epidemiological cutoff values. Virulence associated phenotypes of the isolates were also studied. Ten isolates from the six patients were evaluated. Five of them were identified as *Meyerozyma guilliermondii* and the others as *Meyerozyma caribbica*. One patient was infected with two *M. caribbica* isolates with different genetic backgrounds. High MICs were observed for fluconazole and echinocandins. Non-wild type isolates to voriconazole appeared in one patient previously treated with this azole. Additionally, two patients survived, despite infected with non-wild type strains for fluconazole and treated with this drug. All isolates produced hemolysin, which was not associated with a poor prognosis, and none produced phospholipases. Aspartic proteases, phytase, and esterase were detected in a few isolates. This study shows the reduced antifungal susceptibility and a variable production of virulence-related enzymes by *Meyerozyma* spp. In addition, it highlights the poor prognosis of neutropenic patients with BSI caused by this emerging species complex.

Lay Abstract

Our manuscript describes demographic, clinical and microbiological characteristics of patients with bloodstream infection by the *Meyerozyma guilliermondii* species complex at a reference center in oncology in Brazil.

Key words: Candidemia, *Candida guilliermondii*, oncology, ITS, antifungal susceptibility, virulence.

Introduction

Bloodstream infections (BSI) caused by *Candida* species currently represents a frequent group of healthcare associated infections (HCAI), with high rates of associated mortality.^{1,2} In recent years, less frequent non-*albicans* *Candida* (NAC) species, such as *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida lusitanae*, *Candida famata*, *Candida auris*, and *Candida haemulonii*, have been reported as emerging agents of BSI in patients with cancer.² Reasons for this emergence are not well established yet. However, they may be associated with the better sensitivity of diagnostic methods and species identification tools.³ BSIs due to NACs have been attributed to prolonged hospitalizations of susceptible patients and previous use of antifungal drugs.^{2,3}

The *C. guilliermondii* species complex is a set of genetically heterogeneous but phenotypically indistinguishable species belonging to the order Saccharomycetaceae. Its members represent a group of yeasts that have been broadly found in nature, soil, water, and plants.^{4,5} Molecular studies have recently placed the members of this complex into the genus *Meyerozyma*. The closely related yeast species belonging to this complex are *Meyerozyma caribbica* (formerly *Candida fermentati*), *Meyerozyma guilliermondii* (formerly *C. guilliermondii*), and *Meyerozyma carpophila* (formerly *C. guilliermondii* var. *carpophila*, or *Candida xestobii*).⁵⁻⁷ These species can be isolated from a variety of environmental sources, and they also may be part of the cutaneous microbiota of humans. They can cause skin infections, onychomycosis, and have emerged as important causes of fungemia in patients with cancer. These species usually have low susceptibility to the antifungal drugs, particularly fluconazole, and relatively high MICs to echinocandins, which can be associated with unfavorable outcomes of the infections caused by these agents.^{3,8,9}

Patients with solid tumors, hematologic malignancies, chemotherapy, neutropenia, bone marrow transplantation, intravascular catheter, intensive care unit hospitalization, prior colonization, and prolonged use of antifungals have elevated risk to acquire fungemia.⁵ However, research on unusual yeasts such as the *M. guilliermondii* species complex in the clinical, epidemiological and laboratorial context is scarce.¹⁰⁻¹² Therefore, the aim of this study is to describe clinical and microbiological features of a case-series of BSI caused by members of the *M. guilliermondii* species complex in patients with cancer of a reference center of oncology, in Rio de Janeiro, Brazil.

Methods

Ethics statement

The Research Ethics Committees of the institutions involved in this research approved the research study protocol. The registration number of this study is CAAE: 60 385 416.1.0000.5274.

Study design

This is a retrospective case-series of BSI caused by *M. guilliermondii* species complex identified by molecular methods in a collection of less frequent NAC yeasts isolated from adult patients treated at the National Cancer Institute (INCA-HCI) from 9 January 2014 to 29 April 2016.

Clinical data of patients

The clinical data of patients presenting yeast isolates from blood cultures identified as members of the *M. guilliermondii* species complex were obtained by reviewing their medical records. Variables collected were sex, age, underlying disease as recorded by the physician of the patient in the chart, source of BSI (primary: without a clinically defined focus of infection, or secondary: related to extravascular focus of infection),¹³ previous use of antifungal drugs 30 days before the first BSI episode, presence of neutropenia (absolute neutrophil count [ANC] < 500 cells/mm³) and severe neutropenia (ANC < 100 cells/mm³),¹⁴ treatment and outcomes after 30 days of the first BSI episode. These data were inserted in a Magpi data collection form developed by the researchers of this study (<https://home.magpi.com>).

Molecular identification

Forty-three NAC yeast isolates were recovered from storage (at a -20°C freezer) and grown on Sabouraud Dextrose Agar (Difco, Becton-Dickinson and Company, Sparks, MD USA) at 37°C for 48 h. These isolates were identified at species level by the DNA barcoding technique, with the amplification and sequencing of the ITS1-5.8S-ITS2 region of the rDNA as previously described,¹⁵ using the primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCCG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Polymerase chain reaction (PCR) products were purified using the QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN®, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions and sequenced at the Platform for DNA Sequencing PDTIS/Fiocruz, which uses the ABI-3730 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequences were edited using the Sequencher™ version 4.9 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA), aligned and analyzed with MEGA 6.06¹⁶ and compared with sequences available from the CBS fungal database (<http://www.wi.knaw.nl/Collections>). Two different sequences from each isolate were analyzed, in order to confirm polymorphisms. Isolates belonging to the *M. guilliermondii* species complex were selected for further analyses.

Yeast isolates

Selected isolates were grown on Sabouraud Dextrose Agar (Difco, Becton-Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) and CHROMagar *Candida* medium (Difco, Becton-Dickinson and Company), at 37°C for 48 h in order to evaluate their viability

and purity, respectively. The biochemical profile in the VITEK-2[®] system (bioMerieux, Marcy-l'Étoile, France) using the YST card for identification of yeast species was also reevaluated to assure that all isolates were tested using the same YST card batch and VITEK-2[®] software version. The isolates were deposited at the Collection of Pathogenic Fungi (National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas/FIOCRUZ), numbers CFP 00915 to CFP 00924. *Candida krusei* ATCC 6299 and *Candida parapsilosis* ATCC 22 019 were used as control strains in the antifungal experiments. *Candida albicans* ATCC 18 804 and *Cryptococcus neoformans* H99 reference strains were used as controls in the virulence experiments.

Antifungal susceptibility testing

The broth microdilution method for yeasts described by EUCAST¹⁷ was used for the antifungal susceptibility testing. The plates contained serial twofold dilutions of amphotericin B (AMB), fluconazole (FCZ), itraconazole (ICZ), voriconazole (VCZ), posaconazole (PCZ), caspofungin (CFG), and micafungin (MFG). Minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined after 24 h of incubation at 35°C, using a microplate spectrophotometer (Epoch, Biotek, Vermont, USA). For AMB, the MICs were defined as the lowest concentration of the antifungal agent presenting more than 90% growth inhibition, and for azoles and echinocandins as the lowest drug concentration with an inhibition higher than 50% of fungal growth. The antifungal susceptibility test was done in triplicate to confirm the MICs. Since there are no clinical breakpoints defined for *M. guilliermondii* susceptibility, the MICs were interpreted by the epidemiological cutoff values (ECVs) provided by the EUCAST (https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/EUCAST_BP_ECOFF_v1.0_200204.pdf), and the isolates were classified as wild type or non-wild type.

Production of hydrolytic enzymes

The production of hemolysin, aspartic protease, phytase, esterase, and phospholipase were evaluated in Petri dishes containing specific media for each enzyme, as previously described.¹⁸ Aliquots (5 μ l) containing 1×10^6 yeasts/ml were added to the surface of each medium in triplicate. All plates were incubated for 7 days at 37°C. After incubation, the colony diameter (a) and precipitation zone diameter (b) were measured with a ruler. Enzymatic activities were expressed as the P_z value ($P_z = a/b$).¹⁸ The P_z value was classified into four categories: $P_z = 1$, no enzymatic activity; $0.999 \geq P_z \geq 0.700$, low enzymatic activity; $0.699 \geq P_z \geq 0.400$, medium enzymatic activity; $P_z \leq 0.399$, high enzymatic activity.¹⁹

Resistance to oxidative stress

The sensitivities of the isolates to hydrogen peroxide were measured using an agar plate diffusion assay, as previously described,²⁰ with a few modifications. In brief, yeast cells were mixed with warm Sabouraud Dextrose Agar (Difco, Becton-Dickinson and Company) to a final concentration of 1×10^6 yeasts/ml of culture medium. After the agar solidification in 150 mm diameter Petri dishes, four 5 mm diameter holes were punched in each plate, and 65 μ l of hydrogen peroxide 30% v/v (Proquimios, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) were added. Plates were incubated at 35°C and inhibition zones of growth were measured 7 days after incubation. This experiment was performed in quadruplicate, on two different occasions. The mean and standard deviations of the measurements were calculated.

Statistical analyses

The Phylogenetic tree was inferred by using the Neighbor Joining method based on the Tamura-Nei mode.¹⁶ GraphPad Prism 5 computer software[®] was used for correlation between the laboratorial data of isolates with clinical data of their patients, as well as for the comparison of virulence factors between the isolates, using the Kruskal-Wallis and Dunn tests. A $p < .05$ was considered significant.

Results

Patients

Six adult patients followed up at INCA-HCI, Rio de Janeiro, Brazil, were included in the present study. Four of them were male, and ages ranged from 19 to 51 years. Three patients were diagnosed with solid tumor and the others had hematologic diseases. Three of the BSI episodes were primary infections. Two patients died within 3 days of BSI detection; these were individuals who presented neutropenia related to haematological diseases (patients 1 and 2). These data are detailed in Table 1.

Identification of the yeast isolates

Ten *M. guilliermondii* species complex isolates were detected by fungal barcoding sequencing in the collection of 28 NAC yeasts isolated from adult patients from INCA. Five of them were identified as *M. guilliermondii* and the other five as *M. caribbica*. The VITEK-2[®] system reidentification of these 10 isolates revealed seven of them as *C. guilliermondii*, two as *C. famata*, and one as *C. peliculosa*, with identification scores of 92%–95%. They showed white and smooth colonies on the Sabouraud dextrose agar, and a light-pink pigment colony with a smooth texture on CHROMagar *Candida* chromogenic medium suggestive of *Candida* spp. Three isolates of *C. guilliermondii* and two isolates of *C. famata*, as identified by the VITEK-2[®] system, were identified

Table 1. Clinical data of patients with bloodstream infections caused by the *Meyerozyma guilliermondii* species complex followed at the National Cancer Institute, from January 2014 to April 2016.

Case number	Date of isolation	Age	Sex	Baseline disease	Source of BSI	Neutropenia ^a (ANC/mm ³)	Treatment	Outcome ^c (Time to death)
1	01/09/2014	51	F	Myeloid acute leukemia	Intestinal	Yes (236)	AMB	Died (Three days)
2	07/06/2015	19	M	Idiopathic aplastic anemia	Folliculitis	Yes (295)	VOR/MFG	Died (One day)
3	12/04/2015	27	M	Myeloid sarcoma of amygdala	Primary	No (6954)	VOR	Survived
4	12/12/2015	24	M	Seminoma	Pneumonia	No (8989)	FLU	Survived
5	12/13/2015	37	F	Uterine Carcinoma	Primary	No (11.691)	FLU	Survived
6	04/29/2016	34	M	Lymphoblastic lymphoma	Primary	Yes (Zero) ^b	AMB/MFG	Survived

M, male; F, female; BSI, bloodstream infection; ANC, absolute neutrophil count; AMB, amphotericin; VOR, voriconazole; FLU, fluconazole; MFG, micafungine.

^aNeutrophils < 500 cells/mm³.

^bSevere neutropenia, defined as ANC < 100 cells/mm³.

^cMortality within 30 days.

Table 2. Identification results of ten yeast isolates from bloodstream infection in patients from the National Cancer Institute by the Vitek 2[®] system and internal transcriber spacer (ITS) sequencing.

Case number	Isolate	VITEK-2 [®] identification	ITS identification
1	CFP00923	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
2	CFP00919	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma caribbica</i>
	CFP00920	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma caribbica</i>
	CFP00921	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma caribbica</i>
	CFP00922	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma caribbica</i>
3	CFP00915	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	CFP00916	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
4	CFP00918	<i>Candida famata</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
5	CFP00917	<i>Candida famata</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
6	CFP00924	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Meyerozyma caribbica</i>

through molecular analysis as *M. guilliermondii*, and four isolates of *C. guilliermondii* and one isolate of *C. pelliculosa* were identified as *M. caribbica*, with a score of 100% on Blast search at genbank database. These data are presented in Table 2. Two clear clades were demonstrated in the phylogenetic tree for the

ITS1-5.8S-ITS2 rDNA region of the yeast isolates (Fig. 1). The *C. carpophila* (CBS 5975) reference strain clustered close to the *M. caribbica* clade but with reduced branch lengths. One out of four isolates (CFP 00921) from a patient (#2) was genetically different from the others (CFP 00919, CFP 00920, CFP

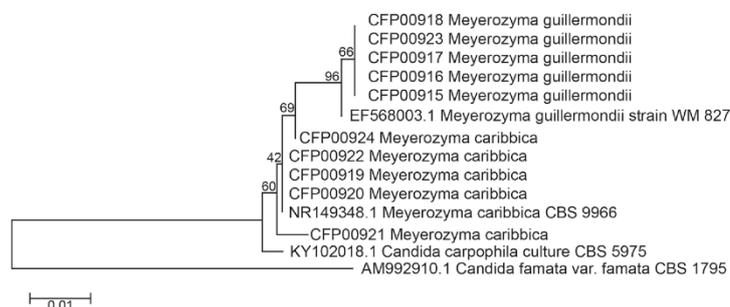
**Figure 1.** Phylogenetic analysis using the Neighbor Joining algorithm from the sequence of the internal transcriber spacer (ITS) region for the 10 bloodstream yeast isolates of *Meyerozyma* analyzed in this study, together with reference sequences of *Meyerozyma guilliermondii* (EF568003), *Meyerozyma caribbica* (NR149348), and *Candida carpophila* (KY149348) obtained from the GenBank database. The ITS sequence of *Candida famata* var. *famata* CBS 1795 strain (AM992910) was used as an outgroup. The numbers of the branches are bootstrap support values obtained from 1000 pseudo-repeats.

Table 3. Distribution of haplotypes after analysis of four Internal Transcriber Spacer DNA sequences from clinical isolates of *Meyerozyma caribbica* obtained from patient 2.

Isolates	Position	
	132	446
<i>M. caribbica</i> CBS9966*	C	T
CFP00919	.	.
CFP00920	.	.
CFP00921	A	G
CFP00922	.	.

A, adenine; G, guanine; C, cytosine; T, thymine.

(.) Means that sequence has the same nucleotide position.

*Reference strain.

00922) obtained from the same patient. Shifts from C to A in the 132 position and T to G in the 446 position of the sequence were observed in these isolates (Table 3). The ITS sequences obtained during this study were deposited in NCBI/GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) under the accession numbers MN658747 to MN658756.

Antifungal susceptibility

The MICs and ECVs are shown in Table 4. Amphotericin B showed low MIC values for both species (range 0.064–1 $\mu\text{g/ml}$). However, some non-wild type isolates were observed. Reduced susceptibilities to echinocandins were also found for some isolates of both species, with caspofungin presenting more variation in MIC values than micafungin. The voriconazole ECVs classified all ten isolates as non-wild type. A high number of

non-wild type isolates was also observed for the other azoles, especially fluconazole and posaconazole.

Virulence-related phenotypes

Phospholipase activity was not detected under the employed experimental conditions for any of the tested *M. guilliermondii* species complex isolates. The control *C. albicans* strain presented low production of this enzyme ($P_z = 0.83$), whereas the *C. neoformans* reference strain presented moderate activity of this enzyme ($P_z = 0.46$), as expected. All *Meyerozyma* isolates were able to produce hemolysin. Aspartic protease was detected in only one *M. guilliermondii* isolate ($P_z = 0.630$), from patient 1, which was classified as a good producer. Phytase production was detected in one *M. caribbica*, isolate from patient #6 ($P_z = 0.540$), considered as good producer. Esterase was produced in four isolates, three *M. guilliermondii* from patients 1, 3, and 5 (P_z ranging from 0.440 to 0.670); and one out of four *M. caribbica* isolates from patient 2 ($P_z = 0.590$). The esterase producing isolate (CFP 00921) from patient 2 presented also different ITS sequence comparing to the other three isolates from the same patient (Table 3). All isolates presented sensitivity to hydrogen peroxide, as demonstrated by the inhibition of fungal growth around the hole where this oxidant was added to the plates. Except from one isolate, the first obtained from patient #3, that was more resistant to the hydrogen peroxide (growth inhibition diameter of 20 mm, $P = .0008$), the growth inhibition diameter of the remaining isolates presented a regular pattern, ranging from 28 to 32 mm.

Table 4. Minimal inhibitory concentration values and classification of ten *Meyerozyma* spp. isolates from bloodstream infection at National Cancer Institute according to the methods and epidemiological cutoff values proposed by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

Species (n)	Antifungal agent	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		ECVs	
		Range	MIC ₅₀	WT (n)	Non-WT (n)
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (5)	AMB	0.064–1	0.125	3	2
	FLU	2–64	8	2	3
	ITR	0.064–4	1	1	4
	VOR	0.125–2	0.25	0	5
	POS	0.032–4	0.125	1	4
	CAS	0.5–4	2	-	-
	MFG	2–4	4	-	-
<i>Meyerozyma caribbica</i> (5)	AMB	0.125–0.25	0.25	2	3
	FLU	8–64	32	0	5
	ITRA	0.064–0.5	0.25	4	1
	VOR	0.5–4	1	0	5
	POS	0.064–0.5	0.25	1	4
	CAS	0.032–2	0.5	-	-
	MFG	1–2	2	-	-

MIC, minimum inhibitory concentration; MIC₅₀, MIC at which 50% of isolates are inhibited; ECV, epidemiological cutoff value; AMB, amphotericin B; FLU, fluconazole; ITRA, itraconazole; VOR, voriconazole; POS, posaconazole; CAS, caspofungin; MFG, micafungin; WT, wild type; Non-WT, non-wild type.

Table 5. Correlation of antifungal susceptibility, virulence phenotype categorization, and outcome of patients with bloodstream infection by *Meyerozyma guilliermondii* species complex at National Cancer Institute.

Case number	Isolate	Species	Hemolysin	Esterase	Phytase	Asp. Protease	Previous antifungal	Treatment	ECVs ^a	Outcome ^b
1	CFP00923	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Medium	Medium	ND ^c	Medium	FLU/ANI/MFG	AMB	WT	Died
2	CFP00919	<i>Meyerozyma caribbica</i>	Medium	ND	ND	ND	FLU/AMB	VOR/MFG ^d	Non-WT/-	Died
	CFP00920	<i>Meyerozyma caribbica</i>	Medium	ND	ND	ND			Non-WT/-	
	CFP00921	<i>Meyerozyma caribbica</i>	Medium	medium	ND	ND			Non-WT/-	
	CFP00922	<i>Meyerozyma caribbica</i>	Medium	ND	ND	ND			Non-WT/-	
3	CFP00915	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Medium	Medium	ND	ND	ANI/VOR	ANI ^c	-	Survived
	CFP00916	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Medium	ND	ND	ND			-	
4	CFP00918	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	High	ND	ND	ND	No	FLU	Non-WT	Survived
5	CFP00917	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	High	Medium	ND	ND	No	FLU	Non-WT	Survived
6	CFP00924	<i>Meyerozyma caribbica</i>	Low	ND	Medium	ND	NA	AMB/MFG ^d	WT/-	Survived

^aClassification of the isolates according to the epidemiological cutoff value (ECV) of the antifungal drugs used to treat the bloodstream infection.

^bMortality within 30 days.

^cND, not detected.

^dNo ECV defined in EUCAST.

Correlation between clinical and microbiological features

Table 5 shows the classification of the isolates according to their microbiological features herein evaluated, together with the outcome of the patients. As mentioned before (Table 1), patients 1 and 2 died shortly, up to 3 days, after the diagnosis of BSI. Both patients had neutropenia associated with hematological neoplasm at the time of fungemia diagnosis. Patient 1 was treated for the BSI episode with AMB and his isolate was identified as *M. guilliermondii*. This isolate was wild type for AMB and moderate producer of aspartic protease, hemolysin, and esterase. Patient 1 was under MFG prophylaxis to BSI, and the isolate showed an elevated MIC for this echinocandin (4 µg/ml). The four isolates (CFP00919, CFP00920, CFP 00921, CFP00922) obtained from patient 2, treated for the BSI with VCZ and MFG, were identified as *M. caribbica*. This patient has used AMB and FLU previously to the BSI episode. These four isolates were non-wild type for VCZ, had an elevated MIC for MFG (2 µg/ml) and FLU (8–64 µg/ml) but low MICs for AMB (0.125–0.25 µg/ml). The four isolates of this patient were medium hemolysin producers and one of them (CFP00921) was a moderate esterase producer. Four patients (3, 4, 5, and 6) survived after 30 days of BSI detection; three with isolation of *M. guilliermondii* and one with *M. caribbica*. These patients had solid organ tumors, most were non-neutropenic (3, 4, and 5); without use of antifungals in the 30 days before the BSI diagnosis. Isolates (CFP00918 and CFP00917) from two patients were non-wild type for FLU, the antifungal drug used in the treatment. The hemolysin production levels do not appear to be related to a worse prognosis in this study, since both patients infected with excellent producers of this enzyme survived.

Discussion

Species belonging to the *M. guilliermondii* species complex have been reported as emerging agents of invasive fungal infection in patients with cancer.^{5,21} This study describes clinical characteristics, antifungal susceptibility, and virulence profiles of *M. guilliermondii* and *M. caribbica* isolates obtained from BSI episodes occurred in patients with cancer from Rio de Janeiro, Brazil. Literature on *M. caribbica* is scarce compared to *M. guilliermondii* and past phylogenetic inferences did not include all members of the species complex, leaving doubts about fine characterization.^{4,22,23}

The genus *Meyerozyma* was proposed by Kurtzman²² from the combined sequences of the D1/D2 domains of the large subunit and the nearly complete small subunit rRNA genes to accommodate *Pichia guilliermondii* and *Pichia caribbica*. Fungal isolates from this study were identified through DNA barcoding marker by the Consortium for the Barcode of Life (CBOL) and the International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM). This is an attempt to obtain accurate species identification based on a comparative evaluation of taxonomically relevant sequences that has already found wide application in biology.²⁴ The ITS region was formally proposed as the primary fungal barcode marker. This is a region most likely to be successful in the identification of a largest variety of fungi, with the most clearly defined barcode difference among inter and intraspecific variations.²⁵ In our opinion, both ITS and D1/D2 regions can be used for identification of the *M. guilliermondii* complex.

The VITEK-2[®] system still present *M. guilliermondii* as *C. guilliermondii* in its result sheets, which can be a problem for clinicians or lab personnel unaware to the latest taxonomic

changes in the genus *Candida*. Also, VITEK-2[®] identification presented some differences from the molecular identification by ITS sequencing. A similar study was conducted in Korea, where 28 isolates of *C. famata* previously identified by the VITEK-2[®] system were molecularly identified as *C. guilliermondii*. Thus, the authors confirmed that *C. famata* is a rare cause of fungemia. This is likely to occur when different species have high similarity in biochemical reactions.²⁶ In recent studies, phenotypic methods initially identified yeast isolates as *C. famata*. However, after molecular analyses, these isolates were identified as *C. guilliermondii*, *C. lusitanae*, *C. parapsilosis*, and *C. palmioloephila*.^{27,28} The correct identification of *C. famata*, currently *Debaryomyces hansenii*, and the *M. guilliermondii* species complex, is important whereas that differences in antifungal susceptibility, especially with amphotericin B and fluconazole, are significant.²¹ Fortunately, in the present study, the misidentification occurred in patients 5 and 6 did not result in unfavorable outcomes. However, these findings enforce the recommendation that medical mycology laboratories should use molecular techniques for diagnosis of mycotic diseases to overcome the limitations of conventional methods.²⁶

Correct identification of the *M. guilliermondii* species complex and antifungal susceptibility testing seem sufficient to define the appropriate therapeutic choice for the patient's treatment. However, rational use of antifungal agents should be considered due to the possibility of resistance to the few drugs available for the treatment of infections caused by NACs. Considering that azoles and echinocandins are the first line treatment suggested by clinical guidelines for *Candida* spp.,^{12,29} caution is required for prophylactic administration of these drugs and additional vigilance should be directed when the *M. guilliermondii* species complex is present,⁸ because this complex exhibits poor sensitivity to these compounds.^{5,9} Lipid formulation of amphotericin B is an alternative when resistance to azoles and echinocandins is detected, but this is the last choice antifungal therapy.²⁹

The susceptibility results herein described showed low antifungal activity to fluconazole and echinocandins against all isolates of both species. No significant differences within species were observed. Higher MICs of fluconazole and echinocandins against the *M. guilliermondii* species complex were previously reported in the literature.^{21,30,31} In general, patients that have undergone antifungal treatment previously to the BSI presented high MICs to the agents used. One limitation of this study is that, due to the unavailability of purified anidulafungin for the *in vitro* antifungal susceptibility tests, this antifungal drug, used to treat two patients, was not tested. It was observed in this study that yeast isolates from the patients that used anidulafungin previously to the BSI had high MICs for MFG. Since anidulafungin and micafungin resistance usually occurs together in *Candida* isolates,³² we believe that the prophylactic use of anidulafungin led to the high MFG MICs in these isolates.

Similar results were reported in a rare case of fungemia by *C. guilliermondii* following umbilical cord blood transplantation during antifungal fluconazole prophylaxis. The authors demonstrated that the increased administration of prophylactic fluconazole appears to have caused a relatively higher incidence of more resistant NAC infection.³³

The patient 2, infected by *M. caribbica*, was treated with VCZ and MFG. This isolate was non-wild type for VCZ and showed an elevated MIC for MFG. This fact reinforces that the echinocandin resistance is likely to occur in this species and should be detected early to prevent an undesirable outcome.²⁹ This patient was infected by two different haplotypes of *M. caribbica*, as revealed by the clustering in the phylogenetic tree by ITS1-5.8S-ITS2 region of the rDNA sequencing. It is important to emphasize that analyzes of sequential isolates of the same patient should be performed due to possible differences in susceptibility and virulence profile, as observed previously with *Candida tropicalis*.³⁴ In the case herein reported, the mutant strain was a moderate producer of esterase, whereas the other *M. caribbica* isolates did not present detectable levels of this enzyme by the method used in this study.

The production of extracellular hydrolytic enzymes is one of the virulence factors expressed by *Candida*-related yeasts. Besides degradation of molecules from the host, the secretion of these enzymes also has the ability to regulate antifungal resistance of these organisms.³⁵⁻³⁷ In this investigation, hemolytic activity was detected in all isolates studied. This phenotype is one of the important mechanisms that contributes to the pathogenicity of *Candida* spp. and related species. It is related to the acquisition of iron, which is essential for the survival of yeasts.³⁷ Tolerance to oxidative stress is tightly linked to fungal defense during an infection. It has been shown that the antioxidant pathways of fungi, which include resistance to hydrogen peroxide, are important for their survival against attacks by neutrophils.^{38,39} In this study, these phenotype could not be associated to the patient's outcome. The two deceased patients presented neutropenia, which probably has contributed to their unfavorable outcomes.

Phospholipase activity was not detected under the employed experimental conditions for any of the tested yeast isolates. Similar results were described by others authors.^{12,40} For other hydrolytic enzymes, differences between species were observed. Some isolates of *M. guilliermondii* presented aspartic protease and esterase activity, whereas *M. caribbica* had esterase and phytase activity.

Esterase production was detected in few isolates from patients 1, 2, and 3. Sriphannam et al.⁴¹ did not find phospholipase and proteinase activities for *C. guilliermondii*, but some strains produced esterase activity. The role of this extracellular enzyme is the digestion of lipids used as a nutrient source by the fungus during host invasion.^{41,42} In the present study, two patients with hematologic disease, neutropenia, previous use

of antifungal drugs, and infected by esterase-producing isolates died shortly after *M. guilliermondii* species complex BSI diagnosis. This fact reinforces that this complex mainly affects patients with severe debilitating conditions.²¹ Another observation of the present study was a variable production for this enzyme by isolates from the same patient. Four isolates of *M. caribbica* were isolated from patient 2, but only one presented esterase production. Different esterase phenotypes were also observed in *M. guilliermondii* isolates from patient 3, however their ITS sequences were identical, showing that, in this study, differences in the esterase phenotype are not directly related to ITS diversity. A higher production of esterase was observed in micafungin susceptible *C. glabrata* strains.⁴⁰ This correlation was not observed in our study.

The small number of patients included and isolates tested is a limitation of this study. This can be explained by the fact that BSI due to the *M. guilliermondii* species complex usually correspond to approximately 2% of cases of fungemia among patients with cancer.^{6,43,44} This limitation precludes definitive conclusions about the relationship of virulence-related phenotypes and antifungal susceptibility with the outcome of infected patients. However, the results of this research study will increase the knowledge about some unusual *Candida*-related yeast species and improve further discussion about resistance and virulence of these yeasts.

Acknowledgments

The authors are grateful for the technical contribution of workers from the National Cancer Institute, Rio de Janeiro, Brazil, with patient's data and preservation of fungal isolates, and for automated nucleotide sequencing of the strains by the sequencing platform team (PDTIS/Fiocruz).

Funding

R.A.-P. was supported in part by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [CNPq 305487/2015-9].

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and the writing of the paper.

References

- Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Dromer F. The risk and clinical outcome of candidemia depending on underlying malignancy. *Intensive Care Med.* 2017; 43: 652–662.
- Bretagne S, Renaudat C, Desnos-Ollivier M et al. Predisposing factors and outcome of uncommon yeast species-related fungaemia based on an exhaustive surveillance programme (2002–14). *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72: 1784–1793.
- Taj-Aldeen SJ, AbdulWahab A, Kolecka A, Deshmukh A, Meis JF, Boekhout T. Uncommon opportunistic yeast bloodstream infections from Qatar. *Med Mycol.* 2014; 52: 549–553.
- de Marco L, Epis S, Capone A et al. The genomes of four *Meyerozyma caribbica* isolates and novel insights into the *Meyerozyma guilliermondii* species complex. *G3 Genes, Genomes, Genet.* 2018; 8: 755–759.
- Savini V, Catavittello C, Onofrillo D et al. What do we know about *Candida guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. *Mycoses.* 2011; 54: 434–441.
- Vaughan-Martini A, Kurtzman CP, Meyer SA, O'Neill EB. Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. nov., the ascospore state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila* comb. nov. *FEMS Yeast Res.* 2005; 5: 463–469.
- Yurkov AM, Dlačny D, Peter G. *Meyerozyma amylolytica* sp. nov. from temperate deciduous trees and the transfer of five *Candida* species to the genus *Meyerozyma*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017; 67: 3977–3981.
- Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. Identification and susceptibility profile of *Candida fermentati* from a worldwide collection of *Candida guilliermondii* clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 242–244.
- Taverna CG, Córdoba S, Vivot M et al. Reidentification and antifungal susceptibility profile of *Candida guilliermondii* and *Candida famata* clinical isolates from a culture collection in Argentina. *Med Mycol.* 2019; 57: 314–323.
- Montoya AM, Sánchez González A, Palma-Nicolás JP, Gómez-Treviño A, González JG, González GM. Genotyping, extracellular compounds, and antifungal susceptibility testing of *Trichosporon asahii* isolated from Mexican patients. *Med Mycol.* 2015; 53: 505–511.
- Tosun I, Akyuz Z, Guler N et al. Distribution, virulence attributes and antifungal susceptibility patterns of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from clinical samples. *Med Mycol.* 2013; 51: 483–492.
- Montoya AM, Luna-Rodríguez CE, Gracia-Robles G, Rojas OC, González GM. In vitro lytic activity and antifungal susceptibility of infrequently isolated yeasts. *Arch Microbiol.* 2019; 201: 1147–1149.
- CDC. *Bloodstream Infection Event (Central Line-Associated Bloodstream Infection and Non-central Line Associated Bloodstream Infection)*. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2020. Available at: <https://www.cdc.gov/nhsn/PDFs/pscManual/4PSC_CLABSCurrent.pdf>. Accessed February 10, 2020.
- Freifeld AG, Bow EJ, Sepkowitz KA et al. Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2011; 52: e56–93.
- Alcoba-Florez J, Del Pilar Arévalo M, González-Paredes FJ et al. PCR protocol for specific identification of *Candida nivariensis*, a recently described pathogenic yeast. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 6194–6196.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipitski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013; 30: 2725–2729.
- Arendrup MC MJ, Mouton JW, Lagrou K, Hamal P, Guinea J. EUCAST definitive document E.DEF 7.3.1. method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18: E246.
- Abi-Chacra EA, Souza LOP, Cruz LP et al. Phenotypical properties associated with virulence from clinical isolates belonging to the *Candida parapsilosis* complex. *FEMS Yeast Res.* 2013; 13: 831–848.
- Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Med Mycol.* 1982; 20: 7–14.
- Schmaler-Ripcke J, Sugareva V, Gebhardt P et al. Production of pyomelanin, a second type of melanin, via the tyrosine degradation pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75: 493–503.
- Marcos-Zambrano LJ, Puig-Asensio M, Pérez-García F et al. *Candida guilliermondii* complex is characterized by high antifungal resistance but low mortality in 22 cases of candidemia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61: e00099–17.
- Kurtzman CP, Suzuki M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. *Mycoscience.* 2010; 51: 2–14.
- Kurtzman CP, Robnett CJ. Relationships among genera of the *Saccharomycotina* (Ascomycota) from multigene phylogenetic analysis of type species. *FEMS Yeast Res.* 2013; 13: 23–33.
- Stielow JB, Lévesque CA, Seifert KA et al. One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia.* 2015; 35: 242–263.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S et al. The internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Fungal Barcoding Consortium. Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109: 6241–6246.

26. Kim SH, Shin JH, Mok JH et al. Misidentification of *Candida guilliermondii* as *C. famata* among strains isolated from blood cultures by the VITEK 2 system. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 250408.
27. Kim TH, Kweon OJ, Kim HR, Lee MK. Identification of uncommon *Candida* species using commercial identification systems. *J Microbiol Biotechnol*. 2016; 26: 2206–2213.
28. Meletiadis J, Arabatzis M, Bompola M et al. Comparative evaluation of three commercial identification systems using common and rare bloodstream yeast isolates. *J Clin Microbiol*. 2011; 49: 2722–2727.
29. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2015; 62: 1–50.
30. Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Sánchez C, Muñoz P, Bouza E, Guinea J. Antifungal resistance to fluconazole and echinocandins is not emerging in yeast isolates causing fungemia in a Spanish tertiary care center. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58: 4565–4572.
31. Pfaller MA, Diekema DJ, Mendez M et al. *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 3551–3556.
32. van der Geest PJ, Hunfeld NGM, Ladage SE, Groeneveld ABJ. Micafungin versus anidulafungin in critically ill patients with invasive candidiasis: a retrospective study. *BMC Infect Dis*. 2016; 16: 490.
33. Nakazawa H, Nishina S, Senoo Y et al. Breakthrough *Candida guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*) fungemia after cord blood transplantation for extranodal NK-cell lymphoma with azole prophylaxis. *Transpl Infect Dis*. 2018; 20: e12922.
34. Magri MMC, Gomes-Gouvêa MS, Teixeira de Freitas VL, Mota AL, Moretti ML, Shikanai-Yasuda MA. Multilocus sequence typing of *Candida tropicalis* shows the presence of different clonal clusters and fluconazole susceptibility profiles in sequential isolates from candidemia patients in São Paulo, Brazil. *J Clin Microbiol*. 2013; 51: 268–277.
35. Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol*. 2004; 6: 915–926.
36. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol*. 2011; 19: 241–247.
37. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 2013; 62: 10–24.
38. Leal SM, Vareechon C, Cowden S et al. Fungal antioxidant pathways promote survival against neutrophils during infection. *J Clin Invest*. 2012; 122: 2482–2498.
39. Zajc J, Gostinčar C, Gunde-Cimerman N. Stress-tolerant yeasts: opportunistic pathogenicity versus biocontrol potential. *Genes*. 2019; 10: 42.
40. Figueiredo-Carvalho MHG, Ramos LDS, Barbedo LS et al. Relationship between the antifungal susceptibility profile and the production of virulence-related hydrolytic enzymes in Brazilian clinical strains of *Candida glabrata*. *Mediators Inflamm*. 2017; 2017: 1.
41. Sriphannam C, Nuanmuang N, Saengsawang K, Amornthipayawong D, Kummasook A. Anti-fungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp. isolated from blood cultures. *J Mycol Med*. 2019; 29: 325–330.
42. Deorukhkar SC, Saini S, Mathew S. Virulence factors contributing to pathogenicity of *Candida tropicalis* and its antifungal susceptibility profile. *Int J Microbiol*. 2014; 2014: 1.
43. Castanheira M, Woosley LN, Diekema DJ, Jones RN, Pfaller MA. *Candida guilliermondii* and other species of *Candida* misidentified as *Candida famata*: Assessment by Vitek 2, DNA sequencing analysis, and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in two global antifungal surveillance programs. *J Clin Microbiol*. 2013; 51: 117–124.
44. Lan L, Xu J. Multiple gene genealogical analyses suggest divergence and recent clonal dispersal in the opportunistic human pathogen *Candida guilliermondii*. *Microbiology*. 2006; 152: 1539–1549.

ANEXOS

ANEXO 1 – Pôster apresentado em Congresso



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho

SUSCETIBILIDADE AOS FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS DE LEVEDURAS INCOMUNS CAUSADORAS DE FUNGEMIA EM UM HOSPITAL DE ONCOLOGIA

dos autores: ALESSANDRA LEAL DA SILVA CHAVES; MARIA HELENA GALDINO FIGUEIREDO DE CARVALHO; LUCIANA TRILLES; ROWENA ALVES COELHO; GABRIELA MACHADO MARTINS; IANICK SOUTO MARTINS; RODRIGO DE ALMEIDA PAES, foi apresentado, na modalidade Aprovado para Pôster Impresso - apenas exposição (sem avaliação), no evento XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE INFECTOLOGIA ocorrido de 10 a 13 de setembro de 2019 no Hangar Centro de Convenções em Belém/PA.

Belém, 13 de setembro de 2019

Sergio Cimerman
Presidente da
Sociedade Brasileira de Infectologia

Marla do Perpétuo
Socorro Costa Corrêa
Presidente do
XXI Congresso Brasileiro de Infectologia - INFECTO 2019

Clovis Ams da Cunha
Presidente da Comissão Científica
do XXI Congresso Brasileiro de Infectologia
INFECTO 2019

