



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

GLEICIERE MAIA SILVA

**LEVEDUROSES EM PESSOAS VIVENDO COM HIV: IDENTIFICAÇÃO
POLIFÁSICA, DETECÇÃO DE SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS E
CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILME**

RECIFE

2022

GLEICIERE MAIA SILVA

**LEVEDUROSES EM PESSOAS VIVENDO COM HIV: IDENTIFICAÇÃO
POLIFÁSICA, DETECÇÃO DE SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS E
CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILME**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco, área de concentração Medicina Tropical, para obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical.

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Heloísa Ramos de Lacerda
e Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto

Recife

2022

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Rodrigo Leopoldino Cavalcanti I, CRB4-1855

S586l Silva, Gleiciere Maia.
Leveduras em pessoas vivendo com HIV : identificação polifásica, detecção de sensibilidade a antifúngicos e caracterização de biofilme / Gleiciere Maia Silva. – 2022.
88 f. : il. ; tab. ; 30 cm.

Orientadora : Heloísa Ramos de Lacerda.
Orientador : Reginaldo Gonçalves de Lima Neto.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Médicas.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2022.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. HIV. 2. Infecção Fúngica. 3. Leveduras. 4. MALDI-TOF MS. 5. Taxonomia Polifásica.
6. Virulência. I. Lacerda, Heloísa Ramos de (Orientadora). II. Lima Neto, Reginaldo Gonçalves de (Orientador). III. Título.

616.9792

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2022-307)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

GLEICIERE MAIA SILVA

**LEVEDUROSES EM PESSOAS VIVENDO COM HIV: IDENTIFICAÇÃO
POLIFÁSICA, DETECÇÃO DE SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS E
CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILME**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco, área de concentração Medicina Tropical, para obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical.

Aprovado(a) em: 31/08/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a Líbia Cristina Rocha Vilela Moura (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a Sylvia Lemos Hinrichsen (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr Bruno Severo Gomes (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico,

À minha avó **Maria Zizelda Alves Maia**, sem tua existência seria impossível realizar esse doutorado. Ao meu filho **João Lucas Maia Austregésilo** por ser minha motivação diária para vencer na vida, e ao meu marido e companheiro **Márcio Austregésilo** por todo o amor, cuidado, dedicação e ajuda nesse processo. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus por me proporcionar saúde e força para realizar meus objetivos. A todos que colaboraram para a concretização deste trabalho, em particular àqueles cujo contributo foi mais direto:

À minha orientadora, professora Dra. Heloísa Lacerda, por sua ajuda e por ter acreditado em mim para realizar esse trabalho. Nunca esquecerei do nosso primeiro encontro na livraria jaqueira, quando passei a ideia da pesquisa e tive um aceite de imediato. Serei eternamente grata.

Ao meu orientador, professor Dr. Reginaldo Gonçalves, muito obrigada pela amizade, compreensão e por todos os ensinamentos ao longo desses 4 anos. Sem você, nada disso seria possível. As maiores oportunidades que tive na vida até o presente momento foram dadas por você. Muito, muito obrigada!

Aos médicos que acreditaram e confiaram no meu trabalho. Ao professor Dr. Armando Mardsen, por me ajudar nos exames micológicos e por estar aberto a tirar minhas dúvidas todas as vezes que precisei.

Aos colegas do laboratório de Micologia Médica da UFPE e aos discentes do programa de medicina tropical.

Aos meus pais por ter me concedido o dom da vida, em especial ao meu pai José Luiz pelo exemplo de superação, dedicação e profissionalismo. A minha mãe Maria Glêcineide pela alegria e entusiasmo com que encara a vida.

À família que eu formei: ao meu marido Márcio por ser meu alicerce, por ter me ajudado desde a coleta dos meus pacientes a análises estatística dos meus resultados. Amo-te imensamente. Essa vitória é NOSSA!

Ao meu filho João Lucas, o amor mais puro da minha vida. Obrigada pela dádiva de ser sua mãe e me tornar uma pessoa melhor. À minha avó por toda ajuda nessa jornada, aos meus irmãos, primos, em especial ao meu primo Wanderley Maia por ser tão caridoso e por ajudar a cuidar do meu filho nos momentos que precisei. À tia Nene por toda bondade e carinho. Amo todos vocês.

E por fim, ao auxílio financeiro concedido pela FACEPE que ajudou na realização deste projeto e ao programa de Pós-graduação em Medicina Tropical pela oportunidade de eu ter feito parte desse grupo tão seleto.

RESUMO

Pessoas vivendo com HIV (PVHIV) são frequentemente acometidas com leveduroses levando a um agravamento do quadro clínico podendo chegar ao óbito. Espécies de *Candida* causam desde infecções superficiais a invasivas. O gênero *Cryptococcus* causa desde lesões cutâneas a meningite. Portanto, a variabilidade no comportamento dessas leveduras, evidencia a necessidade de testes capazes de diagnosticar precocemente e caracterizar a patogenicidade dos isolados. O objetivo do estudo foi identificar leveduras em PVHIV através de taxonomia polifásica entre o MALDI-TOF MS (VITEK[®] MS), VITEK[®] 2 e CHROMOagar *Candida*, bem como definir a sensibilidade antifúngica e capacidade de formação de biofilme dos isolados. Foram incluídas 125 amostras biológicas provenientes de 48 PVHIV com suspeita de infecções fúngicas. Destes, 56,2% dos pacientes apresentaram leveduroses, sendo o sexo masculino, o mais acometido. Dos pacientes com leveduroses, 70,3% apresentaram contagens de linfócitos TCD4 menores que 200 células/ μ L e 29,7% contagens superiores a 200 células/ μ L. Foram isoladas leveduras patogênicas na orofaringe, sangue, líquido cefalorraquidiano, lavado broncoalveolar, secreção traqueal e mielograma. *Candida albicans* (55,6%) foi a espécie mais prevalente, seguida *C. tropicalis* (22,2%); *Cryptococcus neoformans* (7,4%); *Cryptococcus gatti* (3,7%); *C. parapsilosis* (3,7%); *C. ortopsilosis* (3,7%) e *C. krusei* (3,7%). A concordância entre o MALDI-TOF MS (VITEK[®] MS) e o VITEK[®] 2 foi de 92,59% e com o CHROMOagar *Candida* foi 74,07%. Foram realizados testes de sensibilidade frente a seis antifúngicos: fluconazol, voriconazol, caspofungina, micafungina, anidulafungina e anfotericina B, utilizando o protocolo M27-A3 do CLSI. O voriconazol foi droga com maior percentual (18,5%) de leveduras resistentes. Para a avaliação da capacidade de formação do biofilme, 92,7% das leveduras isoladas formaram biofilme. Destarte, através desses dados, comprova-se a necessidade de estudos com leveduras patogênicas, como forma de indicar fatores de risco para o agravamento das micoses em PVHIV, bem como fornecer o diagnóstico laboratorial precoce, auxiliando uma terapia assertiva, melhorando a qualidade de vida desses pacientes.

Palavras-chave: HIV; infecção fúngica; leveduras; MALDI-TOF MS; taxonomia polifásica; virulência.

ABSTRACT

People living with HIV (PLHIV) are often affected with yeast infections, leading to an aggravation of the clinical picture and even death. *Candida* species cause from superficial to invasive infections. The genus *Cryptococcus* causes from skin lesions to meningitis. Therefore, the variability in the behavior of these yeasts highlights the need for tests capable of precociously diagnosing and characterizing the pathogenicity of the isolates. The aim of the study was to identify yeasts in PLHIV through polyphasic taxonomy between MALDI-TOF MS (VITEK[®] MS), VITEK[®] 2 and CHROMOagar *Candida*, as well as to define the antifungal sensitivity and biofilm formation capacity of the isolates. 125 biological samples from 48 PLHIV with suspected fungal infections were included. Of these, 56.2% of the patients had yeast infections, with males being the most affected. Of the patients with yeast infections, 70.3% had TCD4 lymphocyte counts below 200 cells/ μ L and 29.7% had counts above 200 cells/ μ L. Pathogenic yeasts were isolated from the oropharynx, blood, cerebrospinal fluid, bronchoalveolar lavage, tracheal secretion and myelogram. *Candida albicans* (55.6%) was the most prevalent species, followed by *C. tropicalis* (22.2%); *Cryptococcus neoformans* (7.4%); *Cryptococcus gatti* (3.7%); *C. parapsilosis* (3.7%); *C. orthopsilosis* (3.7%) and *C. krusei* (3.7%). The agreement between MALDI-TOF MS (VITEK[®] MS) and VITEK[®] 2 was 92.59% and with CHROMOagar *Candida* it was 74.07%. Sensitivity tests were performed against six antifungal agents: fluconazole, voriconazole, caspofungin, micafungin, anidulafungin and amphotericin B, using the CLSI M27-A3 protocol. Voriconazole was the drug with the highest percentage (18.5%) of resistant yeasts. For the evaluation of the biofilm formation capacity, 92.7% of the isolated yeasts formed biofilm. Thus, through these data, the need for studies with pathogenic yeasts is proven, as a way of indicating risk factors for the worsening of mycoses in PLHIV, as well as providing an early laboratory diagnosis, helping an assertive therapy, improving the quality of life. of these patients.

Keywords: HIV; fungal infection; yeast; MALDI-TOF MS; polyphasic taxonomy; virulence.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	LÂMINA CORADA COM TINTA DE NANQUIM, OBSERVADA AO MICROSCÓPICO ÓPTICO COM OBJETIVA DE 40X, EVIDENCIANDO LEVEDURAS ENCAPSULADAS EM LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO (LCR) DE PACIENTE COM NEUROCRÍPTOCOCOSE. FONTE: SILVA, G.M.....	25
FIGURA 2 -	ESQUEMA DE UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS MALDI-TOF.....	30
FIGURA 3 -	PLACA DE CHROMOAGAR <i>CANDIDA</i> , EVIDENCIANDO DIFERENÇAS TINTORIAIS ENTRE AS ESPÉCIES DE <i>C. ALBICANS</i> (A ESQUERDA EM COLORAÇÃO VERDE) E <i>C. KRUIZEI</i> , (A DIREITA EM COLORAÇÃO ROXA). FONTE: SILVA, G.M.	36
FIGURA 4 -	SÃO EVIDENCIADAS ESTRUTURAS MICROSCÓPICAS (MATRIX POLIMÉRICA, FILAMENTOS MICELIANOS, BLASTOCONÍDIOS E CLAMIDOCONÍDIOS) DO BIOFILME DE <i>C. ALBICANS</i> FORMADO EM PLACA DE POLIESTIRENO. FONTE: SILVA, G.M.....	42
ARTIGO 2 FIGURA 1 -	ATIVIDADE FORMADORA DE BIOFILME DE ESPÉCIES DE LEVEDURA AVALIADA NOS TEMPOS DE 24, 48 E 72 HORAS.....	78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESPÉCIES DE LEVEDURAS ISOLADAS POR DIFERENTES METODOLOGIAS	74
TABELA 2 - PERCENTUAL DE CONCORDÂNCIA NA IDENTIFICAÇÃO ENTRE METODOLOGIAS FENOTÍPICAS E PROTEÔMICA POR MALDI-TOF	75
TABELA 3 - TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO EXIBINDO A CIM DOS ISOLADOS DE ACORDO COM O DOCUMENTO M60 DO CLSI.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UNAIDS	Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
PVHIV	Pessoas vivendo com HIV
ASS	África Subsaariana
MALDI-TOF MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>
TARV	Terapia Antirretroviral
COXCIP-4	Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
DIP	Doenças infecto-parasitárias
UTI DIP	Unidades de Terapia Intensiva- Doenças infecto-parasitárias)
LBA	Lavado broncoalveolar
LCR	Líquido cefalorraquidiano
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
CGB	Meio Cavanina Glicina Azul de Bromotimol
CAC	CHROMagar® <i>Candida</i>
YST	Yeast
CIM	Concentração inibitória mínima
Fl	Fluconazol
Ani	Anidulafungina
Mic	Micafungina
Caspo	Caspofungina
Anfo	Anfotericina B
%	Por cento
°C	Graus celsius
µL	Microlitros
mL	Mililitros
®	Marca Registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	PANORAMA DE CASOS DE HIV/ AIDS NO MUNDO	15
2.1.1	Panorama de casos de Hiv no Brasil.....	16
2.1.2	Panorama de casos de AIDS no Brasil	16
2.2	LEVEDUROSES EM PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS	17
2.2.1	Candidíase Orofaringea.....	18
2.2.2	Candidíase Esofágica	20
2.2.3	Candidemia em PVHIV	22
2.2.4	Criptococose.....	23
2.3	DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO	28
2.3.1	Identificação por MALDI-TOF MS	28
2.3.2	Identificação através da automação VITEK®2	33
2.3.3	Identificação através do CHROMOGAR® <i>Candida</i>	35
2.4	SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA	37
2.5	CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DO BIOFILME	41
3	OBJETIVOS.....	44
3.1	GERAL	44
3.2	ESPECIFICO.....	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	LOCAIS DA PESQUISA	45
4.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	45
4.3	REALIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO	45
4.3.1	Identificação proteômica através do MALDI-TOF (VITEK® MS)....	46
4.3.2	Identificação através do VITEK® 2	47
4.3.3	Identificação através do CHROMOAGAR® <i>candida</i>	47
4.4	TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i>	47
4.5	CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME	49
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5	RESULTADOS.....	51
6	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS.....	53
	APÊNDICE A - FUNGAL ESOPHAGITIS ASSOCIATED WITH TUBERCULOUS PERICARDITIS IN AN HUMAN IMMUNODEICIENCY VIRUS-POSITIVE PATIENT: A CASE REPORT	66

APÊNDICE B - BIOFILM FORMATION AND ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY FROM YEAST INFECTIONS IN PEOPLE LIVING WITH HIV IN NORTHEASTERN BRAZIL.....	70
ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFPE.....	82
ANEXO B - SCRIPT EM PYTHON DA ANÁLISE ESTATÍSTICA	83

1 INTRODUÇÃO

Leveduroses tais como candidemia e meningite criptocócica, aumentaram substancialmente, mesmo com o uso crescente de ferramentas de diagnóstico mais sensíveis e novas drogas antifúngicas utilizadas (BRETAGNE *et al.*, 2022; HARDISON; BROWN, 2012). São doenças graves e podem levar o paciente a óbito, atingindo índices de mortalidade de até 80%, sobretudo pacientes com algum tipo de imunossupressão ou acometidos pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (BORGES *et al.*, 2009; TRAGIANNIDIS *et al.*, 2010; SELIN *et al.*, 2017).

Das leveduras, *Candida albicans* é a espécie que mais acomete pessoas vivendo com HIV (PVHIV). Entretanto, outras espécies têm sido relatadas nos últimos anos como causa de micoses, tais como a *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *Cryptococcus* spp (ROCHA *et al.*, 2008; TRAGIANNIDIS *et al.*, 2010). As espécies de *Candida* causam mais comumente infecções de mucosas orais, vaginais, esofágicas e sepse. Espécies do gênero *Cryptococcus* causam meningite criptocócica, sendo a principal causa de morte por fungos oportunistas em PVHIV (BASSETTI *et al.*, 2014; LIMPER *et al.*, 2017; WEMBABAZI *et al.*, 2022).

A criptococose é uma infecção sistêmica cosmopolita negligenciada, causada pelo fungo do gênero *Cryptococcus*, sendo a principal causa de meningoencefalite em PVHIV (CHUKWUANUKWU *et al.*, 2020). O advento da pandemia de AIDS na década de 1980 promoveu um aumento na incidência dessa micose.

Estudos indicam que PVHIV são mais propensas a transportarem leveduras que podem ser menos sensíveis as terapias padrão e a cada dia de uma terapia inadequada aumenta a taxa de mortalidade em até 20% (LUCAS; NELSON, 2015). Estudos sugerem que há um milhão de casos novos de micoses invasivas em PVHIV ao ano com mais de 50.000 mortes (ARMSTRONG-JAMES *et al.*, 2017; WEMBABAZI *et al.*, 2022).

Leveduras do gênero *Candida*, têm uma maior capacidade de formar biofilme, que é caracterizado como uma massa diferenciada de microrganismos unidos firmemente a uma superfície biótica ou abiótica. Com o uso de procedimentos invasivos em associação a uma deficiência imunológica ocasionada pelo HIV, aumenta-se a chance de infecções associadas a formação do biofilme, elevando a gravidade da doença, a resistência a antimicrobianos e a mortalidade (SEDDIKI *et al.*, 2015; NETT, 2016; THOMAS RUDDER *et al.*, 2022).

Portanto, a variabilidade no comportamento dessas leveduras e o crescente número de isolados resistentes, evidenciam a necessidade de testes capazes de sua identificação precoce

através de metodologias mais eficientes e de alta confiabilidade, como a espectrometria de massas por MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*) bem como a realização de testes de sensibilidade a antifúngicos a fim de guiar a conduta terapêutica (VELLA *et al.*, 2013; NETT, 2016).

As micoses invasivas associadas ao HIV representam desafios quanto a sua caracterização da epidemiologia e esbarram na capacidade diagnóstica limitada. Com isso, estudos sobre a epidemiologia nesses pacientes, bem como características de patogenicidade dos isolados, são muito importantes, pois contribuem de forma direta com a melhora da sobrevida dos pacientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PANORAMA DE CASOS DE HIV/ AIDS NO MUNDO

A infecção pelo HIV continua sendo um dos principais problemas de saúde pública do mundo. Segundo dados da UNAIDS, estima-se que 37,7 milhões de pessoas no mundo viviam com o vírus HIV no ano de 2020 e 1,5 milhão de pessoas ficaram recentemente infectadas no mesmo ano. Desses, 36 milhões são indivíduos adultos e 28,2 milhões de pessoas tiveram acesso a TARV em 31 de junho de 2021 (UNAIDS, 2021).

Dados globais informam que 53% das PVHIV são mulheres e meninas. Em 2020, cerca de 680 mil pessoas morreram de doenças relacionadas a AIDS, em comparação com 1,3 milhão de pessoas em 2010. A mortalidade relacionada à AIDS diminuiu em 53% entre mulheres e meninas e em 41% entre homens e meninos desde 2010. Toda semana, cerca de 5000 jovens mulheres entre 15 e 24 anos de idade, são infectadas pelo HIV. Na África subsaariana (ASS), seis em cada sete novas infecções pelo HIV entre adolescentes de 15 a 19 anos de idade, estão entre meninas. As jovens mulheres de 15 a 24 anos têm duas vezes mais probabilidade de estarem vivendo com o HIV do que os homens. Cerca de 4200 adolescentes e mulheres jovens entre 15 e 24 anos de idade, foram infectadas com o HIV a cada semana em 2020 (UNAIDS, 2021).

Em 2020, as principais populações (profissionais do sexo e clientes, gays e outros homens que fazem sexo com homens, pessoas usuárias de drogas e pessoas trans) e seus parceiros sexuais foram responsáveis por 65% das infecções pelo HIV em todo o mundo. O risco de adquirir o HIV é 35 vezes maior entre as pessoas usuárias de drogas injetáveis, 34 vezes mais alto para mulheres trans, 26 vezes mais alto para as trabalhadoras do sexo e 25 vezes maior entre homens gays e outros homens que fazem sexo com homens (UNAIDS, 2021).

A ASS continua sendo a região mais afetada pela pandemia do vírus HIV, na qual 39% das novas infecções estão nessa região. As mulheres e meninas responderam por 63% de todas as novas infecções pelo HIV em 2020. Em 2018, um total de 800.000 novas infecções e 310.000 mortes foram relatadas apenas no leste e sul da África, representando 47% e 40% das mortes globais relacionadas à AIDS (OLUM *et al.*, 2020; UNAIDS, 2020).

2.1.1 Panorama de casos de Hiv no Brasil

Segundo dados do Ministério da Saúde no Brasil, entre 2007 até junho de 2021, foram notificados no Sinan 381.793 casos de infecção pelo HIV, sendo 165.247 (43,3%) na região Sudeste, 75.618 (19,8%) na região Nordeste, 75.165 (19,7%) na região Sul, 36.218 (9,5%) na região Norte e 29.545 (7,7%) na região Centro Oeste. No ano de 2020, foram notificados 32.701 casos de infecção pelo HIV, sendo 4.299 (13,2%) casos na região Norte, 8.190 (25,0%) no Nordeste, 11.270 (34,5%) no Sudeste, 5.732 (17,5%) no Sul e 3.210 (9,8%) no Centro-Oeste (MINISTERIO DA SAÚDE, 2021).

Quanto ao sexo, os casos de infecção pelo vírus HIV notificados no Sinan no período de 2007 a junho de 2021, corresponderam a um total de 266.360 (69,8%) casos em homens e 115.333 (30,2%) casos em mulheres. A razão de sexos para o ano de 2020 foi de 2,8 (M:F), ou seja, 28 homens para cada dez mulheres (MINISTERIO DA SAÚDE, 2021).

No que refere às faixas etárias, observou-se que a maioria dos casos de infecção pelo HIV se encontra na faixa de 20 a 34 anos, com percentual de 52,9% dos casos. Com relação à raça/cor autodeclarada, 39,4% ocorreram entre brancos e 51,7% entre negros (pretos e pardos, sendo as proporções estratificadas 10,9% e 40,8%, respectivamente). Entre os homens, 40,9% dos casos ocorreram em brancos e 50,3% em negros (pretos, 10,0% e pardos, 40,3%); entre as mulheres, 35,9% dos casos se verificaram em brancas e 55,1% em negras (pretas, 13,0% e pardas, 42,1%) (MINISTERIO DA SAÚDE, 2021).

2.1.2 Panorama de casos de AIDS no Brasil

Quanto aos casos de AIDS, de 1980 a junho de 2021, foram identificados 1.045.355 casos de AIDS no Brasil. O país tem registrado, anualmente, uma média de 36,8 mil novos casos nos últimos cinco anos. O número anual de casos vem diminuindo desde 2013, quando foram observados 43.493 casos; em 2020 foram registrados 29.917 casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

A distribuição proporcional dos casos de AIDS, mostra uma concentração nas regiões Sudeste e Sul, correspondendo cada qual a 50,6% e 19,8% do total de casos; as regiões Nordeste, Norte e Centro-Oeste correspondem a 16,5%, 6,9% e 6,2% do total de casos, respectivamente. De 2016 a 2020, a região Norte apresentou uma média de 4,4 mil casos ao ano; Nordeste, 8,7 mil; Sudeste, 14,1 mil; Sul, 6,9 mil; e Centro-Oeste, 2,8 mil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

No Brasil, de 1980 até junho de 2021, foram registrados 688.348 (65,8%) casos de AIDS em homens e 356.885 (34,2%) em mulheres. No período de 2002 a 2009, a razão de sexos se manteve em 15 casos de AIDS em homens para cada dez em mulheres. No entanto, a partir de 2020, observa-se um aumento na razão de sexos, que chegou a 24 casos em homens para cada dez em mulheres (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

A maior concentração dos casos foi observada em indivíduos com idade entre 25 e 39 anos: 52,0% dos casos do sexo masculino e 47,8% dos casos do sexo feminino pertencem a essa faixa etária (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Desde o início da epidemia de AIDS (1980) até 31 de dezembro de 2020, foram notificados no Brasil 360.323 óbitos tendo o HIV/AIDS como causa básica. A maior proporção desses óbitos ocorreu na região Sudeste (57,2%), seguida das regiões Sul (17,8%), Nordeste (14,2%), Centro-Oeste (5,3%) e Norte (5,5%). Em 2020, a distribuição proporcional dos 10.417 óbitos foi de 40,2% no Sudeste, 23,6% no Nordeste, 18,3% no Sul, 11,5% no Norte e 6,4% no Centro-Oeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

PVHIV têm maior chance de sobrevivência devido ao advento da TARV, porém estão mais expostos a doenças crônicas e doenças de caráter oportunistas, entre elas, doenças de etiologia fúngica que inclusive podem ser secundárias ao uso da TARV e à própria infecção viral (CONRADO *et al.*, 2010; ANDREW *et al.*, 2017).

Em países de alta renda, a infecção fúngica sistêmica diminuiu em função da ampla disponibilidade de drogas antirretrovirais e testes iniciais para o HIV, entretanto em áreas com alta prevalência do vírus, os pacientes apresentam infecção avançada e baixa contagem de linfócitos TCD4 por baixa adesão aos medicamentos ou resistência a eles (ANDREW *et al.*, 2017).

Para o controle da epidemia são necessárias medidas para o diagnóstico precoce da infecção e no tratamento de PVHIV bem como a implementação de intervenções de prevenção combinada. Atualmente, novas estratégias de prevenção surgem como ferramentas complementares no enfrentamento da epidemia de HIV ampliando a gama de opções que os indivíduos terão para se prevenir contra o vírus tais como: o uso do tratamento como prevenção (TcP), a Profilaxia Pós-exposição (PEP) e a Profilaxia Pré-exposição (PrEP) (UNAIDS, 2018).

2.2 LEVEDUROSAS EM PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS

As leveduroses consistem em infecções causadas por leveduras incluindo espécies do gênero *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, dentre outras. As leveduras mais comuns

causando quadros clínicos graves, são espécies de *Candida*, constituindo as chamadas candidíases que somam uma média de 80% das infecções fúngicas em PVHIV e as do gênero *Cryptococcus* relacionados a casos de meningite criptocócica (LASS-FLÖRL, 2008; THOMAS RUDDER *et al.*, 2022).

Espécies de *Candida* podem causar um panorama de infecções clínicas incluindo candidíase orofaríngea, esofágica, cutânea, vulvovaginal até doenças sistêmicas como candidemia. As manifestações clínicas mais comuns em PVHIV são candidíase orofaríngea e candidíase esofágica observadas em PVHIV nos estágios clínicos III e IV ou contagem de células T CD4 < 200 células/ μ L e criptococose (ONINLA., 2014; ABBA *et al.*, 2018).

Embora a presença de leveduras nesses pacientes seja frequentemente relacionada à ocorrência de doença, elas podem estar apenas colonizando a pele, mucosas e trato gastrointestinal. Todavia, alterações orgânicas dependendo da natureza, favorecem a mudança do estado de colonização para infecção (CARVALHO *et al.*, 2003; THOMAS RUDDER *et al.*, 2022). Neste sentido, a cepa que coloniza, posteriormente, pode tornar-se infectante ocasionando candidíase invasiva cerca de oito dias após a colonização (SCHELENS, 2008).

A interação entre HIV e células da resposta imune é bastante complexa resultando em taxas variáveis de progressão da AIDS. Todas as linhas celulares da imunidade e diminuição das células TCD4, levam a falha imunológica. Como resultado, indivíduos infectados estão em constante risco de infecções incluindo micoses sistêmicas invasivas, aumentando ainda mais caso não realizem a terapia antirretroviral (TARV) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007; CHASTAIN *et al.*, 2017).

2.2.1 Candidíase Orofaringea

A candidíase orofaríngea é a infecção oportunista mais comum que acomete PVHIV, conhecida como a manifestação inicial da infecção, observados frequentes em pacientes com contagem de linfócitos entre 200 a 350 células/ μ L, sendo um marcador clínico da progressão da infecção (SARAVANI *et al.*, 2017; ABBA *et al.*, 2018; AMBE *et al.*, 2020).

A candidíase oral é considerada uma das sete lesões cardinais associadas ao HIV além da gengivite ulcerativa necrosante, periodontite, eritema gengival linear, leucoplasia pilosa, sarcoma de kaposi e linfoma não Hodgkin (DENNY *et al.*, 2016).

Dados globais, estima-se que 9,5 milhões de PVHIV sofrem de candidíase oral e a infecção é comumente adquirida endogenamente, exceto em alguns casos em que as cepas podem ser transmitidas de pessoa para pessoa (CHANDER, 2017; MARTHA *et al.*, 2017).

A alta incidência de candidíase orofaríngea recorrente em PVHIV levou a necessidade de administração repetida e uso profilático de agentes antifúngicos. É importante ressaltar que o surgimento de leveduras resistentes se tornou um problema em vários ambientes clínicos. Embora a *C. albicans* seja a espécie predominante isoladas da cavidade oral, vários estudos têm demonstrado que espécies não-*albicans* estão sendo detectadas mais frequentemente, incluindo a *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* (PANIDA *et al.*, 2014; LAM- UBOL *et al.*, 2019).

Na maioria dos casos, as espécies não *albicans* são encontradas em infecções mistas, embora ocasionalmente possam ser encontrados como única espécie patogênica. A preocupação é que essas espécies sejam intrinsecamente menos suscetíveis ao fluconazol, tornando importante testes de sensibilidade antifúngica afim de possibilitar uma melhor escolha terapêutica (PANIDA *et al.*, 2014).

As lesões de candidíase oral podem permanecer locais ou se disseminar, sendo assim, pesquisas indicam que a prevalência de espécies de *Candida* na mucosa oral de pacientes saudáveis é de 40 a 60% , enquanto que em pacientes imunocomprometidos a prevalência pode ser de 60 a 93% (SAMARANAYAKE, 2009). Fatores predisponentes como idade, higiene bucal, uso do álcool, antimicrobianos e tabagismo dão a esse grupo 90% de chance a mais para desenvolver candidíase oral. Estudos afirmam que PVHIV que usam TARV, a chance de desenvolvimento de infecção diminui de 20 a 70% (LOURENCO; FIGUEIREDO, 2008; LI *et al.*, 2013; TAVERNE- GHADWAL *et al.*, 2022).

Um estudo realizado por Lam Ubol *et al.* (2019) na Tailândia, cujo objetivo foi avaliar os efeitos da TARV e sua relação com crescimento de espécies de *Candida* na mucosa oral de PVHIV, selecionou 48 indivíduos com o vírus que faziam ou não uso da terapia e 20 indivíduos sem o HIV foram recrutados como controle. A colonização por *Candida* foi detectada em 64% dos indivíduos infectados em uso da TARV, 65% indivíduos infectados pelo que nunca usaram e 35% não infectados pelo vírus. *C. albicans* foi a espécie mais isolada no grupo que fazia uso da terapia e os indivíduos sem o vírus, enquanto que PVHIV sem tratamento foi mais colonizado por espécies não *albicans*.

Dos pacientes com candidíase oral que apresentaram contagens de *Candida* superiores a 500 UFC/ml, 20% eram indivíduos com o vírus em uso da TARV e 35% sem uso. Os não portadores do vírus tinham contagens inferiores a 500 UFC/ml. Os autores concluíram que a TARV tem efeito mínimo na saúde oral. Embora a terapia possa não impedir a colonização de *Candida*, pode levar à redução de espécies não *albicans* (LAM- UBOL *et al.*, 2019).

O estudo de Panida *et al.* (2014) determinou a prevalência de espécies de *Candida* em 60 adultos tailandeses infectados pelo HIV com uso da TARV e 49 indivíduos saudáveis. A prevalência da levedura oral foi semelhante em ambos os grupos com 56,6% em pacientes infectados pelo HIV e 55,1% em paciente do grupo controle. A espécie mais prevalente foi a *C. albicans* em ambos os grupos (94,1% do portadores de *Candida* no HIV, 88,9% no controle).

Existem dados conflitantes sobre o uso de medicamentos antirretrovirais e colonização de *Candida*. Estudos anteriores mostram que a TARV diminui a incidência de todas as infecções oportunistas relacionadas ao HIV, mas há relatos conflitantes sobre a associação da terapia e a colonização da levedura. (LY *et al.*, 2013; DE PAULA *et al.*, 2015; GAITÁN-CEPEDA; SÁNCHEZ-VARGAS; CASTILLO, 2015).

Além de fatores predisponentes, o status imunológico do hospedeiro bem como a quantidade de células TCD4 (abaixo de 200 células/ml) é um fator de risco para candidíase orofaríngea, vários estudos produziram resultados diferentes no que diz respeito à sua relação com colonização oral de *Candida*. Além disso, fatores do hospedeiro que afetam a colonização oral dessas espécies não são bem esclarecidos (WU *et al.*, 2012; LAM-UBOL *et al.*, 2019; SURYANA; SUHARSONO; ANTARA, 2020).

2.2.2 Candidíase Esofágica

A candidíase esofágica é a causa mais comum de esofagite infecciosa em pacientes com AIDS. O esôfago é o segundo órgão mais suscetível à infecção por *Candida*, após a orofaringe. Paciente com carga viral alta, aumenta a chance de desenvolver essa infecção, independentemente das contagens de linfócitos TCD4 (VASQUEZ, 2010; OLUM *et al.*, 2020).

A membrana mucosa do esôfago é naturalmente revestida pelo epitélio escamoso estratificado não queratinizado e a levedura se adere a essa membrana, formando lesões amarelo-esbranquiçadas. Essas placas podem ser vistas na endoscopia, nas quais são encontradas difusamente por todo o esôfago ou localizadas na parte superior, média ou distal (KLOTZ, 2006). Para que ocorra a infecção é necessária a interação entre patógeno e hospedeiro. A patogenia está relacionada a falha no sistema imunológico, uma vez que a imunidade inata /adquirida e células localizadas no trato digestivo podem inibir o crescimento excessivo de fungos (LEVINE *et al.*, 1985).

Tal como a candidíase oral, a espécie mais frequente envolvida nessa infecção é a *Candida albicans*, mas outras espécies podem estar associadas como a *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* (KLIEMANN *et al.*, 2008; MOHAMED; LU; MOUNMIN, 2019).

Quando PVHIV desenvolvem candidíase orofaríngea, normalmente a contagem de linfócitos TCD4 está por volta de 350 células/ μ L, estudos indicam que quando há uma diminuição para uma contagem abaixo 200 células/ μ L, a afta difunde-se para o esôfago, transformando a candidíase oral em candidíase esofágica (GAITÁN-CEPEDA; SÁNCHEZ-VARGAS; CASTILLO, 2015; ABBA *et al.*, 2018).

A sintomatologia mais frequente é dificuldade para engolir e pode vir acompanhada de dor atrás do esterno. O exame físico é caracterizado por uma placa que ocorre frequentemente junto com candidíase oral. É importante diferenciar a candidíase esofágica de outras formas de esofagite infecciosa, como por exemplo das ocasionadas pelo vírus da herpes ou citomegalovírus (MOHAMED; LU; MOUNMIN, 2019).

Estudos indicam que aproximadamente 10 a 15% das PVHIV desenvolverão candidíase esofágica ao longo da vida e o não uso da TARV torna esse valor ainda maior. Fatores predisponentes como idade, tabagismo, uso de álcool também estão relacionados ao aumento dos casos, uma vez que o uso de substâncias químicas enfraquece o sistema imunológico local e altera a superfície do epitélio escamoso do esôfago (VAZQUEZ, 2010; MOHAMED *et al.*, 2012; MOHAMED; LU; MOUNMIN, 2019).

Geralmente, a candidíase esofágica ocorre na forma de esofagite superficial. Poucos casos de necrose são relatadas. Os casos com complicações são decorrentes de candidíase esofágica necrosante, no qual as ulcerações predispõem à perfuração esofágica e sangramento gastrointestinal podendo ocasionar perda de peso, desnutrição e candidemia (OSTROSKY *et al.*, 2002).

O padrão ouro para o diagnóstico de candidíase esofágica é através de exame histológico, biópsia ou escovação da mucosa esofágica realizada durante a endoscopia. Ao exame endoscópico são observadas lesões semelhantes a placas brancas da mucosa, eritema e exsudatos aderidos à mucosa. As amostras obtidas para biópsia ou escovação da mucosa coradas com hematoxilina-eosina revelam a presença de pseudo-hifas do gênero *Candida* e para posterior identificação da espécie serão necessárias cultura das amostras (MOHAMED; LU; MOUNMIN, 2019).

A endoscopia esofágica e o exame histológico podem diagnosticar com precisão a doença. O diagnóstico precoce contribui para a diminuir o impacto na qualidade de vida desses pacientes. Para casos mais simples, o tratamento com antifúngico sistêmico muitas vezes é suficiente. Entretanto, nos casos graves, investigação imediata e tratamento agressivo com terapia antifúngica intravenosa potente são necessários.

Embora a prevalência da candidíase esofágica entre PVHIV que fazem uso da TARV em diversos países esteja diminuindo, continua a ser um problema frequente. Mais estudos sobre a microbiologia, patogenia e opções terapêuticas devem ser recomendados (OLUM *et al.*, 2020).

2.2.3 Candidemia em PVHIV

A candidemia é uma complicação nosocomial comum em pacientes internados em unidade de terapia intensiva (UTI), com neoplasias e doenças imunossupressoras tais como a AIDS. É uma levedurose grave, responsável por altas taxas de mortalidade. Essa infecção está associada a fonte de infecção gastrointestinal, tratamento antifúngico empírico inadequado ou tardio, sepse grave e gravidade de condições subjacentes (LEE *et al.*, 2019; GOVENDER *et al.*, 2021).

Em estudos norte-americanos, espécies de *Candida* representam o terceiro principal patógenos causadores de infecções da corrente sanguínea associadas à assistência à saúde (McCARTY, 2016). *Candida albicans* é a levedura mais frequentemente isolada, sendo responsável pela maior parte dos episódios. Quando causada por espécies não *albicans* associadas a neutropenia, aumentam a gravidade da infecção (TUMBARELLO *et al.*, 1999; GOVENDER *et al.*, 2021).

A maior parte dos casos de candidemia ocorre por via endógena, na qual ocorre a translocação do patógeno do trato gastrointestinal, onde há uma grande quantidade de colonização por *Candida* em até 70% da população. Eventos que causam desequilíbrio da microbiota ou lesão da mucosa intestinal favorece a translocação (BERTAGNOLIO *et al.*, 2004).

Fatores como o uso de antimicrobianos, íleo paralítico, oclusão intestinal, quimioterapia citotóxica levando a mucosite e cirurgia de trato gastrointestinal são fatores que geram um aumento da colonização de leveduras, ocasionado maior risco a PVHIV (PFALLER *et al.*, 1998; MANDELL; DOUGLAS; BENNEDITT, 2005),

No geral, as características clínicas da candidemia incluem: taquicardia, taquipneia, aumento ou temperatura subnormal, uma mudança no sensorio, hipotensão ou prostração. A manifestação clínica mais comum é a febre persistente (LAUNAY *et al.*, 1998). Pacientes com piores prognósticos são os que têm estado nutricional mais pobre ou perda de massa magra corporal, idade avançada e fizeram uso de tratamento antifúngico inadequado (GOVENDER *et al.*, 2021; OLSEN *et al.*, 2014)

A gravidade da infecção pelo HIV em pacientes com candidemia podem ser mediadas por fatores relacionados ao hospedeiro, tais como: neutropenia ou disfunção de neutrófilos, espécie causadora da candidemia bem como infecções mistas, diagnóstico tardio, terapia antifúngica inadequada e por período de tempo reduzido (PETROSILLO *et al.*, 2002; PFALLER; DIEKEMA, 2007; RAMOS *et al.*, 2016; GOVENDER *et al.*, 2021).

Os fatores de risco significativamente associados à candidemia são: uso de cateter venoso central, administração de nutrição parenteral total, terapia antifúngica prévia, terapia prévia com glicopeptídeos, presença de candidíase oral/esofágica, infecções bacterianas concomitantes, neutropenia (TUMBARELLO *et al.*, 1999).

O Estudo realizado por Govender *et al.* (2021) que analisou o efeito da infecção pelo HIV nas mortes entre pessoas com candidemia, analisou 1.040 pacientes de 29 hospitais sentinela na África do Sul portadores ou não do vírus HIV. A prevalência de candidemia em PVHIV foi de 426 (41%) pacientes. A taxa de mortalidade foi de 54% (228/426) para PVHIV e 37% (230/614) para pessoas soronegativas. Em 30 dias a taxa de mortalidade foram 1,89 vezes maiores entre PVHIV do que entre pessoas soronegativas.

A mortalidade foi maior entre PVHIV não tratadas em UTI do que as que estavam nas unidades de terapia. Os autores concluíram que PVHIV tiveram um risco substancialmente menor de tratamento durante a internação na UTI do que aquelas soronegativas e que PVHIV que desenvolve candidemia têm pior prognóstico (GOVENDER *et al.*, 2021).

O diagnóstico da candidemia é um grande desafio. Para realização do diagnóstico são necessárias amostras de sangue coletadas em diferentes intervalos de tempo. Amostras de sangue não apresentam grande sensibilidade, uma vez que só positiva em aproximadamente 50% dos casos, por esse motivo torna-se o diagnóstico difícil (CLARCK; HAJJEH, 2002).

Apesar das dificuldades, vários têm sido os avanços relacionados com a capacidade de cultivar fungos a partir de amostras de sangue. Sistemas automatizados, recorreram ao uso de meios líquido, que permitem que as amostras sejam inoculadas diretamente nos recipientes, minimizando desta forma, o risco de contaminação, aumentando a sensibilidade e a rapidez de detecção de leveduras responsáveis pela infecção (MUNHOZ *et al.*, 2006).

2.2.4 Criptococose

É uma doença fúngica de caráter oportunista, responsável por casos de meningite fúngica, incluindo meningoencefalite em PVHIV (CHUKWUANUKWU *et al.*, 2020). A Criptococose, também conhecida por torulose, blastomicose européia, doença de busse-

buschke é uma micose sistêmica causada por um complexo de fungos patogênicos identificados do gênero *Cryptococcus* (BRASIL, 2012).

Mais de 30 espécies do gênero *Cryptococcus* são reconhecidas atualmente, porém os principais agentes etiológicos que causam a criptococose em humanos são *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (*Cryptococcus neoformans*) e *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (*Cryptococcus gattii*) (BRASIL, 2012).

O *Cryptococcus neoformans* é o principal agente dessa micose, sendo encontrado em ambientes urbanos, rurais ou silvestres, presente em excretas secas, ricas em fontes de nitrogênio, que permite o crescimento abundante desta levedura (CHUKWUANUKWU *et al.*, 2020).

Em 1990 foi descrito o isolamento de *Cryptococcus gattii* associado a restos de eucaliptos na Austrália, primeiro habitat natural descrito para esta variedade. Em seguida, sucessivos trabalhos realizados no Brasil, demonstraram que ambas as variedades, *gattii* e *neoformans*, estão associadas a habitats naturais representados por madeira em decomposição em árvores tropicais (LACAZ *et al.*, 2002).

A transmissão da criptococose ocorre por inalação de propágulos fúngicos. Essas estruturas possuem grande revestimento de polissacarídeos, garantindo assim, uma maior imunorreatividade e sobrevivência em baixas condições nutricionais, tornando-os dessa forma, mais patogênicos (ELSEGEINY; MARR; WILLIAMSON, 2018; CHUKWUANUKWU *et al.*, 2020).

A criptococose está associada a condições de imunodepressão celular, a infecção inicia-se nos espaços alveolares do pulmão, pelo confronto das leveduras com os macrófagos, podendo disseminar-se para outros tecidos, especialmente o SNC. Os criptococos são capazes de utilizar macrófagos alveolares para evasão imune, embora na tentativa de conter a infecção a resposta imunológica recruta monócitos, células dendríticas, células T e os macrófagos ((MA; MAY, 2009; WALSH *et al.*, 2017).

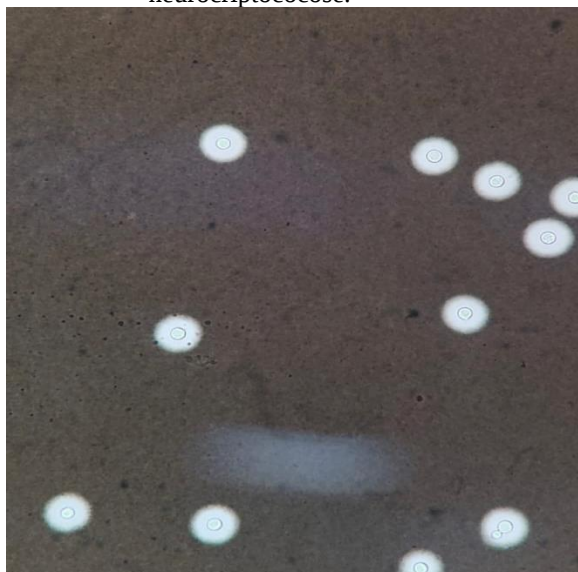
Os mecanismos de defesa contra os fungos são diversos, abrangendo desde a imunidade inata até a adquirida, contudo algumas evidências demonstram que os principais mecanismos são por meio da ativação de células fagocíticas e linfócitos T e B através de citocinas que medeiam o sistema imunológico. Embora a imunidade humoral tenha sido pouco estudada nas últimas décadas, os estudos mostram que os anticorpos possuem funções relevantes durante a infecção criptocócica (MA; MAY, 2009).

A criptococose inclui duas entidades clínicas distintas: (1) criptococose oportunística, cosmopolita, associada a condições de imunodepressão celular, causada por *Cryptococcus*

neoformans e (2) criptococose primária, endêmica em áreas tropicais e subtropicais, ocorre em hospedeiros aparentemente normais, causada por *Cryptococcus gattii*. Ambas estão relacionadas com meningoencefalite de evolução grave, algumas vezes com curso fatal, acompanhada ou não de lesão pulmonar evidente, fungemia e focos secundários para pele, ossos, rins, supra-renal, entre outros (BRASIL, 2012).

Para a sua identificação do *Cryptococcus*, é necessário a coleta do material biológico suspeito para análise microscópica seguida de cultura. Ao exame direto, pode ser evidenciada a presença de cápsula de polissacarídeo. Para tanto, é necessário a montagem da lâmina com o contrastante, tinta de nanquim diluída na proporção de 1:1 em água destilada. Uma vez que a tinta de nanquim não penetra na cápsula e a mesma se apresenta com um halo claro em volta da levedura, evidenciada com um fundo preto do corante. (Figura 1). (SIDRIM; ROCHA, 2003).

Figura 1: Lâmina corada com tinta de nanquim, observada ao microscópico óptico com objetiva de 40X, evidenciando leveduras encapsuladas em líquido cefalorraquidiano (LCR) de paciente com neurocriptococose.



Fonte: a autora, 2022.

Para identificação da espécie de *Cryptococcus*, o teste da hidrólise da ureia, é útil na discriminação do gênero, utilizando o meio Christensen (Difco). A ureia é hidrolisada pela urease produzida pela levedura, resultando em alcalinização do meio. A positividade é observada pela mudança de coloração, do amarelo para o róseo intenso. O meio Cavanina Glicina Azul de Bromotimol, meio (CGB) é útil para a quimiotipagem das cepas de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, e *C. neoformans* var. *gattii* (SIDRIM; ROCHA, 2003).

A formulação CGB efetivamente elimina as falsas reações e permite uma mudança de cor positiva de amarelo-verde para azul de cobalto. A cor azul é o resultado de uma mudança de pH alcalino produzido quando a creatina é degradada em amônia. As cepas de *C. neoformans* var. *gattii* são positivas e as de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, não produzem alterações de cor (SIDRIM; ROCHA, 2003).

O meio contém ágar para solidificação, glicina como fonte de carbono e fosfato de potássio, sulfato de magnésio e cloridrato de tiamina como vitaminas e nutrientes. O sulfato de L-canavanina permite o isolamento de *C. gattii*, pois essas leveduras apresentam resistência natural e são capazes de se multiplicar nesse meio. Adiciona-se azul de bromotimol para indicar a mudança de pH para 7,0 quando o meio aparece azul de cobalto. A espécie *C. neoformans* é sensível a L-canavanina (LARONE, 2003).

O advento da pandemia de AIDS na década de 1980 causou um aumento dramático na incidência de criptococose. De acordo com dados globais, quase 1 milhão de pessoas desenvolvem infecções associadas ao HIV/AIDS a cada ano e a meningite criptocócica é uma doença grave e principal causa de mortalidade por fungos oportunistas em HIV/AIDS. Aproximadamente 223.100 infecções estão documentadas anualmente, 70% dos quais ocorrem na África Subsaariana (UNAIDS, 2020).

A apresentação mais frequente na criptococose é a meningite subaguda, que varia de 70 a 90% dos casos, geralmente em pacientes com contagem de linfócitos TCD4 abaixo de 100 células / μ L. Os medicamentos indicados para a profilaxia incluem o fluconazol ou em alguns casos a anfotericina B. Contudo, a profilaxia secundária pode ser interrompida se houver aumento sustentado da contagem de linfócitos TCD4 (acima de 200 células/ μ L) por seis meses após o início de TARV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

No estudo realizado por Chukwuanukwu *et al.* (2020) em 429 pessoas, destas 290 eram PVHIV e 139 eram soronegativos alocadas na unidade de aconselhamento e testagem de HIV em Nnamdi, Nigéria. Amostras de sangue foram coletadas para pesquisa de *C. neoformans* por ensaio de fluxo lateral de antígeno (CrAgLFA), HIV testes, linfócitos TCD4 e hemograma.

O estudo evidenciou que das 290 PVHIV investigadas para criptococose, 4 (1,4%) delas testaram positivo, sendo 1 (25%) do sexo masculino e 3 (75%) do sexo feminino. Todos os portadores de criptococose apresentaram contagem de linfócitos TCD4 abaixo de 200 células/ μ L, três deles estava fazendo uso de TARV e uma não estava. Nenhum do grupo controle (soronegativos) apresentou resultado positivo para criptococose. Os autores concluíram que o uso da TARV pode ter reduzido a infecção por *Cryptococcus. neoformans* e que pode haver a possibilidade de que as mulheres possam ser uma população mais vulnerável.

Em outro estudo retrospectivo realizado por Yoon *et al.* (2020) em pacientes com diagnóstico de criptococose entre 2005 e 2017 no centro médico no Bronx, epicentro da AIDS na cidade de Nova York, foi analisado dados demográficos, manifestações clínicas, achados laboratoriais, tratamento e mortalidade desses pacientes. Em suma, 63% dos casos no período de 12 anos ocorreram em PVHIV. E 61% dos pacientes infectados pelo HIV não utilizavam a TARV, 10% foram recém-diagnosticados com AIDS. Dos pacientes com criptococose não infectados pelo HIV (47/126) todos eram idosos e a maioria tinha uma condição imunocomprometida.

Em 2022, Wembabazi *et al.* avaliaram 200 pacientes com meningite criptocócica em Uganda. 87 (43,5%) pacientes eram do sexo feminino e 113 (56,5%) do sexo masculino. A idade mediana foi de 35(19-64) anos. Um total de 200 isolados clínicos de *Cryptococcus* foram testados. Nenhum (0% (0/200) *Cryptococcus gattii* foi identificado. 97,51% (157/161) dos pacientes tinham contagens absolutas de linfócitos TCD4 inferiores a 200 células/ μ L; 1,86% (3/161) 200-350 células/ μ L e 0,62% (1/161) acima de 500 células/ μ L. Destes, 45,4% (74/163) não estavam em uso da TARV e 54,6% (89/163) estavam em uso.

Apesar das melhorias significativas no acesso a TARV e na retenção nos cuidados de PVHIV, a principal condição predisponente para a criptococose ainda é a infecção pelo HIV, (YOON *et al.*, 2020). Estimativas recentes sugerem que cerca de 223.000 novos casos de meningite criptocócica são diagnosticados a cada ano, causando 181.000 mortes.

Em pacientes gravemente imunossuprimidos, o *Cryptococcus neoformans* pode infectar qualquer sistema de órgãos humanos, incluindo a medula óssea, que é uma apresentação rara de criptococose (ANDREW *et al.*, 2017; VECHI *et al.*, 2019). A taxa de mortalidade é alta em pacientes que recebem o diagnóstico tardio ou não recebem o tratamento (RAJASINGHAM *et al.*, 2017). Estima-se que 15% dos pacientes com AIDS em todo o mundo morrem de criptococose (PHARKJAKSU *et al.*, 2020).

No Brasil, a variante *Cryptococcus neoformans* é mais prevalente no Sudeste e Sul do Brasil, contudo, a variante *Cryptococcus gattii* acomete crianças e jovens sem evidência de imunodepressão aparente, sendo de comportamento endêmico ou focal nas zonas tropicais e subtropicais, especialmente nas regiões Norte (Amazônia) e Nordeste do Brasil, incluído o semiárido, e, esporadicamente, nas demais regiões brasileiras (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

As micoses sistêmicas não integram a lista nacional de doenças de notificação compulsória no Brasil. Elas não são objeto de vigilância epidemiológica de rotina, com exceção dos estados brasileiros que instituíram essa notificação de iniciativa do seu âmbito de gestão.

Por isso, não existem dados epidemiológicos da ocorrência em nível nacional e pesquisas com criptococose são necessárias, uma vez que algumas variantes como o *Cryptococcus gattii* são mais difíceis de tratar, conduzindo a uma elevada taxa de mortalidade.

2.3 DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO

Os métodos de diagnóstico micológico variam de acordo com a diversidade de amostras biológicas e a infraestrutura do laboratório que realizará o diagnóstico. A identificação convencional se baseia em características morfológicas e provas bioquímicas para chegar em nível de espécie (BARNNET *et al.*, 2000).

O diagnóstico deverá ser realizado através do exame direto do material biológico e a cultura. Após a coleta do material, deverão ser confeccionadas lâminas para observação de estruturas fúngicas ao microscópio óptico, podendo ser coradas com Giemsa, clarificadas com KOH a 20% ou contrastadas com tinta de nanquim (BARNNET *et al.*, 2000).

Concomitantemente, as amostras clínicas deverão ser semeadas na superfície do meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) adicionado de 50 mg/L de cloranfenicol, mantidas à temperatura de 30° C e 37° C por até 15 dias. Após o surgimento das colônias, estas serão purificadas e identificadas (SIDRIM; ROCHA, 2004; SOARES *et al.*, 2011).

A identificação deverá ser realizada com base na análise de parâmetros quanto às características macroscópicas (bordos, textura e coloração do verso e reverso das colônias, produção de pigmentos e tempo de crescimento), microscópicas (estruturas somáticas e reprodutivas) e provas fisiológicas, bioquímicas (assimilação de compostos de carbono e nitrogênio, fermentação de fontes de carbono e produção de ácido acético e produção de urease (BARNETT *et al.*, 2000; DE HOOG *et al.*, 2000; LACAZ *et al.*, 2002).

Contudo, o diagnóstico micológico vai além de provas de fermentação e assimilação, sendo necessário profissionais especializados para diferenciar colonização de infecção principalmente entre leveduras de *Candida*, bem como formas de diagnóstico mais eficientes, incluindo o uso de equipamentos automatizados e utilização de meios cromogênico, uma vez que a taxonomia clássica requer um tempo maior para liberação dos resultados, além de ser laborioso e pouco discriminatório (SOARES *et al.*, 2011; ANDRADE *et al.*, 2012).

2.3.1 Identificação por MALDI-TOF MS

Levedurosas em PVHIV são fatores complicadores e responsáveis por manifestações graves nesses indivíduos. Os métodos de diagnóstico convencionais esbarram na dificuldade do tempo e muitas vezes tornam difíceis inferir com segurança a identidade taxonômica dos isolados. Várias tecnologias têm sido sugeridas para identificar rapidamente leveduras e o destaque vêm sendo a técnica proteômica *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) baseada em ionização por dessorção a laser assistida por matriz (IDELEVICH *et al.*, 2014; LIMA-NETO, R *et al.*, 2014).

O MALDI-TOF MS é uma técnica físico-química que tem sido utilizada para rápida e identificação microbiana confiável. O espectro gerado é analisado como um perfil proteômico individual com a massa molecular variando de 2000 a 20000 Da, no qual aparecem importantes proteínas ribossomais, que podem ser utilizados como biomarcadores (PASSARINI *et al.*, 2013). Tem sido usado para detectar e identificar leveduras, sendo capaz de discriminar espécies intimamente relacionadas, como *C. albicans* de *C. dubliniensis* e *C. parapsilosis* de *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*, previamente separados apenas por métodos moleculares (MARINACH-PATRICE *et al.*, 2010; SAMANTARAY; SINGH, 2022).

Essa técnica pode ser considerada a principal ferramenta analítica no campo da proteômica devido a sua elevada sensibilidade, exatidão e precisão. Esse método é útil na identificação de proteínas de espécies com genomas pequenos e completamente sequenciados (JANNETTO; FITZGERALD, 2016; SAMANTARAY; SINGH, 2022; HOU; CHIANG-NI; TENG, 2019). Entretanto, o índice de insucesso na identificação aumenta à medida que cresce o número de registros confrontados no banco de dados utilizado na busca (MARINACH-PATRICE *et al.*, 2010). Para proteínas isoladas de espécies cujo genoma não está sequenciado, é necessário usar bancos de dados ampliados (BARREIRO, 2010; HOU; CHIANG-NI; TENG, 2019).

O MALDI TOF MS começou a ser utilizado para análise de proteínas em 2002 por Koichi Tanaka, um dos vencedores do prêmio Nobel de química, pelo “desenvolvimento de métodos de análises espectrométricas de dessorção e ionização suave de moléculas biológicas” (FERREIRA, 2013). A Figura 2 mostra os componentes do espectrômetro de massa tipo MALDI-TOF e as etapas empregadas na técnica. Inicialmente, a amostra é embebida em uma matriz ácida, capaz de absorver a energia de um laser pulsado, e transferir tal energia através de prótons para o processo de ionização dos componentes da amostra.

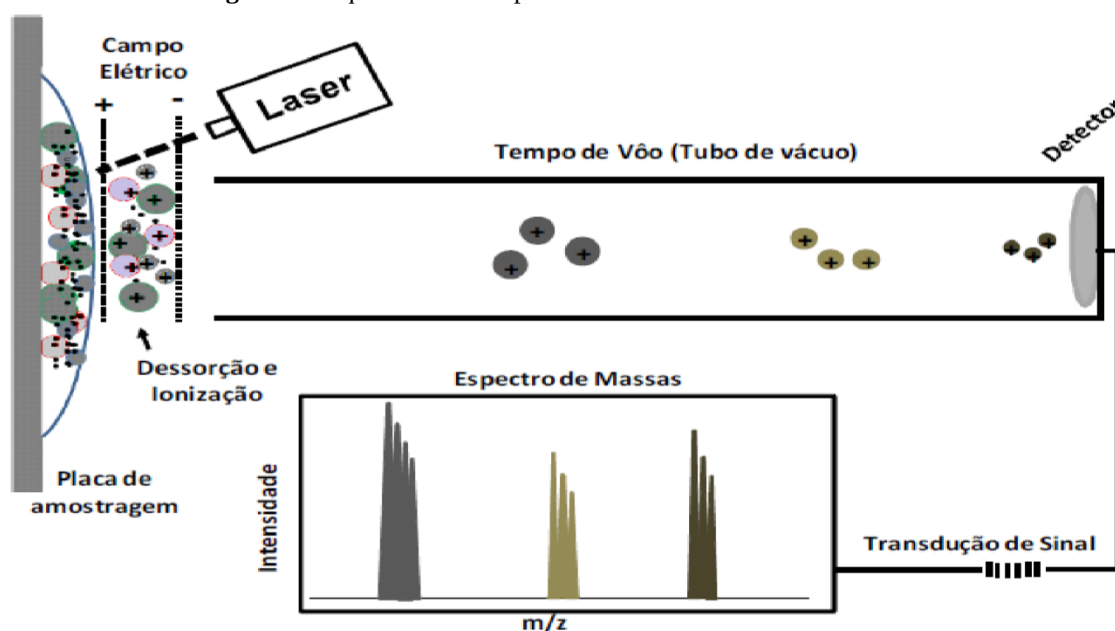
Ocorre uma co-cristalização da amostra com essa matriz e um feixe de laser serve como fonte de dessorção (fenômeno de retirada de substâncias adsorvidas ou absorvidas por outras) e de ionização). O feixe de laser é irradiado sobre a mistura amostra/matriz e a energia é

absorvida pela matriz. Há uma transferência de prótons da matriz para a amostra ionizando as moléculas e ao mesmo tempo é desencadeado o processo de dessorção, possibilitando a passagem da amostra para o estado gasoso. Essa transferência de energia é eficiente na obtenção de moléculas intactas, uma vez que elas não sofrem incidência direta da excessiva energia do laser e os íons formados vão possuir baixa energia interna, o que poderia causar sua decomposição (BARREIRO, 2010; MARINACH-PATRICE *et al.*, 2010).

Os íons formados são acelerados por meio de um campo elétrico dentro de um tubo de vácuo e individualmente analisados, por um analisador, geralmente do tipo TOF (tempo-de voo), e posteriormente, detectados (BARREIRO, 2010; GOULART, RESENDE, 2013).

Desse modo, os analitos separados pelo TOF formam espectros de massa de acordo com sua razão m/z (massa/carga) e com picos que indicam quantidades variáveis de cada substância analisada. Para a identificação dos analitos, cada pico é comparado com um banco de dados, arquivo contendo as impressões digitais das moléculas (GOULART, RESENDE, 2013).

Figura 2: Esquema de um espectrômetro de massas MALDI-TOF



Fonte: Adaptado de ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011.

Para a sua posterior identificação de microrganismos, são usados bancos de dados. Os sistemas MALDI-TOF MS utilizados atualmente são o sistema MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), o Andromas (Andromas, Paris, França) o Saramis (AnagnosTec, Potsdam, Alemanha) que foi vendido em 2010 para a bioMérieux para ser incorporado no sistema VITEK MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França), e o mais recente

ASTA MicroIDSys (Suwon, Coréia do Sul) (GOULART, RESENDE, 2013; LING *et al.*; 2014; HOU; CHIANG-NI; TENG, 2019).

Existe um fator crucial que mais afeta a natureza do espectro que é a qualidade da matrix. Todos eles requerem propriedades físicas e químicas como: uma absorbância eficiente no comprimento de onda do laser, uma ionização eficiente e uma estabilidade importante para não interferir com o espectro de massa da amostra. A matriz química penetra na parede celular, tornando as proteínas intracelulares acessíveis para análise, e facilita a produção de íons intactos em fase gasosa a partir de compostos como proteínas, oligonucleotídeos, polímeros sintéticos e compostos orgânicos pesados (FERREIRA, 2013).

As matrizes mais utilizadas são o ácido 2,5-dihidroxibenzóico (ácido gentísico), ácido 3,5- dimetoxi - 4 - hidroxicinâmico (ácido sinapínico), e α -ciano-4-hidroxicinâmico (α - CHCA) e sua escolha é decorrente da natureza da amostra estudada. Ácido gentísico (DHB) permite o estudo de oligossacarídeos, glicopeptídeos e glicoproteínas. Geralmente, a DHB é mais eficiente para pequenos componentes de massa molecular e ácido sinapínico e CHCA para o estudo de proteínas (CARBONELLE *et al.*, 2011; HOU; CHIANG-NI; TENG, 2019).

Essa ferramenta tem sido utilizada com sucesso na investigação e identificação de proteínas e peptídeos, na identificação taxonômica de microrganismos, dentre inúmeras outras aplicações (ASSIS *et al.*, 2011; HOU; CHIANG-NI; TENG, 2019). É considerada uma técnica de ionização branda, porque os íons formados possuem baixa energia interna e não ocorre a fragmentação. Na identificação de microrganismos, uma grande quantidade de moléculas é detectada simultaneamente como proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos, gerando um espectro que é característico de cada espécie, sendo muito útil do diagnóstico de doenças fúngicas sobretudo as leveduras (GOULART, RESENDE, 2013).

A técnica do MALDI-TOF MS possui várias vantagens como a utilização de células intactas de microrganismos (também designada ICM-MS, *intact cell* MALDI-TOF) que podem ser obtidas diretamente do meio de cultivo. A análise produz um espectro de proteínas típicas de cada espécie, o que funciona como uma impressão digital (“*fingerprinting*”), que pode ser comparado aos espectros previamente identificados e depositados em banco de dados. Apresenta um curto tempo de análise (minutos), alto rendimento (o consumo de material biológico é insignificante, os dados gerados são de simples interpretação e apresenta uma alta resolução, fornecendo uma análise mais rápida, precisa e altamente sensível às misturas complexas de peptídeos (ASSIS *et al.*, 2011; HOU; CHIANG-NI; TENG, 2019).

Em um estudo realizado por Arastehfar *et al.* (2019) no qual foi comparado a precisão e praticidade de PCR 21-Plex e API 20C AUX, MALDI-TOF MS e sequenciamento de rDNA

para uma ampla variedade de espécies de leveduras, totalizando 301 cepas recuperadas de vários locais anatômicos [sangue (n = 145), outros locais (n = 156)] O MALDI TF MS identificou corretamente 98,33% de leveduras isoladas, 100% das cinco principais espécies de *Candida*, 95,7% de espécies raras de leveduras, enquanto 1,3% dos isolados foram identificados erroneamente.

A API 20C AUX identificou corretamente 83,7% de isolados de levedura, 97,2% das cinco principais espécies de *Candida*, 61,8% de espécies raras de levedura, enquanto 16,2% das leveduras isoladas foram identificadas erroneamente. A PCR de 21 plex identificou com precisão 87,3% de isolados de levedura, 100% das cinco espécies de *Candida*, 72% de espécies raras de leveduras, mas identificou 1,3% de espécies raras de levedura enquanto 9,9% de leveduras não foram identificadas.

O MALDI-TOF MS mostrou boa acurácia para identificação de uma gama diversa de espécies de leveduras oportunistas. Todas as principais espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*) e 95,7% das espécies raras de leveduras foram identificadas corroborando com outros estudos, no qual as espécies de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* foram corretamente identificados (SANTOS *et al.*, 2011). Além disso, espectros aprovados pela FDA de espécies de levedura multirresistentes amplamente difundidas, como a *Candida auris*, foram adicionados ao banco de dados clínicos de MALDI-TOF MS, levando a uma identificação rápida e confiável desse organismo (BAO *et al.*, 2018).

Contudo, no estudo de Aarstehfar *et al.* (2019) tiveram casos de identificação incorreta de espécies de *Cryptococcus* e *Trichosporon* que foram relatados anteriormente por outros pesquisadores (KOLECKA *et al.*, 2013; SENDID *et al.*, 2013; LING *et al.*, 2014).

Estudo recente realizado por Samantaray e Singh (2022) com 126 isolados do complexo *C. parapsilosis* para avaliação ao nível de espécie pelo VITEK[®] MS, que utiliza o princípio de MALDI-TOF MS e por PCR. *C. parapsilosis* fenotipicamente identificada é na verdade um complexo de 3 espécies membros denominadas *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Doze isolados não foram identificados nem pelo VITEK[®] MS nem por PCR e, portanto, foram excluídos da análise. Dos 114 isolados de *C. parapsilosis*, 89 (78,1%) *C. parapsilosis sensu stricto*, 18 (15,8%) *C. orthopsilosis* e 7 (6,1%) *C. metapsilosis* pelo VITEK[®] MS. A PCR identificou 84 (79,2%) *C. parapsilosis sensu stricto*, 15 (14,2%) *C. orthopsilosis* e 7 (6,6%) *C. metapsilosis*. No entanto, a PCR não detectou 8 isolados de *C. parapsilosis sensu stricto* detectados por VITEK[®] MS.

VITEK[®] MS apresentou 95,3% de concordância na identificação das espécies, uma concordância quase perfeita. Os autores concluíram que o MALDI-TOF MS pode ser utilizado

como método rápido, confiável e de baixo custo para identificar as espécies de complexo *C. parapsilosis* (SAMANTARAY; SINGH, 2022).

Um estudo realizado por Teke, Baris e Bayraktar (2021) no qual fizeram um comparativo entre os dois sistemas MALDI-TOF MS (Bruker MALDI Biotyper e VITEK[®] MS) para a identificação rápida de espécies de *C. albicans*, *Candida* não *albicans* e espécies raras de leveduras foi realizado com 157 isolados representando 23 espécies de leveduras foram testadas, todos os isolados foram identificados usando os sistemas. A sensibilidade de identificação de levedura do MALDI Biotyper foi de 98,7%, enquanto a do VITEK[®] MS foi de 96,8%. Ambos os sistemas MALDI-TOF MS identificaram corretamente todas as cepas pertencentes a quatro espécies prevalentes, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*.

Para as 19 espécies raras de leveduras clínicas, as taxas de identificação foram de 96,7% para MALDI Biotyper e 91,7% para VITEK[®] MS. Os autores concluiriam que ambos os sistemas mostraram alto desempenho, identificando mais de 90% dos isolados de levedura em um curto espaço de tempo. As desvantagens desses sistemas são que algumas espécies não estão presentes nos bancos de dados e não podem distinguir espécies intimamente relacionadas (TEKE; BARIS; BAYRAKTAR, 2021).

Existe uma maior quantidade de testes realizados por MALDI-TOF na identificação de bactérias, no entanto esta estratégia ainda não foi avaliada especificamente para varias espécies de leveduras. De fato, alguns parâmetros técnicos podem precisar ser modificados em virtude de espécies de *Candida* crescerem mais lentamente e serem incubadas a uma temperatura mais baixa do que as bactérias (30°C em vez de 35°C) e ainda existem espectros de referência de leveduras que não estão incluídos na base de dados MALDI TOF MS (CHOWDHARY *et al.*, 2016).

Em vista disso, há a necessidade de mais estudos a respeito do método e melhora da biblioteca, que por sua vez, pode aumentar ainda mais a precisão afim de identificação de espécies raras de leveduras clínicas, sobretudo, as que exibem um perfil de susceptibilidade com traços resistentes a múltiplas drogas (MDR) (AARSTEHFAR *et al.*, 2019; TEKE; BARIS; BAYRAKTAR, 2021).

2.3.2 Identificação através da automação VITEK[®]2

Na pratica laboratorial, a automação fornece resultados assertivos e mais eficiente, uma vez que os testes bioquímicos necessários para a identificação das espécies são realizados em menor tempo. O sistema VITEK[®]2 (bioMérieux, Inc., Hazelwood, MO, USA) com o cartão

Yeast (YST) identifica leveduras clinicamente importantes e organismos relacionados através de 47 testes bioquímicos fluorescentes, que incluem assimilação de carboidratos e ácidos orgânicos e detecção de oxidases e arilamidases (OCHIUIZZI *et al.*, 2014).

O Cartão VITEK®2 YST oferece a identificação rápida e precisa de uma ampla gama de leveduras patogênicas além do gênero *Candida*, tais como *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus neoformans*, *Kloeckera spp*, *Kodamaea ohmeri* *Malassezia furfur*, *Malassezia pachydermatis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula spp.*, *Pichia farinosa*, *Trichosporon asahii* e *Geotrichum capitatum*, dentre outros (AUBERTINE *et al.*, 2006).

Uma combinação perfeita entre o padrão de reação do teste e o padrão de reação de um único microrganismo, fornecem uma porcentagem. Quando uma combinação perfeita não é obtida, ainda é possível que o padrão de reação seja suficientemente próximo daquele de um padrão de reação esperado, de modo que uma decisão clara possa ser fornecida sobre a identificação do organismo. O alcance de probabilidades percentuais no caso de uma escolha é de 85 a 99. Valores mais próximos de 99 indicam uma correspondência mais próxima ao padrão típico para o organismo dado (BIOMERIEUX, 2016).

Quando o padrão de reação não é suficiente para discriminar entre dois ou três organismos, as probabilidades percentuais refletem essa ambiguidade. Os valores de probabilidade relatados indicam, relativamente, a ordem em que o padrão de reação melhor corresponde ao as possibilidades listadas (BIOMERIEUX, 2016).

Diversos estudos foram realizados comparado a identificação do VITEK®2 por várias outras metodologias e os resultados são satisfatórios. Pesquisas têm mostrado que este sistema pode identificar corretamente mais de 93% dos as cepas analisadas em aproximadamente 18 horas (SANGUINETTI *et al.*, 2007; OCHIUIZZI *et al.*, 2014).

Tradicionalmente, ensaios fenotípicos como microscopia direta, caracterização bioquímica e cultura estão entre as técnicas mais amplamente utilizadas para identificar espécies de leveduras sendo, API 20C AUX, VITEK®2, e AuxaColor estão entre os meios bioquímicos mais amplamente exploradas de identificação. (AARSTEHFAR *et al.*, 2019).

Um estudo realizado por Ochiuzzi *et al.* (2014) avaliou o desempenho dos cartões YST do sistema VITEK®2 para a identificação de leveduras do gênero *Candida*. Os autores obtiveram 168 isolados que foram analisados e os resultados foram comparados com os obtidos pelo equipamento API 20C AUX, ou API ID 32C. Cada cepa foi subcultivada em ágar de levedura cromogênico e observada quanto a micromorfologia. *C. albicans* e *C. dubliniensis* foram identificados por testes bioquímicos e moleculares adicionais. A concordância observada

foi de 98,3%. Apenas três cepas não foram identificadas corretamente pelo sistema VITEK[®]2 uma cepa de *C. tropicalis* e um de *C. krusei* foram identificados erroneamente como *C. parapsilosis* e outra cepa de *C. krusei* foi identificada de forma incompleta pelo software. O tempo médio de identificação com os cartões YST foi de 18,25 h.

Um estudo realizado por Kord *et al.* (2020) em que se comparou o desempenho de VITEK[®]2 e 21-plex PCR para identificação de espécies de levedura isoladas da corrente sanguínea em Teerã (Irã), no período de 2015 a 2017. Foram identificados 137 isolados de levedura de 107 pacientes. O método 21-plex PCR identificou corretamente 97,1% dos isolados, percentual superior ao que o VITEK[®]2 mostrou (87,6%). *C. albicans* foi a principal causa de fungemia, seguida de *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. A superioridade do PCR sobre o VITEK[®]2 automatizado indica seu potencial como uma ferramenta de identificação alternativa para uso em países em desenvolvimento.

Diversos estudos afirmam que o sistema VITEK[®]2 surge como um método confiável, simples e eficaz para a identificação das principais espécies do gênero *Candida*, sendo superado apenas por métodos proteômicos e moleculares.

2.3.3 Identificação através do CHROMOGAR[®] *Candida*

O CHROMagar[®] *Candida* (CAC) é um meio cromogênico seletivo utilizado para diferenciação e isolamento de leveduras. É destinado na detecção direta qualitativa e identificação presuntiva de espécies de *Candida*. Esse meio por conter vários substratos enzimáticos que hidrolisados pelas hexoaminidases, permitem a identificação da levedura de acordo com a pigmentação exibida em um tempo de 24 a 48 horas.

Com a inclusão de substratos cromogênico no meio de cultura, as colônias de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* produzem cores diferentes, permitindo assim a detecção direta destas espécies na placa de isolamento. As colônias de *C. albicans* aparecem com uma cor verde-claro a verde médio, as de *C. tropicalis* aparecem azuis esverdeadas a azul metalizado e as de *C. krusei* aparecem cor-de-rosa claro a roxo com um rebordo esbranquiçado conforme demonstra a Figura 3. Contudo, a ausência de crescimento ou a ausência de colônias no CAC não exclui a presença de *Candida* (MURRAY, 2003).

Figura 3: Placa de CHROMOagar *Candida*, evidenciando diferenças tintoriais entre as espécies de *C. albicans* (a esquerda em coloração verde) e *C. krusei*, (a direita em coloração rosa).



Fonte: a autora, 2022.

Outras espécies de leveduras poderão desenvolver a sua cor natural (creme) ou aparecer cor-de-rosa ou cor de malva claro a escuro, como por exemplo *C. glabrata*. Além da diferenciação rápida das principais espécies isoladas clinicamente, uma outra vantagem do CAC é a fácil identificação de culturas mistas de leveduras devido à apresentação de colônias com cores diferentes (BAUTERS; NELIS, 2002; MURRAY, 2003).

Os constituintes básicos desse meio são o cromopeptona, dextrose, substâncias cromogêneas, cloranfenicol e o ágar. A peptona e dextrose fornecem os nutrientes para o crescimento das leveduras, as substâncias cromogêneas são substratos artificiais que libertam compostos de várias cores na sequência da degradação de enzimas específicas, e o cloranfenicol inibe a maioria dos contaminantes bacterianos (BAUTERS; NELIS, 2002).

Araújo *et al.* (2005) utilizou o CAC para a identificação de 53 leveduras previamente identificadas por métodos manuais convencionais, as leveduras foram: *Candida albicans* (34), *C. tropicalis* (7), *C. krusei* (5) *C. glabrata* (4) e *C. parapsilosis* (3). Das 34 amostras de *C. albicans*, 30 (88,2%) delas no CAC apresentaram coloração característica (verde-escuro) no meio cromogênico. As demais características relativas à coloração e à morfologia, mostradas em CAC apresentaram-se compatíveis com *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* em todas as amostras estudadas, enquanto 5 dos 7 isolados (71,4%) de *C. tropicalis* apresentaram a

coloração azul característica desta espécie. Com os resultados obtidos, os autores concluíram que o meio CAC foi útil na identificação presuntiva das espécies do gênero *Candida*.

Posto isso, a utilização deste meio na rotina micológica facilita a detecção e a identificação dessas leveduras, que possuem importância clínica na prática, associada a resultados presuntivos em menor tempo que os obtidos quando comparados com os métodos clássicos (DAZALAN *et al.*, 2011).

2.4 SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA

A resistência às drogas comumente utilizadas no tratamento de leveduroses em pacientes graves ou que tenha doenças de base que deprimam a resposta imunológica, como é o caso de PVHIV, têm sido um problema crescente. As leveduroses sobretudo por espécies de *Candida* não *Candida albicans* precisam ser identificadas e realizadas testes de sensibilidade a antifúngicos na tentativa de instituir o tratamento adequado com brevidade (EVANS, 1999; LIU *et al.*, 2017).

Existem atualmente, vários métodos para avaliar a sensibilidade dos fungos frente a diferentes quimioterápicos, que permitam prever a evolução clínica dos pacientes com infecção fúngica. Para algumas drogas, no entanto, dificuldades de detecção de resistência e baixa correlação clínica são as maiores limitações dos métodos disponíveis (LIU *et al.*, 2017; KORDALEWSKA *et al.*, 2018; OHN *et al.*, 2019).

Os antifúngicos possuem características especiais quanto ao mecanismo de ação e via de administração, eles podem ser classificados com base no sítio-alvo e estrutura química. Os derivados azólicos fazem parte da classe de antifúngicos mais populares e largamente utilizados, têm como mecanismo de ação a inibição da biossíntese do ergosterol, que é importante para a integridade e a manutenção da função da membrana celular dos fungos (LACAZ; DEL NEGRO, 1994).

O fluconazol é o antifúngico mais conhecido, lançado em 1988 e a patente em 1981, com administração oral e endovenosa e importante contra vários tipos de infecções fúngicas, desde micoses superficiais a sistêmicas. Outro antifúngico mais novo e com potente ação e largo espectro é o voriconazol, apresenta-se sobre as formas oral e endovenosa, requer uma dose de carga inicial para obter concentrações plasmáticas estáveis em menor tempo possível. Como antifúngicos azólicos, atuam inibindo a enzima 14 alfa-desmetilase, dependente do citocromo P-450, essencial para a biossíntese de ergosterol (SIDRIM; ROCHA, 2004).

O voriconazol é ativo *in vivo* frente a uma série de infecções fúngicas, incluindo infecções por espécies do gênero *Aspergillus*, *Candida* e *Cryptococcus neoformans*, menos sensíveis a outros azólicos (FICA, 2004).

As equinocandinas representada pela micafungina, anidulafunina e caspofungina são drogas antifúngicas com efeito fungicida que agem inibindo a 1,3- β -D-glucan, precursor responsável pela formação de 1,3- β -glucan-D, um componente essencial da parede da célula fúngica. Há poucas evidências que sugerem que uma seja melhor que a outra, embora a anidulafungina parece ter menos interações medicamentosas que as demais. Foi aprovada em 2006, sendo ativa contra a maioria das espécies de *Candida* incluindo espécies com maior concentração inibitória mínima (CIMs) ao fluconazol (PFALLER; DEIKMAN, 2007).

Atualmente, a anidulafungina é a droga de escolha para os pacientes graves que desenvolveram candidemia invasiva e que fizeram uso do fluconazol. As equinocandinas apresentam a mesma eficácia clínica da anfotericina B, com a vantagem de não apresentar tantos efeitos colaterais (MONTERO *et al.*, 2012).

O grupo dos poliênicos representados pela nistatina, isolada em 1949 por Hazen e Brown (1950) a partir de *Streptomyces noursei*, e a anfotericina B, descoberta por Gold (1956) e isolada de *Streptomyces nodosus* agem ligando-se aos esteróis, em particular, o ergosterol (principal esterol presente da membrana celular dos fungos) produzindo poros ou canais, que aumentam a permeabilidade da membrana, gerando uma grande perda de eletrólitos, especialmente potássio, determinando assim a lise e morte celular (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Apesar dos agentes antifúngicos, como os triazóis altamente ativos e as equinocandinas, a candidíase invasiva, sobretudo em PVHIV está associada à altas taxas de morbidade e mortalidade. O fluconazol e outros azóis têm se mostrado eficazes para o manejo de infecções por espécies de *Candida*, no entanto, muitos isolados de *C. glabrata* exibem baixa sensibilidade aos antifúngicos azólicos (PFALLER *et al.*, 2014).

Além disso, em alguns estudos, *C. tropicalis* tem sido associado com altas taxas de mortalidade, particularmente em pacientes neutropênicos do que outras espécies de *Candida*, incluindo *C. albicans* (KORDALEWSKA *et al.*, 2018).

No Brasil, segundo as recomendações do Consenso Brasileiro de Medicina, anfotericina B, fluconazol e caspofungina constituem opções para o tratamento de micoses mais graves. Além dessas drogas, o voriconazol e a anidulafungina aparecem como opção de tratamento para espécies resistentes ao fluconazol e quando a condição clínica do paciente não permite a utilização de drogas com elevada toxicidade (PFALLER; DEIKMAN, 2007).

Em pacientes graves tornam-se necessários, testes capazes nortear o clínico para a melhor conduta terapêutica. Com isso, deve ser realizados teste de sensibilidade antifúngica, no qual baseia-se na medição do crescimento fúngico na presença de diferentes concentrações de determinado fármaco, de modo a determinar a CIM. O valor deste, ajuda a prever a probabilidade de eficácia terapêutica dos agentes testados.

Os métodos de referência para sensibilidade em espécies de *Candida* são ensaios de diluição de caldo elaborados pelo Comité Europeu de Testes de Susceptibilidade aos Antibióticos, do inglês *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI).

Para interpretação e leitura, metodologia do CLSI M27-A3 requer a leitura dos pontos finais da CIM para os azóis visualmente, afim de identificar a concentração mais baixa com uma redução proeminente no crescimento em comparação com o poço controle (sem drogas). De acordo com o EUCAST, pontos finais de leitura espectrofotométrica em microplacas com um leitor de placa de microdiluição podem diminuir a leitura subjetiva conforme recomendado para a determinação da CIMs (EUCAST, 2008).

Ambos os métodos de referência são robustos e reproduzíveis. No entanto, cada um requer tempo adicional após a subcultura inicial dos organismos, a depender da classe de antifúngicos e do fungo a ser avaliado. Além disso, variações podem ser observadas em pontos finais entre laboratórios porque a leitura dos pontos finais pode ser algo subjetiva (CLSI, 2012).

Um estudo realizado no Brasil por Terças *et al.* (2017) no qual avaliaram o perfil de sensibilidade de espécies de *Candida* isoladas da mucosa oral de 52 PVHIV alocadas no Hospital Presidente Vargas, em São Luís. Obtiveram leveduras que foram identificados pelo CHROMagar® *Candida* e o sistema automatizado VITEK®2, após a identificação, realizaram teste de sensibilidade antifúngica com o sistema VITEK®2, complementado com o Etest®, para as drogas anfotericina B, fluconazol, flucitosina e voriconazol. Os dados obtidos na pesquisa contataram que 83% das PVHIV desenvolveram candidíase orofaríngea e a espécie mais prevalente foi *C. albicans* (56%) e o teste de sensibilidade antifúngica mostrou que 64,7% das espécies de *Candida* foram sensíveis, 11,8% foram sensíveis à dose dependente e 23,5% resistentes ao fluconazol. Todos os isolados de *C. krusei* e *C. famata* e dois de *C. glabrata* foram resistentes ao fluconazol.

Os resultados mostraram que todas as cepas de *C. albicans* (n = 29), *C. tropicalis* (n = 6), *C. parapsilosis* (n = 2), e *C. guilliermondii* (n = 2) foram sensíveis a todos os antifúngicos testados. Todos os seis isolados de *C. krusei* foram resistentes ao fluconazol, quatro deles apresentaram suscetibilidade intermediária ao flucitocina, e todos foram sensíveis a anfotericina

B e voriconazol. Dois isolados de *C. glabrata* foram resistentes a fluconazol, um foi resistente a anfotericina B.

Os resultados de Terças *et al.* (2017) mostraram alta variabilidade na resistência entre as espécies isoladas e indica a necessidade de identificar a espécie de *Candida* bem como testar a sensibilidade aos antifúngicos como guia na terapia medicamentosa em PVHIV. Entretanto, a vigilância em outras leveduras também precisa ser realizada, sobretudo espécies do gênero *Cryptococcus*, no qual contribui para alta letalidade em PVHIV mesmo com o uso de antifúngicos (NASCIMENTO *et al.*, 2017).

Nos casos refratários e/ou redicivantes de criptococose, os sintomas neurológicos ocorrem frequentemente. As espécies de *Cryptococcus* mostram sensíveis à anfotericina B. O tratamento recomendado internacionalmente para meningite criptocócica é uma combinação com flucitosina e anfotericina B e em seguida, terapia de manutenção com fluconazol. A resistência à anfotericina B e flucitosina entre as cepas de *Cryptococcus* são menos de 1% das cepas, entretanto cepas não sensíveis aos azólicos têm surgido em todo o mundo (NASCIMENTO *et al.*, 2017).

No estudo realizado por Nascimento *et al.* (2017) com isolados clínicos de espécies de *Cryptococcus* de três grupos diferentes de pacientes frente aos antifúngicos. Dezenove pacientes HIV-positivos com meningite refratária (Grupo 1), 30 pacientes HIV-positivos que apresentaram um único episódio limitado de criptococose (Grupo 2) e 19 pacientes HIV-negativos com criptococose (Grupo 3).

No estudo foram isoladas 80 espécies de *C. neoformans* var. *grubii* e 7 isolados de *C. gattii*. A CIM de anfotericina B, drogas azólicas e flucitosina foi determinada para *Cryptococcus* spp. por teste de microdiluição em caldo e E-test. A CIM50 e CIM90 foram 0,25 e 0,50 µg/mL para anfotericina B, 4,0 e 8,0 µg/mL para fluconazol, 0,06 e 0,25 µg/mL para itraconazol, 0,25 e 0,50 µg/mL para voriconazol e 8,0 e 16,0 µg/mL para flucitosina, respectivamente. A anfotericina B e o itraconazol apresentaram maior CIMs para *C. neoformans* var. *grubii* e *C. gattii*. As CIMs de fluconazol e itraconazol obtidos com o E-test foram superiores aos obtidos com microdiluição em caldo. Isolados de não-HIV coinfectados foram menos sensíveis aos azóis. Não houve diferença na sensibilidade de *C. neoformans* var. *grubii* isolados de pacientes com evolução desfavorável ou ao longo dos episódios de meningite recidivante e/ou refratária ((NASCIMENTO *et al.*, 2017).

O crescente número de espécies de *Cryptococcus* resistente aos azólicos pode ser um dos fatores críticos que determinam um desfecho ruim em PVHIV com criptococose. A avaliação da sensibilidade a antifúngico frente a isolados de *Cryptococcus* é recomendada para

planejar o tratamento do paciente e também para monitorar a tendência de resistência aos medicamentos utilizados na prática clínica.

2.5 CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DO BIOFILME

As leveduras do gênero *Candida* exibem uma série de fatores de virulência que dificulta uma resposta imunológica e o sucesso da terapia antifúngica. Os fatores de virulência mais comum incluem: adesão a substratos inertes e biológicos, formação de biofilme, crescimento em altas temperaturas, formação de tubo germinativo com consequente desenvolvimento da forma filamentosa, produção de toxinas e enzimas extracelulares hidrolíticas e atividade hemolítica (ÁLVARES *et al.*, 2007; COSTA *et al.* 2010).

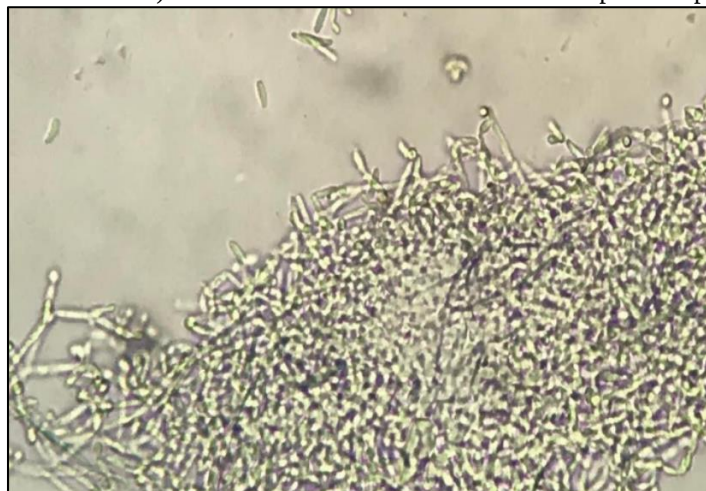
A adesão de leveduras à superfície de células hospedeiras é mediada por macromoléculas denominadas adesinas (estruturas da superfície do microrganismo que interagem com receptores específicos nas células eucarióticas). Um patógeno pode expressar uma ou mais adesinas, e essa expressão é regulada por fatores ambientais ou do hospedeiro. O contato entre a levedura e a superfície tecidual do hospedeiro, constitui a fase primária na patogênese de doenças infecciosas (MACHADO *et al.*, 2010).

A habilidade para se ligar aos constituintes do hospedeiro confere ao patógeno fúngico um mecanismo de camuflagem que o protege do reconhecimento do sistema imune hospedeiro. Contudo, a capacidade de aderência configura uma vantagem adaptativa para o fungo. A capacidade de formar biofilme é uma importante fator de virulência que afeta diretamente a progressão, gestão e resultado de doenças infecciosas (SENET, 1998; MEDRANO *et al.*, 2006).

O biofilme pode ser definido como um tipo de aderência na qual os microrganismos formam agregados unicelulares, gerando estruturas multicelulares que aderem a superfícies. Existe uma variedade de condições, incluindo alta densidade celular, privação de nutrientes e estresse físico ambiental que desencadeia a formação (O'TOOLE *et al.*, 2000).

Biofilmes formados por estruturas fúngicas consistem em uma densa rede de leveduras, hifas e pseudohifas embebidos numa matriz de polímeros extracelulares – polissacarídeos, carboidratos, proteínas, que podem passar por mudanças para que ocorra a transição da forma de desenvolvimento de células livres para a forma de biofilme (Figura 4) (CHANDRA *et al.*, 2001).

Figura 4: São evidenciadas estruturas microscópicas (matrix polimérica, filamentos micelianos, blastoconídios e clamidoconídios) do biofilme de *C. albicans* formado em placa de poliestireno.



Fonte: a autora, 2022.

A capacidade das leveduras de aderir a uma ampla variedade de superfícies inanimadas e formar biofilme em soluções glicosiladas parece protegê-las das respostas imunes do hospedeiro, bem como da ação de agentes antimicrobianos; garante as leveduras maior patogenicidade (COSTA *et al.* 2010). Associado a formação de biofilme, as células fúngicas exibem muitas características fenotípicas, sendo a tolerância antifúngica a característica mais marcante (CORDEIRO *et al.*, 2017).

Biofilmes patogênicos formados por espécies de *Candida*, sobretudo a *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* constituem um sério risco a vida do paciente. Nesse âmbito, foi observado que a composição dos dispositivos favorece a capacidade de se aderir e formar biofilmes pela mediação das adesinas do fungo (CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2012). Pesquisas indicam que 65-80% das infecções microbianas são resultantes de biofilmes patogênicos, no entanto, o biofilme formado por espécies de *Candida* ainda não é totalmente compreendido (YU *et al.*, 2017).

Para a formação do biofilme, as células passam por uma fase complexa de preparo. Sendo assim, a célula-mãe do biofilme se adere a superfície livre e utiliza diversos mecanismos auxiliares para que ocorra a adesão de forma eficiente, como adesinas e interações eletrostáticas não específicas. Após essa fase, a célula passa a liberar substâncias mantedoras da adesão e início da formação de micro colônias que irão coalescer. Em seguida, tem-se o biofilme formado por estruturas do fungo, matriz polimérica, poros e canais de água que permitem o fluxo de nutrientes e metabólitos. O biofilme se desloca e pode liberar leveduras que têm a habilidade de se desenvolverem em condições desfavoráveis e formar novas estruturas de biofilme (MONROE, 2007).

Leveduras patogênicas em PVHIV que fazem uso de cateter, possui um alto risco para formação de biofilmes por esses microrganismos, portanto, é importante que os profissionais de saúde que atuam no manejo desses pacientes, fiquem atentos aos cuidados e precauções. O fluido da infusão ou o conduto do cateter podem estar contaminados e essa contaminação se originar na extremidade distal do cateter no ato da inserção ou os microrganismos podem migrar pelo cateter a partir do local de inserção (SHERERTZ, 2000; DOUGLAS, 2003).

No estudo realizado por Lamichhane *et al.* (2020), com PVHIV alocadas no Hospital de Doenças Infecciosas em Katmandu, Nepal, os pesquisadores realizaram coletas de 174 swabs orofaríngeos e cultivaram em ágar Sabouraud dextrose. As espécies de *Candida* foram diferenciadas no meio CHROMagar® *Candida* e realizados testes de sensibilidade antifúngica bem como produção de biofilme em placa de microtitulação. Das 174 amostras de orofaringe, 23,6% (n=41/174) delas apresentaram crescimento fúngico e 36,6% das infecções orofaríngeas (15/41) os pacientes tinha, contagem de linfócitos T CD4 abaixo de 200 células/ μ L.

Quanto as espécies isoladas, 61% (25/41) foram de *C. albicans* e 39% (16/41) de *C. não albicans*. Das 41 espécies de *Candida* isoladas, 65% (27/41) foram produtoras de biofilme. Os isolados de *Candida* produtores de biofilme apresentaram a maior resistividade (51,9%; 14/27) ao cetoconazol e a menor (22,2%; 6/27) ao clotrimazol. Entre os isolados de *Candida*, 61% (25/41) foram de *C. albicans* e 39% (16/41) eram *C. não albicans* sendo, (14,6%;6/41) de *C. parapsilosis* seguido por *C. tropicalis* (9,8%; 3/41). Das 41 espécies *Candida*, 65% (27/41) foram produtores de biofilme, entre os quais 16 foram *C. albicans* e 11 *Candida não albicans*. Entre os 27 produtores de biofilme, 8 foram fortes produtores de biofilme, em igual proporção de espécies de *C. albicans* e *Candida não albicans* e 19 espécies moderados, e concluíram que não houve correlação significativa entre espécies de *Candida* e formação de biofilme (LAMICHHANE *et al.*, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Diagnosticar leveduroses em PVHIV por taxonomia polifásica e caracterizar a virulência das leveduras isoladas quanto a resistência fúngica e formação de biofilme.

3.2 ESPECIFICO

- ✓ Isolar e identificar as leveduras presentes nas amostras clínicas de PVHIV internados em enfermaria DIP (doenças infecto-parasitárias) e UTI DIP (Unidades de Terapia Intensiva- Doenças infecto-parasitárias) de dois hospitais públicos terciários da cidade do Recife- PE;
- ✓ Determinar as leveduras de maior ocorrência em PVHIV;
- ✓ Comparar as metodologias usadas na identificação: (MALDI-TOF (VITEK[®] MS), VITEK[®]2 e CHROMOagar[®] *Candida*) dos isolados obtidos de PVHIV;
- ✓ Avaliar atividade antifúngica *in vitro* e determinar a concentração inibitória dos isolados frente ao fluconazol, voriconazol, anidulafungina, caspofungina, micafungina e anfotericina B;
- ✓ Avaliar *in vitro* a capacidade de formação de biofilme dos isolados fúngicos.
- ✓ Avaliar os dados clínicos-epidemiológicos dos pacientes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAIS DA PESQUISA

Participaram deste estudo PVHIV alocados em Enfermaria DIP e UTI-DIP do Hospital Universitário Oswaldo Cruz e Hospital das Clínicas, ambos localizados em Recife-PE. O projeto obteve aprovação do comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco, CAAE nº 03682818.7.0000.5208.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Critério de inclusão – Para ser incluído no estudo, foram pacientes adultos, de ambos os sexos, HIV positivos alocados em enfermarias ou UTI de doenças infecto-parasitárias alocados no hospital Universitário Oswaldo Cruz e Hospital das Clínicas que tiveram suspeitas de leveduroses.

Crítérios de exclusão – Foram excluídos do estudo pacientes adultos que foram diagnosticados com infecções fúngicas causadas por fungos filamentosos.

4.3 REALIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO

O procedimento para obtenção das amostras clínicas foi realizado de acordo com a suspeita e localização da lesão. Espécimes clínicos como sangue, líquido, fragmentos de tecidos obtidos por biópsia e punção foram coletados pelos profissionais capacitados dos referidos hospitais.

O tipo e a qualidade da amostra biológica, submetida ao laboratório de micologia, são fatores pré-analíticos extremamente importantes para o sucesso do isolamento e identificação do verdadeiro agente etiológico de infecções fúngicas. Para os pacientes com suspeita de candidemia foram coletados de 2 a 3 amostras de hemoculturas a cada 30 minutos. O volume coletado foi de 5 mL de sangue periférico adicionado em frascos de hemocultura contendo caldo BHI e incubados a 35°C por 24 h, após esse período foi realizado o semeio das amostras.

Para os pacientes com suspeita de criptococose foram coletados de 1 a 3 mL de líquido em tubo seco e processados imediatamente. As amostras de orofaringe foram realizadas coletas com *swab* sendo transportadas em meio de transporte Stuart. As amostras foram tratadas conforme o protocolo “Manual da detecção e identificação de fungos de importância médica”

elaborado pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013).

Todas as amostras biológicas coletadas foram submetidas ao exame direto e cultura. Para o exame direto, foram preparadas lâminas coradas, clarificadas com KOH a 20% ou contrastadas com tinta de nanquim conforme o tipo de material trabalhado. Concomitantemente, as amostras clínicas foram semeadas em duplicata na superfície do meio ASD adicionado de 50 mg/L de cloranfenicol contido em placas de Petri, mantidas à temperatura de 30° C e 37° C por até 15 dias para o isolamento fúngico.

Após o surgimento das colônias estas foram purificadas e identificadas pela espectrometria de massas por MALDI-TOF (VITEK[®] MS), pela automação VITEK[®]2 e semeadas em meio cromogênico (CHROMOagar[®] *Candida*) e posteriormente realizados testes de sensibilidade conforme o documento M27 A-3 do CLSI e caracterização de biofilme dos isolados.

4.3.1 Identificação proteômica através do MALDI-TOF (VITEK[®] MS)

A identificação das leveduras foi realizada através de espectrometria de massa MALDI-TOF (VITEK[®] MS, BioMérieux, França) conforme instruções do fabricante. Para identificação foram utilizadas suspensões dos isolados clínicos de *Candida* cultivadas e mantidas em meio Dextrose Peptona Extrato de Levedura (YEPD) a 35° C por 24 horas e de *Cryptococcus* mantidas em ASD a 35° C por 48 horas. Com o auxílio do palito de madeira, a amostra foi colocada no círculo com dimensões delimitadas pelo fabricante, preenchendo todo o espaço do desenho com movimentos circulares. As leveduras foram lisadas com ácido fórmico. Para isso 0,5 µL de ácido fórmico 70% foram adicionados ao esfregaço no círculo. Após a secagem, 1 µL da matriz CHCA foi adicionada sobre a amostra lisada.

O sistema VITEK[®]MS lê cada espectro como uma série de picos que são detectados e classificados por massa e intensidade. Com a utilização do classificador de espectros avançados, a melhor discriminação é fornecida como todos os picos e considerado no cálculo do resultado da identificação. O VITEK[®]MS exibe o status do instrumento e adquire os espectros e são então enviados para o MYLA[®] da estação de aquisição para análise. Após o tempo de análise, os resultados considerados satisfatórios foram obtidos pela correlação com o perfil do espectro do banco de dados SARAMIS (*Spectral Archive and Microbial Identification System*).

4.3.2 Identificação através do VITEK® 2

O equipamento automatizado VITEK®2 YST destinou-se a identificação automática das leveduras, nas quais foram preparados os inóculos a partir da cultura pura, de acordo com as instruções do fabricante. Com o auxílio de um bastão ou *swab* estéril as colônias puras foram transferidas para o tubo de ensaio plástico transparente contendo 3,0 mL de solução salina estéril (NaCl aquoso de 0,45% a 0,50%, pH 4,5 a 7,0) com uma densidade equivalente entre a escala de 1,80 a 2,20 McFarland medida pelo calibrador VITEK® 2 DensiCHEK™, em seguida o tubo contendo a suspensão e o cartão YST foram colocados no cassete. Como parte do processo de identificação, o software comparou o conjunto de reações do teste com o conjunto de reações típicas de cada isolado. Um valor quantitativo, a probabilidade percentual, foi calculada e liberada em relação a espécie identificada.

4.3.3 Identificação através do CHROMOAGAR® *candida*

Os isolados foram repicados em ASD e incubados a 37°C por 24h. Em seguida, foi realizado um novo repique no meio seletivo/diferencial CHROMagar® *Candida* (Plastlabor, Rio de Janeiro, Brasil) e as placas incubadas a 37° por até 48h. As leveduras foram identificadas presuntivamente por meio da coloração e aspecto da cultura. As colônias de *C. albicans* apresentaram com coloração verde-claro a verde médio, as de *C. tropicalis* azuis esverdeadas a azul metalizado e as de *C. krusei* coloração cor-de-rosa claro com um rebordo esbranquiçado (ARAÚJO et al., 2005).

4.4 TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

A técnica foi realizada de acordo com o protocolo M27-A3 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). Para controle de qualidade, linhagens do *American Type Culture Collection* (ATCC), recomendadas pelo protocolo padrão foram incluídas, como a cepa *Candida parapsilosis* ATCC® 22019. Além disso, dois poços controles, isentos de antifúngico e leveduras, foram incluídos no ensaio. A concentração inibitória mínima (CIM) foi a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível dos isolados testados, em relação ao poço controle.

O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, pH 7,0 ± 0,1, com ácido morfolino propano sulfônico (MOPS;

0,165 mol. L⁻¹; Sigma-Aldrich), o meio de cultura foi esterilizado em membranas de 0,22 µm (Millipore, Darmstadt, Alemanha).

Os agentes antifúngicos comerciais utilizados foram fluconazol (Pfizer, Nova York, EUA) preparado em água deionizada, voriconazol, antifúngicos da classe das equinocandinas: anidulafungina, micafungina e caspofungina (Pfizer, Nova York, EUA) e anfotericina B preparadas em Dimetilsulfóxido (DMSO) e concentrações de voriconazol, anidulafungina caspofungina, micafungina e anfotericina B e foram preparadas e usadas nos intervalos de 0,03 a 16 µg/mL, e do fluconazol nos intervalos de 0,125 a 64 µg/mL.

Os isolados clínicos de *Candida* e *Cryptococcus* foram mantidos em meio ASD e incubados a 35°C por 24 horas. As suspensões dos isolados foram preparadas em solução salina, e sua densidade ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland em 90% da transmitância utilizando um espectrofotômetro a 530nm. O volume do inóculo foi ajustado para 5,0 mL de solução salina esterilizada para uma concentração de 1×10^6 céls/mL.

Nos testes de sensibilidade foram utilizadas placas de microtitulação planas de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). O inóculo foi adicionado aos poços com os antifúngicos a serem testados, e as placas foram incubadas a 35 °C durante 24 horas para determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM). As CIM para as equinocandinas e o fluconazol foram determinadas para 50% de inibição em relação aos poços controles. Os testes foram realizados em duplicatas.

A leitura dos resultados foi baseada nas diretrizes do documento M60-Ed2 do CLSI (2020) o qual informa a CIM para cada isolado frente à droga utilizada. Segundo o referido documento, os valores de corte epidemiológico para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* frente ao fluconazol são: CIM ≤ 2µg/mL são consideradas sensíveis, ≥ 8 µg/mL resistentes e 4 µg/mL sensíveis dose dependente (SDD); os isolados de *C. krusei* são considerados intrinsecamente resistentes ao fluconazol, e suas CIMs não devem ser interpretados usando essa escala. Para o voriconazol, as espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são: CIM ≤ 0,12µg/mL são consideradas sensíveis; entre 0,25 – 0,5 são consideradas intermediárias e ≥ 1 µg/mL resistentes.

Para as equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina), as espécies *C. albicans* e *C. tropicalis* são: CIM ≤ 0,25µg/mL são consideradas sensíveis; 0,5 são consideradas intermediárias e ≥ 1 µg/mL resistentes. Para *C. parapsilosis* CIM ≤ 2µg/mL é considerada sensível; 4 é considerada intermediária e ≥ 8 µg/mL resistente. Para a anfotericina B, CIM ≥ 2µg/mL é considerada resistente.

4.5 CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

O método para avaliar a capacidade de formação do biofilme foi adaptado de Pfaller *et al.* (1995) e Ruiz *et al.* (2013). As leveduras foram cultivadas em ASD por 24h a 37°C. Após o crescimento das culturas, foram preparadas suspensões de células de levedura em 5mL de RPMI-Hepes 1640 e a turbidez ajustada a 0,5% na escala de McFarland usando espectrofotômetro (Thermo Scientific, USA).

Em seguida, 100µL de cada suspensão foi inoculada, em triplicata, em poços de placas de poliestireno de 96 poços e incubadas a 37°C por 1,5h sob rotação (75rpm). Ao fim do período, as células não aderidas as placas foram removidas através de lavagens com tampão PBS. Posteriormente, foi adicionado 200µL de RPMI-Hepes 1640 aos poços e as placas incubadas por 24, 48 e 72h.

A atividade metabólica do biofilme foi determinada com o reagente brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (do inglês *DIMETHYL-2-THIAZOLYL TETRAZOLIUM-BROMIDE* - MTT) (SITTAMPALAM *et al.*, 2004). Dessa forma, as placas contendo os biofilmes foram inoculados com 20µL do MTT-PBS, ao abrigo da luz, e incubadas por 2h a 37°C. Em seguida, o líquido presente no interior dos poços foi desprezado e adicionado 200µL de isopropanol absoluto, sendo a placa mantida em repouso por 15min.

Em seguida, foram transferidos 100 µL de cada micropoço para uma nova microplaca sendo a atividade formadora de biofilme avaliada pela diferença de densidade óptica entre o biofilme formado e o poço controle, pela leitura em leitor de Elisa ajustado com comprimento de onda de 570nm. Os ensaios para cada isolado foram realizados em triplicata, e os dados obtidos foram tratados estatisticamente por meio de programação *PYTHON*.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o tratamento estatístico dos dados obtidos, foi realizada uma análise exploratória com estatística determinística utilizando *Data Science* através de um script implementado em linguagem de programação *PYTHON*. Concernente à linguagem, as bibliotecas (coleção de métodos e classes) *PANDAS*, *NUMPY* e *MATPLOTLIB* foram utilizadas para simplificar os processos de análise de dados.

Os dados foram carregados de um *Dataset* com todos os registros das amostras coletadas, armazenando todas as informações pertinentes tais como: Nome do paciente, origem,

sexo, idade, tipo de amostra, fungo isolado, tipo de teste realizado para o diagnóstico, perfil de sensibilidade antifúngica e caracterização de biofilme.

Data Science é um conjunto de preceitos, métodos e processos com a capacidade de observar e entender fenômenos através de análise de dados automatizada (PROVOST, 2016).

Python possui uma sintaxe bastante simplória e largamente difundida em análise de dados em comparação com outras linguagens, além de possuir várias bibliotecas como ferramentas para tratamento de dados com alta performance (FERREIRA, 2021, p. 98).

A biblioteca *Pandas* fornece estruturas de dados e métodos em alto nível, e é concebida para fazer com que a análise e processamento dos dados estruturados ou tabulares seja de maneira eficiente, simples e significativa (MCKINNEY, 2018). *Pandas* possui estruturas de dados de alta performance denominadas *Data Frames*, sendo, por fim, a mais completa e difundida biblioteca para *Data Science* dentre todas da linguagem *Python* (FERREIRA, 2021, p. 98).

A biblioteca *Numpy* é muito utilizada para execução de cálculos em estruturas de dados conhecidas como arrays ou listas (muito similares aos *Data Frames*). *Numpy* oferece uma coleção de funções que auxiliam em cálculos estatísticos e numéricos (FERREIRA, 2021, p. 98). *Matplotlib* é uma biblioteca que possibilita a visualizações dos dados através da plotagem e geração de gráficos e tabelas (MCKINNEY, 2018).

A plataforma *Jupyter Notebook* foi utilizada como interpretador da linguagem *Python*. Esta plataforma possui código aberto que possibilita criar documentos, executar scripts em *Python* ou outras linguagens, facilitando a leitura, execução e reutilização destes scripts. Aliado a isso, pode-se destacar a interatividade desta plataforma, bem como sua facilidade de integração com as bibliotecas *Matplotlib* e *Pandas* (MCKINNEY, 2018).

5 RESULTADOS

Os resultados da pesquisa estão apresentados em forma de artigo, dispostos nos Apêndices A e B.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que:

- ✓ *Candida albicans* e *Candida tropicalis* foram as leveduras mais isoladas em pessoas vivendo com HIV em dois hospitais públicos da cidade do Recife;
- ✓ Indivíduos do sexo masculino foram os mais acometidos com leveduroses;
- ✓ *Cryptococcus neoformans* foram as espécies mais frequentes causadores de meningite fúngica;
- ✓ O MALDI-TOF MS consegue identificar espécies de leveduras, em que a diferenciação apenas seria possível por Métodos de Biologia Molecular e possui 99,99 % de confiabilidade;
- ✓ A concordância do sistema VITEK[®]2 com o MALDI TOF (VITEK[®]MS) foi de 92,59%;
- ✓ A concordância do CHROMOagar[®] *Candida* com o MALDI TOF MS foi de 74,07%;
- ✓ 51,8% dos isolados fúngicos exibiram um perfil de sensibilidade a todas as drogas testadas.
- ✓ O voriconazol foi a droga com maior índice de resistência;
- ✓ A Anfotericina B foi a droga com maior sensibilidade;
- ✓ *Cryptococcus gattii* exibiu um perfil de resistência maior que os isolados de *Cryptococcus neoformans*;
- ✓ 77,7% das leveduras tiveram uma alta atividade metabólica na formação de biofilme em 24, 48 e 72 horas;
- ✓ *Candida parapsilosis* foi a levedura com maior atividade metabólica.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, H.P; SALARI, S.; ALMANI, P.G.N. Oropharyngeal candidiasis in HIV/AIDS patients and non-HIV subjects in the Southeast of Iran. **Current Medical Mycology**. v. 4, n .4. p.1-6, 2018.
- ALIZADEH, M. *et al.* Identification of *Candida* species isolated from vulvovaginitis using matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Curr Med Mycol**. v.3, n.4, p.21-25, 2017.
- ÁLVARES, C.; SVIDDZINSKI, J.; CONSOLARO, M.E.L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **J Bras Pat e Med Lab**. v. 43, n 5, p. 319-327, 2007.
- ALVES, S.E. **Mortalidade por criptococose no Brasil (2000 a 2012)**. 2015. 95 p. Tese (Doutorado) *FIOCRUZ* Rio de Janeiro, 2015. Disponível em <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/tes-6722>. Acesso em: 5 fev. 2022.
- AMBE, N.F. *et al.* The prevalence, risk factors and antifungal sensitivity pattern of oral candidiasis in HIV/AIDS patients in Kumba District Hospital, South West Region, Cameroon. **Pan Afr Med J**.v. 36, n.23, p-1-14, 2020.
- ANDRADE, J. G.; FREITAS, H. F.; CASTILHO, M.S. Estudos de QSAR 2D baseados em descritores topológicos e fragmentos moleculares para uma série de derivados azólicos ativos contra *Candida albicans*. **Química Nova**. v.35, n.3, p.466-472, 2012.
- ANDREW, H.L; ANTOINE, A.T; THOMAS, S.H. Fungal infections in HIV/AIDS. **Lancet Infect Dis**. v.17, n.11. p-334-343, 2017.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. ANVISA. Brasil, ed.1, p.1: 62, 2004.
- ANWAR, K.P.; MALIK, A; SUBHAN, K.H. Profile of Candidiasis in HIV Infected patients. **Iran J Microbiol**. v. 4, p. 204–209, 2012.
- ARASTEHFAR A. *et al.* Comparison of 21-Plex PCR and API 20C AUX, MALDI-TOF MS, and rDNA Sequencing for a Wide Range of Clinically Isolated Yeast Species: Improved Identification by Combining 21-Plex PCR and API 20C AUX as an Alternative Strategy for Developing Countries. **Front Cell Infect Microbiol**.v.15, n.9, p.1-9, 2019.
- ARAÚJO, M.R.B. *et al.* Identification of *Cryptococcus neoformans* by MALDI-TOF mass spectrometry in blood culture. **Clin Biomed Res**.v.38, n.2, p.200-202, 2018.
- ARMOSTRONG- JAMES, D. *et al.* AIDS-related mycoses: current progress in the field and future priorities. **Trends Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 428–30, 2017.
- ASSIS, D. M.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A. A Espectrometria de Massas aplicada na Classificação e Identificação de microrganismos. **Rev Univ Vale Rio Verde**. v. 9, n .2, p. 344-355, 2011.

ASLANI, N. *et al.* Identification of uncommon oral yeasts from cancer patients by MALDI-TOF mass spectrometry. **BMC Infect Dis.** v.18, n.24, p.1-11, 2018.

ASSIS, D. M.; JULIANO, L.; JULIANO, M.A.A. Espectrometria de Massas aplicada na Classificação e Identificação de microrganismos. **Rev Univ Vale Rio Verde.** v. 9, n. 2, p. 344-355, 2011.

AUBERTINE, C. *et al.* Comparative study of the new colorimetric Vitek 2 yeast identification card versus the older fluorometric card and of CHROMagar *Candida* as a source medium with the new card. **J Clin Microbiol.** v. 44, n.1, p-227-228, 2006.

BAO, J. *et al.* Rapid, accurate identification of *Candida auris* by using a novel matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) database (Library). **J Clin Microbiol.** v. 56, n.4, p-1-3, 2018.

BARREIRO, J. R. **Identificação de patógenos causadores de mastite subclínica por espectrometria de massas.** 2010. 75p. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal). Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010. Disponível em https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10135/tde-03082012-155228/publico/JULIANA_R_BARREIRO.pdf. Acesso em: 30 julho de 2022.

BASSETTI, M.T. *et al.* A multicenter study of septic shock due to candidemia: outcomes and predictors of mortality. **Intens Care Med.** v. 40, n.6, p. 839–845, 2014.

BAUTERS, T.G.; NELIS, H.J. Comparison of chromogenic and fluorogenic membrane filtration methods for detection of four *Candida* species. **J. Clin. Microbiol.** v. 40, n. 5.p. 1838-1839, 2002.

BERGOLD, A.M.; GEORGIADIS, S. New antifungic drugs: A review. **Visão academic.** v. 5, n.2, p.159-172, 2004.

BERTAGNOLIO, S. *et al.* Hospital acquired candidemia in HIV-infected patients. Incidence, risk factors and predictors of outcome. **J Chemother.** v.16.n.2, p-172-178, 2004.

BESSÈDE, E. *et al.* Matrix-assisted laser-desorption/ionization biotyper: experience in the routine of a university hospital. **Clin Microbiol Infect.** v. 17, n.4, p.533–538, 2011.

BRETAGNE, S. *et al.* Active Surveillance Program to Increase Awareness on Invasive Fungal Diseases: The French RESSIF Network (2012 to 2018). **mBio.** v.13, n.3, p.1-16, 2022.

BIOMÉRIEUX.VITEK® 2 YST. Ref. 21343 043908- 02 - 2016-10 Inc. 100. North Carolina USA. <https://www.manualslib.com/manual/1291233/BiomérieuxVitek2.html#manual>. Acesso em: 27. julho.2020.

BORGES, M. R. *et al.* Fatores de risco associados à colonização por *Candida* spp. em neonatos internados em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal Brasileira. **Rev Soc Bras Med Trop.** v.42, n. 4, p. 431-435, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica /Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2013. 46p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Epidemiológica da Criptococose**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.16p.

BRILHANTE, R.S.N. *et al.* Antiretroviral drugs saquinavir and ritonavir reduce inhibitory concentration values of itraconazole against *Histoplasma capsulatum* strains in vitro. **Braz J Infect Dis**. v. 20, n.2, p.155–159, 2016.

CARBONELLE, E. *et al.* MALDI-TOF Mass Spectrometry Tools for Bacterial Identification in Clinical Microbiology Laboratory. **Clin Biochem**. v. 44, n 1, p. 104– 109, 2011.

CARBONNELLE, E.; NASSIF, X. Applications of MALDI-TOF-MS in clinical microbiology laboratory. **Méd Sci MS**. v. 27, n.10, p. 882-888, 2011.

CAROLIS, E. *et al.* Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for caspofungin susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* species. **J Clin Microbiol**. v. 50, n.7, p. 2479–2483, 2012.

CARRILLO-MUNÓZ, A.J. *et al.* Evaluación del medio Chromalbicans Agar para la identificación presuntiva de *Candida albicans*. **Rev Iberoam Micol**. v. 18, n. p.501-108, 2001.

CARVALHO, L.P. *et al.* Avaliação da resposta imune celular em pacientes com candidíase recorrente. *Rev Bras Med Trop*. v. 36, n.5, p. 571-576, 2003.

CHANDER, J. **Textbook of Medical Mycology**, 2nd ed. JP Medical Ltd. p. 212- 227, 2017.

CHANDRA, J. *et al.* Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. **J Bacteriology**. v.183, n.18, p. 5385–5394, 2001.

CHASTAIN, D.B.; NHENAO- MARTINES, A.F; FRANCO-PAREDES, C. Opportunistic Invasive Mycoses in AIDS: Cryptococcosis, Histoplasmosis, Coccidioidomycosis, and Talaromycosis. **Curent Infectious Disease**, v.19, n.10, p. 19-36, 2017.

CHOWDHARY, A. *et al.* *Candida auris*: a rapidly emerging cause of Hospital acquired multidrug-resistant fungal infectious globally. **Plos Pathology**, p. 1-10, 2017.

CHUKWUANUKWU, R.C. *et al.* *Cryptococcus neoformans* seropositivity and some haematological parameters in HIV seropositive subjects. **J Infect Public Health**. v.13, n.7, p.1042-1046, 2020.

CLARK, T.A.; HAJJEH, H.A. Recent Trends in The Epidemiology of Invasive Mycoses. **Curr Opin Infect Dis**. v.15, n. 6, p. 569-574, 2002.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-second edition. **Clin. Lab. Stand.** Inst. Wayne, PA. v. M27-A3, 2008.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-second edition, **Clin. Lab. Stand.** Inst. Wayne, PA. vol. S4, 2012.

CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: approved standard-second edition, **Clin. Lab. Stand.** Inst. Wayne, PA. v. M60-Ed2, 2020.

CONRADO, T. *et al.* Vitamin D deficiency in HIV- Infected individuals: One more risk factor for bone loss and cardiovascular disease. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 54, n.2, p.117-122, 2010.

CORDEIRO, R. A. *et al.* *Trichosporon inkin* biofilms produce extracellular proteases and exhibit resistance to antifungals. **J Med Microbiology.** v. 64, n.11, p.1277–1286, 2015.

CORDEIRO, R.A. *et al.* The HIV aspartyl protease inhibitor ritonavir impairs planktonic growth, biofilm formation and proteolytic activity in *Trichosporon* spp. **Biofouling.** v.33, n.8, p. 640–650, 2017.

COSTA, C. R. *et al.* Differences in exoenzyme production and adherence ability of *Candida* spp. Isolates from catheter, blood and oral cavity. **Rev Inst Med Trop.** v. 52, n .3, p. 139-14, 2010.

CUÉLLAR-CRUZ, M. *et al.* *Candida* species: new insights into biofilm formation. **Future Microbiol.** v. 7, n.6, p. 755–771, 2012.

DAZALAN, D. *et al.* Comparação do perfil de susceptibilidade entre isolados clínicos de *Candida* spp. orais e vulvovaginais no Sul do Brasil. **J Bras Pat Med Lab.** v.47, n. 1, p.33-38, 2011.

DE ARAUJO, C.R. *et al.* Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno CRHOMOagar *Candida*. **Ver Pat Trop.** v. 34, n.1, p.37-42, 2005.

DE PAULA, S.B. *et al.* Oral *Candida* colonization in HIV-infected patients in Londrina-PR, Brazil: antifungal susceptibility and virulence factors. **J Infect Dev Ctries.** v. 9, n.12, p.1350-1359, 2015.

DE HOOG, G.S. *et al.* **Atlas of Clinical Fungi**, 2 ed: Utrecht/Reus, Centra albureau voor Schimmel cultures /Universitat Rovira i Virgili. 2000.

DENNY, C.E. *et al.* Oral lesions in HIV/ AIDS patients on a highly active antiretroviral therapy. **World J Orthod.** v.7, n. 2.p. 95–99, 2016.

DOUGLAS, L.J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends Microbiology.** v. 11, n.1, p. 30-36, 2003.

ELSEGEINY, W.; MARR, K.A; WILLIAMSON, P.R. Immunology of cryptococcal infections: developing a rational approach to patient therapy. **Front Immunol.** v. 9, n .651, p.1-9, 2018.

EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST). Definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. **Clinical of Microbiology Infectious**. v. 14, p. 398–405, 2008.

FERREIRA, E.G.D. **Uso de ferramentas de data science para avaliação dos dados zootécnicos de produção de linhagens de camundongos: uma proposta de melhorias ao gerenciamento do plantel**. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia). Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ. Curitiba, 98p. 2021.

FICA, C.A. Tratamiento de infecciones fúngicas sistêmicas primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. **Rev Chil Infect**. v. 21, n. 1:p. 26-38, 2004.

FURLANETO-MAIA, L. *et al*. Estudo da incidência de amostras clínicas do gênero *Candida* isoladas de diversos sítios anatômicos. **Acta Scientiarum Health Science**. v. 29, n.1, p. 33-37, 2007.

GAITÁN-CEPEDA, L.A.; , SÁNCHEZ-VARGAS, O.; CASTILLO, O. Prevalence of oral candidiasis in HIV/AIDS children in highly active antiretroviral therapy era. A literature analysis. **Int J STD AIDS**. v.26, n.9, p.625-632, 2015.

GOULART, V. A. M.; RESENDE, R. R. MALDI-TOF: uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do câncer. **Nanocell News**. v.1, n. 3, p.23-28, 2013.

GOVENDER, N.P. *et al*. HIV Infection as Risk Factor for Death among Hospitalized Persons with Candidemia, South Africa, 2012-2017. **Emerg Infect Dis**. v. 27, n.6, p.1607–1165, 2021.

HARDISON, E.; BROWN, G. D. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. **Nat immunol**. v. 13, n. 9, p. 817- 822, 2012.

HARETON, T.V. *et al*. Invasive fungal infection by *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* with boné marrow and meningeal involvement in HIV infection patient: a case report. **BCM infect Dis**. v 19, n. 220, p.1-8, 2019.

HAZEN, K.C.; HOWOLL, S.A. *Candida*, *Cryptococcus* and other yeast of medical importance. **Clinical Microbiology**. p. 1762-1788, 2007.

HOU, T.Y.; CHIANG-NI, C.; TENG, S.H. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. **J Food Drug Anal**. v. 27, n.2, p.404-414, 2019.

JANNETTO, P.J.; FITZGERALD, R.L. Effective Use of Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory. **Clin Chem**. v. 62, n.1, p.92-98, 2016.

JOHANSSON, A; NAGY, E, SOKI, J. Instant screening and verification of carbapenemase activity in *B. fragilis* in positive blood culture, using matrix-assisted laser desorption Ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). **J Med Microbiol**. v.63, n.8, p.1105-110, 2014.

JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS. UNAIDS Data 2019. Geneva.2019. <https://www.unaids.org/en/resources/documents/2019/2019-UNAIDS-data>. Acesso em: 30. julho. 2022.

KLIEMANN, D.A. *et al.* Candida esophagitis: species distribution and risk factors for infection. **Rev Inst Med Trop.** v. 50, n. 5, p. 261–263, 2008.

KLOTZ, S. A. Oropharyngeal Candidiasis: A New Treatment Option. **Clin Infect Dis.** v.42, n.8, p.1187-1188, 2006.

KOEHLER, A.P. *et al.* Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. **J Clin Microbiol.** v.37, n. 2, p.422-426, 1999.

KOLECKA, A. *et al.* Identification of medically relevant species of arthroconidial yeasts by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **J Med Microbiol.** v. 51, n.8, p. 2491–2500, 2013.

KORD, M. *et al.* Epidemiology of yeast species causing bloodstream infection in Tehran, Iran (2015-2017); superiority of 21-plex PCR over the Vitek 2 system for yeast identification. **J Med Microbiol.** v. 69, n. 5, p.712-720, 2020.

KORDALEWSKA, M. *et al.* Understanding echinocandin resistance in the emerging pathogen *Candida auris*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 62, n.6, p.1-9, 2018.

LACAZ, C.S. *et al.* 2002. **Tratado de Micologia Médica.** 9 ed. São Paulo: Sarvier, 2002.1120p.

LAM UBOL, A. *et al.* Oral manifestations, salivary flow rates and *Candida* species in Thai HIV-infected patients. **J Clin Exp Dent.** v. 11, n. 2, p. 138-45, 2019.

LAMICHHANE, K. *et al.* Biofilm-Producing *Candida* Species Causing Oropharyngeal Candidiasis in HIV Patients Attending Sukraraj Tropical and Infectious Diseases Hospital in Kathmandu, Nepal. **HIV AIDS (Auckl).** v.15, n.12, p.211-220, 2020.

LASS-FLORL, C. *et al.* Activities of antifungal agents against yeasts and filamentous fungi: assessment according to the methodology of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 52, n.10, p. 3637– 3641, 2008.

LAUNAY, O. *et al.* Candidemia: a nosocomial complication in adults with late-stage AIDS. **Clin Infect Dis.** v. 26, n. 5, p.1134-1141, 1998.

LEE, R.A. *et al.* Impact of infectious disease consultation on clinical management and mortality in patients with candidemia. **Clin Infect Dis.** v. 68, n. 9, p-1585-1587, 2019.

LEVINE, M. S.; MACONES A.J; LAUFER, I. Candida esophagitis: accuracy of radiographic diagnosis. **Radiology.** v. 154, n. 3, p. 581–587, 1985.

LI, Y.Y. *et al.* Asymptomatic oral yeast carriage and antifungal susceptibility profile of HIV-infected patients in Kunming, Yunnan Province of China. **BMC Infect Dis.** v. 13, n.46, p. 1-9, 2013.

- LIMA-NETO R. *et al.* Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolates culture collection. **Braz J Microbiol.**; v. 45, n.2, p.515-522, 2014.
- LIMPER, A.H. *et al.* Fungal infections in HIV/AIDS. **Lancet Infect Dis.**v. 17, n.11, p. 334-343, 2017.
- LING, H. *et al.* Accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinical pathogenic fungi: a meta-analysis. **J Clin Microbiol.** v. 52, n. 7, p. 2573-82, 2014.
- LINYU, L. *et al.* Modulation of host immune status by *Cryptococcus* co-infection during HIV-1 pathogenesis and its impact on CD+4 cell and cytokines environment. **Microb Pathog.** v.139, n. 103864, doi: 10.1016/j.micpath.2019.10386, 2020.
- LIU, X. *et al.* Synergistic antifungal effect of fluconazole combined with licofelone against resistant *Candida albicans*. **Front. Microbiol.** v. 8, n. 2101, 2017.
- LOURENCO, A.G.; FIGUEIREDO, L.T. Oral lesions in HIV infected individuals from Ribeirao Preto, Brazil. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.**v.13, n. 5, p.281-286, 2008.
- LUCAS, S.; NELSON, A.M. HIV and the spectrum of human disease. **J Med Microbiol.** v.235, n.2, p. 229–241, 2015.
- MA, H.; MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* Species. **Adv. in App. Microb.** v. 67, n.1, p. 131-190, 2009.
- MACHADO, A. G. *et al.* In vitro adherence of *Candida albicans* isolated from patients with chronic periodontitis. **J Applied Oral Scs.** V.19, n.4, p 384-387, 2011.
- MALDONADO, I. *et al.* Identification of *Candida* yeasts: Conventional methods and MALDI-TOF MS. **Rev. Iberoam. Micol.**v. 35, n.3, p.151–154. 2018.
- MARINACH, C. *et al.* MALDI TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: The example of *Candida albicans* and fluconazole. **Proteomics.** v. 9, n. 20, p.4627-4631, 2009.
- MARINACH-PATRICE, C. *et al.* Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry. **PLoS ONE.** V. 5.p.1-5. 2010.
- MARTÍNEZ IBÁÑEZ, E.; RUIZ-GAITÁN, A.; PEMÁN-GARCÍA, J. Update on the diagnosis of invasive fungal infection. **Rev. Esp. Quimioter.** v. 30, n. 1, p. 16–21, 2017.
- MASCI, J.R.; WORMSER, G.P. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th Edition Edited by Gerald L. Mandell, John E. Bennett, and Raphael Dolin Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2005. 3661 pp., illustrated. \$329 (cloth). **Clin Infect Dis.** v. 41, n 2, p. 277, 2005.
- MCCARTY, T.P.; PAPPAS, P.G. Invasive candidiasis. **J. Infect. Dis. Clin. North Am.** v.30, n.1, p.103–124, 2016.

MCKINNEY, Wes. **Python para análise de dados: Tratamento de dados com Pandas, NumPy e IPython**. 1ª edição. Editora: Novatec, 2018. 616p.

MEDRANO D. J. A. *et al.* Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Rev Inst Trop São Paulo**. v.48, n .1, p. 17-20, 2006.

MICHAPOULOS, A.S.; GEROULANOS, S.; MENTZELOPOLOUS, S.D. Determinants of candidemia and candidemia-related deaths in cardiothoracic ICU patients. **Chest**, v. 124, n.6, p. 2244-2255, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Recomendações para Terapia Antirretroviral em Adultos Infectados pelo HIV**. 2008/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. 7ª Ed. - Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

MOHAMED, A.A. *et al.* Diagnosis and Treatment of Esophageal Candidiasis: Current Updates. **Canadian J Gastro Hepato**. v. 2019, p. 1-6. 2019.

MOHAMED, A.A.; LU, X.L.; MOUNMIN, F.A. Diagnosis and treatment of esophageal candidiasis: current updates. **Can J Gastroenterol Hepatol**. v.2019, n. 3585136, p.1-6, 2019.

MOHAMED, F.A. *et al.* Prevalence of *Helicobacter pylori* and endoscopic findings in HIV seropositive patients with upper gastrointestinal tract symptoms at Kenyatta National Hospital, Nairobi. **East Afr Med J**. v. 79, n.5, p.226–231, 2002.

MONROE D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. **PLoS Biol** v. 5, n. 11, p. 2458- 2461, 2007.

MONTERO, J.G. *et al.* Infeccion fungica invasiva en los pacientes ingresados en las areas de críticos. **Enferm Infecc Microbiol Clín**. v. 30, n.6, p. 338–343, 2012.

MUSHI, M.F. *et al.* Oral candidiasis among African human immunodeficiency virus-infected individuals:10years of systematic review and meta-analysis from sub-Saharan Africa. **J Oral Microbiol**. v. 9, n. 1, p-1-10, 2017

NASCIMENTO, E. *et al.* *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* isolates from both HIV-infected and uninfected patients: antifungal susceptibility and outcome of cryptococcal disease. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. v. 59, p.1-7, 2017.

NITTAYANANTA, W. *et al.* Effects of long-term use of HAART on oral health status of HIV-infected subjects. **J Oral Pathol Med**. v. 39, n.5, p. 397-406, 2010.

NOBILE, C.J. *et al.* A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. **Cell**. v. 148, n. 1-2, p.126–138, 2012.

NUNES, J.M. *et al.* Molecular Identification, Antifungal Susceptibility Profile, and Biofilm Formation of Clinical and Environmental *Rhodotorula* Species Isolates. **Antimicro Agents Chemothe**. v. 57, n. 1, p. 382–389, 2013.

O'TOOLE, G.A.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbiol development. **Annual Review Microbiol**. v. 54, p. 49-79, 2000.

- OCHIUZZI, M.E, *et al.* Evaluación del sistema Vitek 2 para la identificación de las principales especies de levaduras del género *Candida*. **Rev Argent Microbiol.** v. 46, n. 2, p.107-10, 2014.
- OHN, C.N. *et al.* K21 Compound, a Potent Antifungal Agent: Implications for the Treatment of Fluconazole-Resistant HIV-Associated *Candida* Species. **Front Microbiol.** 2019 v. 24, n.10, p.1-16,2019.
- OLSEN, M.F. *et al.* Effects of nutritional supplementation for HIV patients starting antiretroviral treatment: randomised controlled trial in Ethiopia. **BMJ.** v. 348, p. 1-13, 2014.
- OLUM, R. *et al.* Prevalence of HIV-associated esophageal candidiasis in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. **Trop Med Health.** v.23, n.48, p.1-10, 2020.
- ONINLA, O.A. Mucocutaneous manifestations of HIV and the correlation with WHO clinical staging in a tertiary hospital in Nigeria. **AIDS Res Treat.** V. 2014, n. 360970, p.1-6, 2014.
- OSTROSKY-ZEICHNER, L. *et al.* Deeply invasive candidiasis. **Infect Dis Clin North Am,** v. 16, n. 4, p. 821–835, 2002.
- PAPPAS, P. G. *et al.* Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the infectious diseases society of America. **Clin Infect Dis.** v. 62, n. 4, p. 1–50, 2015.
- PAWLAK, Z. *et al.* Identification of Fungi Isolated from Oral Cavity of Patients with HIV Using MALDI–TOF MS. **J Clin Med.** v.10, n, 8, p.1-13, 2021.
- PASSARINI, M.R.Z. *et al.* Filamentous fungi from the Atlantic marine sponge *Drarmacidon reticulatum*. **Arch Microbiol.** v. 195, n. 2, p. 99-111, 2013.
- PETROSILLO, N. Nosocomial Bloodstream Infections among Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients: Incidence and Risk Factors. **Clin Infect Dis.** 2002; 34: 677-85.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol Rev.** v. 20, n. 1, p. 133-163, 2004.
- PFALLER, M.A. *et al.* National surveillance of nosocomial bloodstream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence 61 and antifungal susceptibility in the SCOPE program. **Diagn Microbiol Infect Dis.**; v.31, n.1, p. 327-32,1998.
- PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; HOLLIS, R.J. Variations in DNA subtype, antifungal susceptibility, and slime production among clinical isolates of *Candida parapsilosis*. **Diagn Microbiol Infect Dis,** v. 21, n.1, p. 9–14, 1995.
- PFALLER, M.A; JONES. R.N; CASTANHEIRA. M. Regional data analysis of *Candida non-albicans* strains collected in United States medical sites over a 6-year period, 2006–2011. **Mycoses.** v. 57, n10, p. 602– 611, 2014.
- PHARKJAKSU, S. *et al.* *Cryptococcus neoformans/gattii* Species Complexes from Pre-HIV Pandemic Era Contain Unusually High Rate of Non-Wild-Type Isolates for Amphotericin B. **Infect Drug Resist.** v.26, n. 13, p.673-681, 2020.

PIETRELLA, D. *et al.* The inflammatory response induce by aspartic proteases of *Candida albicans* is independent of proteolytic activity. **Infect Immun.** v. 78, n.11, p.4754–4762, 2010.

PUTIGNANI, L. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi. **Mol BioSyst.** v.7, n.3, p.620-629, 2010.

PROVOST, Foster. **Data Science para Negócios.** Rio de Janeiro: Editora: Alta Books, 2016. 408 p.

RAJASINGHAN, R, *et al.* Global burden of disease of HIV associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **Lancet Infect Dis.** v. 17, n .8, p 873–881, 2017.

RAMOS, A. *et al.* Risk factors, clinical presentation and prognosis of mixed candidaemia: a population-based surveillance in Spain. **Mycoses.** v.59, n.10, p. 636–43, 2016.

ROMAN, A. D. *et al.* Invasive *trichosporonosis* in an AIDS patient: case report and review of the literature. **J STD AIDS.** v. 25, n.1, p. 70–75, 2014.

RUIZ, L.S. *et al.* Candidemia by species of the *Candida parapsilosis* complex in children's hospital: prevalence, biofilm production and antifungal susceptibility. **Mycopathologia**, v. 175, n.3-4, p. 231–239, 2013.

SAMARANAYAKE, L. Commensal oral *Candida* in Asian cohorts. **Int J Oral Sci.**v.1, n. 1, p.2–5, 2009.

SAMANTARAY, S.; SINGH, R. Evaluation of MALDI-TOF MS for Identification of Species in the *Candida parapsilosis* Complex from Candidiasis Cases. **J Appl Lab Med.**v.7, n. 4. p.889-900, 2022.

SANGUINETTI, M. *et al.* Evaluation of Vitek 2 and RapID Yeast Plus System for yeast species identification: experience at a large clinical microbiology laboratory. **J Clin Microbiol.**v. 45, n. 4, p.1343-1346, 2007.

SARACLI, A. *et al.* Detection of triazole resistance among *Candida* species by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **Medical Mycology.** v.53, p.736-742, 2015.

SARAVANI, S. *et al.* Oral manifestations and related factors of HIV positive patients in south-east of Iran. **J Dent Mater Tech.**v.6, n.1, p.11–18, 2017.

SCHENLENZ S. Management of candidiasis in the intensive care unit. **J Antim Chemother.** v. 61, n.1, p. 31-34, 2008.

SEDDIKI, A. *et al.* Infectivités fongiques des cathéters implantés dues à *Candida* sp. Formation des biofilms et résistance. **J Mycol Méd.** v.25, p.130-135, 2015.

SELIN, S.T. *et al.* Design and in vitro evaluation of tenofovir-loaded vaginal gels for the prevention of HIV infections. **Pharma Dev Technol.** v.23, n.3, 301-310, 2018.

SENDID, B. *et al.* Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of medically-important yeasts in the clinical laboratories of Dijon and Lille hospitals. **Med Mycol.** v. 51, n.1, p. 25–32, 2013.

SENET J M. Candida adherence phenomena, from commensalism to pathogenicity. **Int Microbiol**, v.1, n.2, p.117–122, 1998.

SIDRIM, J.J.C; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica a Luz dos Autores Contemporâneos**. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora: Guanabara, 2004.396p.

SITTAMPALAM, G.S. *et al.* **Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual - NCBI Bookshelf**. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.

SURYANA, K.; SUHARSONO, H.; ANTARA, IGP. Factors Associated with Oral Candidiasis in People Living with HIV/AIDS: A Case Control Study. **HIV AIDS (Auckl)**. v. 14, n.12, p.33-39, 2020.

TAMAI, I.A.; PAKBIN, B.; FASAEI, B.N. Genetic diversity and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from Iranian HIV-infected patients with oral candidiasis. **BMC Res Notes**. v. 14, n.1, p. 1-7, 2021.

TARUMOTO, N. *et al.* Identification of Disseminated *Cryptococcosis* Using MALDI-TOF MS and Clinical Evaluation. **Med Mycol J**. v. 57, n.3, p.41-46, 2016.

TAVERNE-GHADWAL, L. *et al.* Epidemiology and Prevalence of Oral Candidiasis in HIV Patients from Chad in the Post-HAART Era. **Front Microbiol**. 2022 v. 13, n. 844069, p. 1-12, 2022.

TEKE. L.; BARIŞ, A.; BAYRAKTAR B. Comparative evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for non-albicans *Candida* and uncommon yeast isolates. **J Microbiol Methods**. v. 185, n.106232. 2021.

TERÇAS, A.L. *et al.* Antifungal Drug Susceptibility of *Candida* Species Isolated from HIV-Positive Patients Recruited at a Public Hospital in São Luís, Maranhão, Brazil. **Front Microbiol**. v. 2, n.298, p. 1-8, 2017.

THANYASRISUNG, P. *et al.* Oral *Candida* carriage and immune status in Thai human immunodeficiency virus-infected individuals. **J Med Microbiol**.v. 63, n.5, p. 753–759, 2014.

THOMAS-RÜDDEL, D.O. *et al.* Risk Factors for Invasive *Candida* Infection in Critically Ill Patients: A Systematic Review and Meta-analysis. **Chest**. 2022 v. 161, n.2, p.345-355, 2022.

TRAGIANNIDIS, A. *et al.* Minireview: *Malassezia* infections in immunocompromised patients. *Mycoses*. v. 53, n. 3, p. 187-195, 2010.

TUMBARELLO, M. *et al.* Candidemia in HIV-infected subjects. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**.v. 18, n. 7, p.478-483, 1999.

UNAIDS. 2020 Global AIDS Update — seizing the moment- tackling entrenched inequalities to end epidemics. Geneva 2020. <https://www.unaids.org/en/resources/documents/2020/global-aids-report>. Acesso em: 1. julho. 2022.

VAZQUEZ, J.A. Optimal management of oropharyngeal and esophageal candidiasis in patients living with HIV infection. **HIV AIDS (Auckl)**. v. 2, p.89–101. 2010.

VANNINI, M. *et al.* Epidemiology of candidemia in NICE area, France: A five-year study of antifungal susceptibility and mortality. **J Mycol Med**. v. 32, n.1, 2022.

VECHI, H. T. *et al.* Invasive fungal infection by *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* with bone marrow meningeal involvement in HIV infection patient: a case report. **BMC Infection Disease**. v.19, n.1, p. 219-220, 2019.

VELLA A *et al.* Rapid antifungal susceptibility testing by Matrix- Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry Analysis. *Journal Clinical Microbiology*, v. 51, n.9, p.2964-2969, 2013.

WALSH, N.M. *et al.* Characterization of C-type lectins reveals an unexpectedly limited interaction between *Cryptococcus neoformans* spores and Dectin-1. **PLoS One**. DOI:10.1371/journal.pone.0173866. p. 1-21, 2017.

WEMBABAZI, A. *et al.*, 2022 Prevalence of *Cryptococcus gattii* in Ugandan HIV-infected patients presenting with cryptococcal meningitis. **PLoS One**. v.17, n.7, p.1-7, 2022.

WESTBLADE, L.F *et al.* Multicenter study evaluating the Vitek MS system for identification of medically important yeasts. **J Clin Microbiol**. v.51, n.7, p.2267-2272, 2013.

WINGETER, M.A. *et al.* Identificação microbiológica e sensibilidade in vitro de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 40, n.3. p.272-276, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO case definitions of HIV for surveillance and revised clinical staging and immunological classification of HIV-related disease in adults and children**. Geneva: World Health Organization, 48p, 2007. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43699/9789241595629_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 12 dez. 2021

WU, C. J. *et al.* Oropharyngeal yeast colonization in HIV-infected outpatients in southern Taiwan: CD4 count, efavirenz therapy and intravenous drug use matter. **Clin Microbiol Infect**. v. 18, n.5, p. 485–490, 2012.

YANG, S. In vitro interactions between non-steroidal anti-inflammatory drugs and antifungal agents against planktonic and biofilm forms of *Trichosporon asahii*. **PLoS One**. v.11, n.6, p.1–12, 2016.

YANG, Y.L. Virulence factors of *Candida* species. **J Microbiol Immunol Infect**. v.36, n.4, p 223-228, 2003.

YOON, H.A. *et al.* *Cryptococcus neoformans* infection in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-infected and HIV-uninfected patients at an inner-city tertiary care hospital in the Bronx. **Med Mycol.** v.58, n.4, p.434-443, 2020.

YU, S.B. *et al.* The Activities of adhesion and biofilm formation by *Candida tropicalis* clinical isolates display significant correlation with its multilocus sequence typing. **Mycopathologia**, v. 182, n. 5-6, p. 459-469, 2017.

APÊNDICE A - FUNGAL ESOPHAGITIS ASSOCIATED WITH TUBERCULOUS PERICARDITIS IN AN HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS-POSITIVE PATIENT: A CASE REPORT

Silva et al. *Journal of Medical Case Reports* (2022) 16:429
<https://doi.org/10.1186/s13256-022-03561-x>

Journal of
Medical Case Reports

CASE REPORT

Open Access



Fungal esophagitis associated with tuberculous pericarditis in an human immunodeficiency virus-positive patient: a case report

Gleiciere Maia Silva¹, Bruna Rodrigues de Sousa², Kaliny Benicio Torres³, Rejane Pereira Neves^{1,2},
 Heloisa Ramos Lacerda de Melo^{1,4} and Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto^{1,2,4*}

Abstract

Background: Opportunistic infections are frequent in people living with the human immunodeficiency virus who either do not have access to antiretroviral therapy (ART) or use it irregularly. Tuberculosis is the most frequent infectious disease in PLHIV and can predispose patients to severe fungal infections with dire consequences.

Case presentation: We describe the case of a 35-year-old Brazilian man living with human immunodeficiency virus (HIV) for 10 years. He reported no adherence to ART and a history of histoplasmosis with hospitalization for 1 month in a public hospital in Natal, Brazil. The diagnosis was disseminated *Mycobacterium tuberculosis* infection. He was transferred to the health service in Recife, Brazil, with a worsening condition characterized by daily fevers, dyspnea, pain in the upper and lower limbs, cough, dysphagia, and painful oral lesions suggestive of candidiasis. Lymphocytopenia and high viral loads were found. After screening for infections, the patient was diagnosed with tuberculous pericarditis and esophageal candidiasis caused by *Candida tropicalis*. The isolated yeasts were identified using the VITEK 2 automated system and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight-mass spectrometry. Antifungal microdilution broth tests showed sensitivity to fluconazole, voriconazole, anidulafungin, caspofungin, micafungin, and amphotericin B, with resistance to fluconazole and voriconazole. The patient was treated with COXCI-4 and amphotericin deoxycholate. At 12 days after admission, the patient developed sepsis of a pulmonary focus with worsening of his respiratory status. Combined therapy with meropenem, vancomycin, and itraconazole was started, with fever recurrence, and he changed to ART and tuberculostatic therapy. The patient remained clinically stable and was discharged with clinical improvement after 30 days of hospitalization.

Conclusion: Fungal infections should be considered in patients with acquired immunodeficiency syndrome as they contribute to worsening health status. When mycoses are diagnosed early and treated with the appropriate drugs, favorable therapeutic outcomes can be achieved.

Keywords: Fungal infection, Yeast, Tuberculous pericarditis, PLHIV, Case report

Background

Fungi are opportunistic microorganisms that contribute to poor outcomes in patients with advanced human immunodeficiency virus (HIV) infections. These virus-associated infections are among the world's major public

*Correspondence: reginaldo.limant@ufpe.br; reginaldo.limant@pq.cnpq.br

⁴ Department of Tropical Medicine, Center for Medical Sciences, Federal University of Pernambuco, Av. da Engenharia 531-611, Recife 50670-901, Brazil
 Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

health problems [1, 2]. According to the Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS), more than 37.7 million people worldwide live with HIV, of whom 28.2 million have access to antiretroviral therapy (ART). Nevertheless, since the beginning of the HIV epidemic, 36.3 million people have died from illnesses related to acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) [1].

Several yeast species affect people living with the human immunodeficiency virus (PLHIV), among which *Candida* species are the most common. The spectrum of clinical manifestations varies from the asymptomatic to severe forms. *Candida* causes various clinical infections, including oropharyngeal candidiasis, esophageal candidiasis, cutaneous candidiasis and candidemia [3]. *Candida* species are associated with oral and esophageal infections, and most respond efficiently to antifungals. However, levels of antifungal resistance (especially to azoles by non-albicans *Candida* species) have been increasing [2, 4, 5]. In addition, non-albicans *Candida* species, such as *C. tropicalis*, *C. krusei*, and *C. glabrata* (which exhibit reduced intrinsic sensitivity to azole antifungals), are isolated at high frequency among PLHIV [3].

Likewise, HIV infection is a primary risk factor for tuberculosis (TB) [6, 7], and individuals living with HIV/AIDS are 21- to 34-fold more likely to develop active TB and its complications than the general population [8, 9]. Recently, a high prevalence of tuberculous pericarditis in AIDS patients in Brazil has been reported [10].

We present the case report of a patient with AIDS who was non-compliant with ART and developed fungal complications associated with disseminated TB. Nevertheless, he achieved a favorable outcome. Due to the increased number of disseminated TB cases associated with fungal infections in Brazil, uncommon occurrences should be highlighted and reported to avoid delayed diagnoses.

Case presentation

A 35-year-old Brazilian man with HIV for 10 years who was non-adherent to ART (lamivudine + abacavir + dolutegravir) was admitted with a history of successfully treated histoplasmosis. He had been hospitalized for 1 month at a public hospital in Natal, Brazil, with initial symptoms of intense diarrhea, daily fevers, sweating, and chills for 3 weeks. He was diagnosed with disseminated TB, and tuberculostatic treatment (isoniazid, rifampin, ethambutol, streptomycin, and pyrazinamide) was given for 10 days. However, due to increased transaminase levels, his regimen was changed to levofloxacin, capreomycin, and ethambutol. He was observed for 10 days and discharged.

Thirteen days after discharge, he was admitted to the referral health service in Recife, Brazil, with a worsening of his clinical condition characterized by fever, dyspnea,

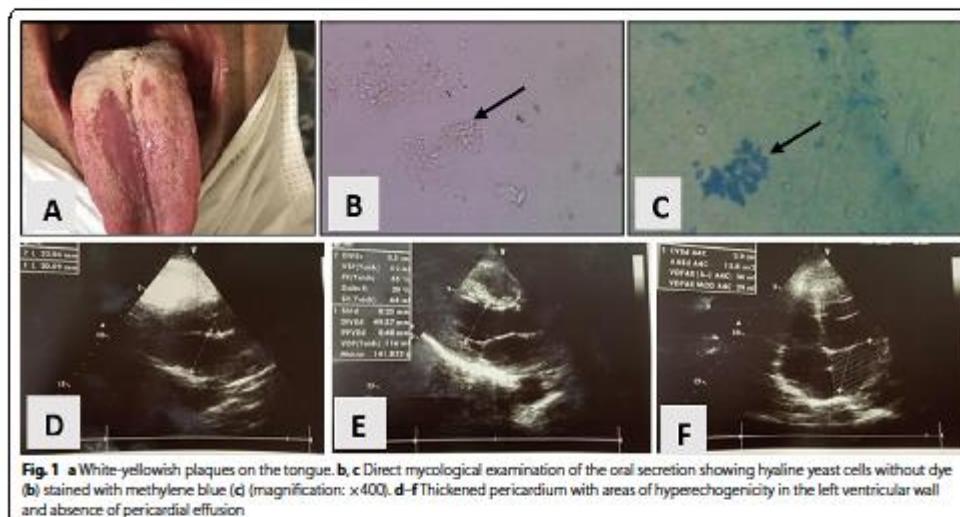
pain in the upper and lower limbs and spine, and cough. Prophylactic treatment with sulfamethoxazole + trimethoprim + piperacillin/tazobactam was initiated.

Lymphocyte counts showed that patient was severely immunocompromised, with a CD4 count of 8 cells/mL, CD8 count of 347 cells/mL, and CD4/CD8 ratio of 0.02. A high viral load was detected (174,034 copies). Several laboratory tests were requested, including fungal investigations because of his history of histoplasmosis 2 years prior and the finding of several whitish plaques in his oral cavity (Fig. 1a). Blood culture, bronchoalveolar lavage, and oral secretions were obtained. The samples were sent to the Laboratory of Diagnostic in Tropical Diseases at the Federal University of Pernambuco, and slides were made for direct examination (Fig. 1b, c) to visualize fungal structures. Spherical yeast cells were observed in large numbers.

Each biological sample was cultured on Sabouraud Dextrose Agar (Difco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) + chloramphenicol in duplicate, and the plates were maintained at 28 °C and 37 °C. There was rapid growth with sporulation after 3 days of culture. Yeasts were identified using the VITEK® 2 automated microbial identification system (bioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France) and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight-mass spectrometry according to Lima-Neto et al. [11]. Both methods identified *Candida tropicalis*. *In vitro* antifungal susceptibility tests were performed according to the protocol described in the 2008 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document M27-A3 [12] and using the VITEK® 2 system with the AST YS01 card; both tests confirmed the identification. *Candida tropicalis* isolates showed resistance to fluconazole and voriconazole, for which the minimal inhibitory concentrations (MIC) were 64 and 16 µg/mL, respectively; the MICs for anidulafungin, caspofungin, micafungin, and amphotericin B were 0.125, 0.03, 0.125, and 0.25 µg/mL, respectively.

The patient was diagnosed with *C. tropicalis* esophagitis. Treatment with amphotericin B deoxycholate and itraconazole with a maintenance dose was instituted. After 12 days of hospitalization, the patient developed sepsis from a pulmonary focus and his respiratory status worsened, leading to nasal intermittent mandatory ventilation. Meropenem and vancomycin were started, and itraconazole (400 mg/day) was maintained. Laboratory tests showed significant pancytopenia. Transthoracic echocardiogram revealed pericardial thickening, a sequelae of tuberculous pericarditis (Fig. 1d–f).

Two days after the end of antibiotic therapy, the patient developed new fever peaks, and the medical staff chose to prolong the medication for another 10 days. Simultaneously, herpetic lesions in the genital region appeared,



and acyclovir (750 mg/d) was initiated. A modified ART regimen (tenofovir + lamivudine + dolutegravir) and tuberculostatic (COXCIPI-4) therapy was given. The patient improved clinically and was stable for discharge after 30 days of hospitalization with appropriate clinical follow-up. After discharge, the patient was followed in the outpatient infectious disease service from the Hospital of Clinics at the Federal University of Pernambuco with good clinical status.

Discussion and conclusion

We report a case of disseminated TB and fungal infection associated with complications of HIV infection. Yeast infections in PLHIV are responsible for severe clinical manifestations [10]. Oropharyngeal candidiasis is a common presenting manifestation of HIV infection, and it often develops in HIV-infected patients when the CD4⁺ T lymphocyte count decreases to > 350 CFU/mL. In HIV patients with CD4 cell counts of ≤ 200 CFU/mL, canker sores spread into the esophagus, transforming oral candidiasis into esophageal candidiasis [3].

Previous studies have shown that ART decreases the incidence of all HIV-related opportunistic infections, including fungal infection; however, no protective effects of such therapy on *Candida* colonization have been observed [13–15]. ART has been associated with adverse effects in the oral mucosa, including dry

mouth, hyperpigmentation, and aphthous ulcers, all of which could reduce the protective effects of this yeast on the mucosa, although these findings are controversial [13].

Recurrent fungal infections have been associated with emphysematous changes and bronchiectasis in patients with HIV infection [4]. TB is a systemic disease that may involve any location and is one of the most prevalent opportunistic infections in PLHIV [6, 7, 16]. Pericarditis is related to pathologies associated with AIDS. In Africa, TB is responsible for 100% of pericarditis cases in individuals with this syndrome [5, 17, 18]. In Brazil, tuberculous pericarditis plays an essential role among HIV pericardial effusions and is usually associated with several opportunistic agents [5, 18].

The patient had esophagitis candidiasis associated with tuberculous pericarditis in the case described. However, he progressed well and was discharged. Fungal infections continue to contribute significantly to HIV-related mortality. Early and accurate diagnostic measures considerably increase therapeutic success [19].

It is essential to publish cases of TB associated with mycoses in HIV-positive patients because knowledge of the true incidence contributes to formulating public policies to prevent and control these infections and facilitate early diagnosis and proper treatment.

Abbreviations

AIDS: Acquired Immunodeficiency syndrome; ART: Antiretroviral therapy; CD: Cluster of differentiation; CONOP-4: Rifampicin, isoniazid, pyrazinamide, and ethambutol; HIV: Human Immunodeficiency virus; PLHIV: People living with HIV; UNAIDS: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS.

Acknowledgments

The authors thank the Service of Infectious Diseases at the Hospital das Clínicas at the Federal University of Pernambuco and the Foundation for the Support of Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE) for the doctoral scholarship of Gleiciene Mota Silva.

Author contributions

Laboratory practice: GMS, BRS, KBT, and RL-N. Concept: GMS, RN, HRLM, and RL-N. Data collection and processing: GMS, BRS, KBT, and RL-N. Analysis or interpretation: GMS, HRLM, and RL-N. Literature search: GMS, RN, and RL-N. Writing: GMS, HRLM, and RL-N. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

The authors declare that this study received no financial support.

Availability of data and materials

The authors agree to make the images and data described in the manuscript freely available.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The Human Research Ethics Committee at the Federal University of Pernambuco, Brazil, provided ethics approval (CAAE number: 03682818.70000.5208).

Consent for publication

Written informed consent was obtained from the patient to publish this case report and any accompanying images. A copy of the written consent is available for review by the Editor-in-Chief of this journal.

Competing interests

No authors declare conflicts of interest related to this work.

Author details

¹Post-Graduate Program in Tropical Medicine, Hospital of Clinics-BI, Hospital das Clínicas of the Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE 50670-901, Brazil. ²Post-Graduate Program in Fungal Biology, Center for Biosciences, Federal University of Pernambuco, Av. da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE 50670-901, Brazil. ³Realab, Real Hospital Português, Av. Agamenon Magalhães, 4760, Pátio, Recife, PE 52010-075, Brazil. ⁴Department of Tropical Medicine, Center for Medical Sciences, Federal University of Pernambuco, Av. da Engenharia 531-611, Recife 50670-901, Brazil.

Received: 30 March 2022 Accepted: 6 August 2022

Published online: 07 November 2022

References

1. The Joint United Nations Programme on HIV and AIDS (UNAIDS). Global HIV & AIDS statistics—Fact sheet. 2021. <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>. Accessed 31 Jan 2022.
2. Andrew H, Antoine A, Lo T, Thomas H. Fungal infections in HIV/AIDS. *Lancet Infect Dis*. 2017;17:334–43.
3. Abbas HP, Salari S, Almani PGN. Oropharyngeal candidiasis in HIV/AIDS patients and non-HIV subjects in the Southeast of Iran. *Curr Med Mycol*. 2018;4:1–6.
4. Sheikh S, Madiraju K, Steiner P, Rao M. Bronchiectasis in pediatric AIDS. *Chest*. 1997;112:1202–7.

5. Sorin R, Dumitru IM, Resul G, Cornat RC, Germs AEP. Disseminated tuberculosis in HIV-infected patients from the regional HIV/AIDS Center Constanța, Romania. *Germs*. 2014;4(1):16–21.
6. Mathuram AJ, Michael JS, Turaka VP, Jasmine S, Casey R, Ramya L. Mycobacterial blood culture as the only means of diagnosis of disseminated tuberculosis in advanced HIV infection. *Trop Dis*. 2018;48(2):100–2.
7. Galfar Z. Epidemiology of extrapulmonary and disseminated tuberculosis in a tertiary care center in Oman. *Int J Mycobacteriol*. 2017;6:162–6.
8. World Health Organization (WHO). Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report. 2019. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44241/9789241598866_eng.pdf. Accessed 13 Jan 2022.
9. Magnabosco GT, Lopes LM, Andrade RLP, et al. Tuberculosis control in people living with HIV/AIDS. *Rev Latino-Am Nurs*. 2016;24:1–8.
10. Chastain DB, Hensao-Martins AF, Franco-Paredo C. Opportunistic invasive mycoses in AIDS: cryptococcosis, histoplasmosis, coccidioidomycosis, and talaromycosis. *Curr Infect Dis Rep*. 2017;19:36.
11. Lima-Neto R, Santos C, Lima N, Sampaio P, Pais C, Neves RP. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolates culture collection. *Braz J Microbiol*. 2014;45(2):515–22.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth microdilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Document M27-A3, 3rd ed. CLSI, Wayne, PA (2008).
13. Lam-ulol A, Rungsriyont S, Vacharotayangul P, Sappayatosok K, Chankanka O. Oral manifestations, salivary flow rates and *Candida* species in Thai HIV-infected patients. *J Clin Exp Dent*. 2019;11:138–45.
14. Hung CC, Yang YL, Lauderdale TL, et al. Colonization of human immunodeficiency virus-infected outpatients in Taiwan with *Candida* species. *J Clin Microbiol*. 2005;43(4):1600–3.
15. Li YY, Chen WY, Li X, et al. Asymptomatic oral yeast carriage and antifungal susceptibility profile of HIV-infected patients in Kunming, Yunnan Province of China. *BMC Infect Dis*. 2013;13(46):2–9.
16. Chiang CH, Lee GH, Chiang TH, Tang PJ, Fang CT. Disseminated *Mycobacterium avium* complex infection as a differential diagnosis of tuberculosis in HIV patients. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2020;24(9):922–7.
17. Cegielski JP, Lwakatare J, Dukas CS, et al. Tuberculous pericarditis in Tanzania patients with HIV infection. *Tuber Lung Dis*. 1994;775:29–34.
18. Bernardo Guidugli R, Albert Hamrick P, Ravenda NE. Tuberculous pericarditis in acquired immune deficiency syndrome patients. *J Pneumol*. 2003;29:98–100.
19. Idelevitch EA, Grunewald CM, Wullenweber J, Becker K. Rapid identification and susceptibility testing of *Candida* spp. from positive blood cultures by combination of direct MALDI-TOF mass spectrometry and direct inoculation of Vitek 2. *PLoS ONE*. 2014;9:1–14.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



APÊNDICE B - Biofilm formation and antifungal susceptibility from yeast infections in people living with HIV in northeastern Brazil.

FORMAÇÃO DE BIOFILME E SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA DAS LEVEDURAS EM PESSOAS VIVENDO COM HIV NO NORDESTE DO BRASIL.

Artigo submetido para publicação na revista *Mycoses*. Impact factor (2021):4.931. ISSN:1439-0507

RESUMO

Introdução: Pessoas vivendo com HIV (PVHIV) são frequentemente acometidas com leveduroses levando a um agravamento do quadro clínico podendo ocasionar morte.

Pacientes/Métodos: Foram analisadas amostras biológicas de PVHIV com suspeita de leveduroses entre maio de 2019 a fevereiro de 2020 e agosto de 2021 a fevereiro de 2022, e o diagnóstico foi realizado pelo MALDI-TOF (VITEK® MS), VITEK® 2 Compact e CHROMOagar® *Candida* (CAC), concomitantemente foi realizado testes de sensibilidade antifúngica e capacidade de formação de biofilme das leveduras isoladas.

Resultados: Dos 48 pacientes estudados, 27 (56,2%) apresentaram leveduroses, quinze (55,6%) foram indivíduos do sexo masculino e 12 (44,4%) do sexo feminino. Destes, 19 (70,3%) pacientes apresentaram contagens de linfócitos TCD4 menores que 200 células/ μ L e 8 (29,7%) contagens superiores a 200 células/ μ L. Do total de pacientes, 55,6% tiveram leveduras isoladas na orofaringe, 14,8% leveduras isoladas no sangue, 11,1% isolados de líquido cefalorraquidiano (LCR), 7,4% isoladas do lavado broncoalveolar (LBA), 7,4% de secreção traqueal e 3,7% de mielograma. *Candida albicans* (55,6%) foi a espécie mais prevalente, seguida *C. tropicalis* (22,2%); *Cryptococcus neoformans* (7,4%); *Cryptococcus gatti* (3,7%); *Candida parapsilosis* (3,7%); *Candida ortoparapsilosis* (3,7%) e *Candida krusei* (3,7%). A concordância do MALDI TOF com o VITEK® 2 foi de 92,59% e com o CAC foi 74,07%. Foi realizado o teste de sensibilidade com o fluconazol, voriconazol, caspofungina, micafungina, anidulafungina e anfotericina B utilizando o protocolo M27-A3 do CLSI. O voriconazol foi droga com maior resistência (18,5%). 92,7% das leveduras isoladas formaram biofilme. Destas, 77,7% exibiram uma alta atividade metabólica em 24, 48 e 72 horas.

Conclusão: PVHIV são vulneráveis a desenvolverem infecções com leveduras menos sensíveis a triazólicos e com elevada capacidade de desenvolver biofilmes.

Palavras-chaves: HIV, leveduras, sensibilidade antifúngica, biofilme.

1 INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus HIV continua sendo um dos principais problemas de saúde pública. Segundo dados da UNAIDS, estima-se que 37,7 milhões de pessoas de todo o mundo viviam com o vírus HIV no ano de 2020¹. Pessoas vivendo com HIV (PVHIV) são mais propensas a desenvolverem infecções oportunistas, incluindo as leveduroses como candidemia e meningite criptocócica, que apesar de ferramentas de diagnósticas e drogas antifúngicas disponíveis, podem atingir índices de mortalidade de até 80%^{2, 3, 29}.

A baixa contagem absoluta de linfócitos TCD4, sobretudo abaixo de 200 células/ μ L é o maior fator de risco para o desenvolvimento de leveduroses. Infecções por espécies de *Candida* continuam sendo mais comuns em PVHIV do que aqueles com um grau semelhante de imunossupressão (transplante de medula óssea ou pacientes recebendo quimioterapia)³¹.

Existem mais de 15 espécies de *Candida* responsáveis por infecções, entretanto destacam-se a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* que podem ser menos sensíveis a terapias padrões^{4,5}. PVHIV podem ser infectados por leveduras e estas exibirem em uma série de fatores de virulência incluindo adesão a substratos inertes e biológicos e formação de biofilme dificultando a ação terapêutica^{6,7}. Por isso, além da identificação da patogenicidade dos isolados, testes de sensibilidade antifúngica tornam-se imprescindíveis.

Em face do exposto, o objetivo do presente estudo foi identificar leveduroses em PVHIV, realizar o diagnóstico polifásico por meio do MALDI-TOF (VITEK[®] MS), VITEK[®] 2 e CHROMOagar *Candida*, comparando os métodos, bem como avaliar sua patogenicidade através do perfil de sensibilidade antifúngica e formação de biofilme.

2 PACIENTES E MÉTODOS

Foram realizadas coletas de 125 amostras clínicas oriundas de 48 PVHIV com suspeita de micoses de dois hospitais públicos da cidade do Recife: Hospital Universitário Oswaldo Cruz e Hospital das Clínicas em dois intervalos de tempo: o primeiro no período de maio de 2019 até fevereiro de 2020 e o segundo de agosto de 2021 a fevereiro de 2022. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos sob registro nº 0366.0.172.106-11 da Universidade Federal de Pernambuco, e está de acordo com a Resolução do CNS nº 196/96.

Foram realizadas coletas de diversos materiais biológicos e para cada tipo de amostra foram realizadas lâminas coradas com Giemsa, clarificadas com (KOH a 20%) ou contrastadas com tinta de nanquim e concomitantemente, as amostras foram semeadas em duplicata na superfície do meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) adicionado de 50 mg/L de cloranfenicol e

foram mantidas à temperatura de 30° C e 37° C por até 15 dias ^{8,9,14}. Após o surgimento das colônias, as leveduras foram identificadas por diferentes metodologias e realizadas testes de sensibilidade antifúngica e formação de biofilme.

Identificação proteômica por Espectrometria de Massa MALDI-TOF (VITEK® MS

bioMérieux, France): Para identificação proteômica foram utilizadas suspensões dos isolados clínicos de *Candida* cultivadas e mantidas em meio Dextrose Peptona Extrato de Levedura (YEPD) a 35° C por 24 horas e para espécies de *Cryptococcus* foram semeadas em ASD a 35° C por 48 horas. Os isolados foram submetidos à análise através da extração proteica por espectrometria de massa. Para amostras de levedura, as preparações foram lisadas com 0,5 µL de ácido fórmico a 25%. Depois de secar foi acrescentado 1 µL de de solução de matriz (α -ciano-4- matriz de ácido hidroxicinâmico- CHCA, bioMérieux). A placa alvo em aço polido de MALDI-TOF foi subsequentemente introduzida no espectrômetro de massa para obtenção dos espectros proteicos^{16, 17}. Os espectros para determinação dos isolados foram obtidos através de um laser (337 nm) de nitrogênio, foco fixo e taxa de pulso máxima - 50 Hz (50 disparos de laser por segundo). Assim, os espectros de massa foram obtidos foram processados por um software específico, o MYLA® (bioMérieux, França), e comparado com a base de dados que contém os espectros de referência. O VITEK® MS compara esses espectros com o arquivo espectral e identificação microbiana do banco de dados do sistema (SARAMIS, bioMérieux, França)²¹.

Identificação das leveduras pelo VITEK®2 Compact (bioMérieux, Brasil): As leveduras foram submetidas aos testes automatizados pelo VITEK® 2 (YST) seguindo a técnica recomendada pelo fabricante. O cartão YST identifica leveduras através de 46 testes bioquímicos baseados em métodos que medem o uso da fonte de carbono, o uso de fonte de nitrogênio e atividade enzimática ^{21, 22}. São realizados por testes fluorescentes, que incluem assimilação de carboidratos e ácidos orgânicos e detecção de oxidases e arilamidases ¹⁵. O inóculo para identificação foi preparado usando colônias isoladas de leveduras em solução. A turbidez foi medida pelo instrumento DensiCheck (bioMérieux, Brasil) e equivalente a 1,8-2,2 da escala McFarland ²³. No tubo de poliestireno, as amostras foram dispensadas os cartões YST que foram colocados no aparelho, através da incubação e leitura das amostras. Os dados obtidos foram interpretados pelo banco de dados do instrumento, fornecendo a identificação final das estirpes.

Identificação das leveduras pelo CHROMagar Candida: As leveduras foram semeadas em (CHROMagar, Plast Labor, Brasil) e incubação aerobicamente a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 36 a 48 horas. Com a inclusão de substratos cromogênico no meio de cultura, as colônias de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* produzem cores diferentes ao CAC, permitindo assim a detecção direta destas espécies na placa de isolamento^{14,21}. As colônias de *C. albicans* aparecem com uma cor verde-claro a verde médio, as de *C. tropicalis* aparecem azuis esverdeadas a azul metalizado e as de *C. krusei* aparecem cor-de-rosa claro com um rebordo esbranquiçado¹⁴.

Teste de Sensibilidade Antifúngica de acordo com o CLSI: Foram realizados testes de sensibilidade *in vitro* a drogas antifúngicas segundo o método de microdiluição em caldo, de acordo com a padronização publicada no documento M27-A3¹⁰. As drogas antifúngicas testadas foram anfotericina B (UnitedMedical) (0.03-16 $\mu\text{g/mL}$), anidulafungina (Pfizer) (0.015-8 $\mu\text{g/mL}$), micafungina (Pfizer) (0.015-8 $\mu\text{g/mL}$), caspofungina (Pfizer) (0.015-8 $\mu\text{g/mL}$), voriconazol (Pfizer) (0.03-16 $\mu\text{g/mL}$), fluconazol (Pfizer) (0.125-64 $\mu\text{g/mL}$). Nos ensaios foram incluídas linhagens do American Type Culture Collection (ATCC), de *C. parapsilosis* ATCC 22019. Os isolados clínicos de *Candida* e *Cryptococcus* foram mantidos em meio ASD e incubados a 35°C por 24 horas. As suspensões dos isolados foram preparadas em solução salina, e sua densidade ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland em 90% da transmitância utilizando um espectrofotômetro a 530nm. O volume do inóculo foi ajustado para 5,0 mL de solução salina esterilizada e, posteriormente, diluído em RPMI 1640 para uma concentração de $2,5 \times 10^3$ céls. mL^{-1} . Nos testes de sensibilidade foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços, o inóculo foi adicionado aos poços com os antifúngicos a serem testados, e as placas foram incubadas a 35°C durante 24 horas para determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM). A leitura dos resultados foi baseada nas diretrizes do documento M60-Ed2 do CLSI³⁰.

Caracterização de formação de Biofilme: Para a realização do teste de caracterização de Biofilme, a metodologia foi adaptada por Pfaller *et al.* (1995) e Ruiz *et al.* (2013)^{11,12}, as leveduras foram cultivadas em ASD por 24h a 37°C , foram preparadas em RPMI-Hepes 1640 e a turbidez ajustada a 0,5% na escala de McFarland. Em seguida, 100 μL de cada suspensão foi inoculada em poços de placas de poliestireno e incubadas a 37°C por 1,5h. Ao fim do período, as células não aderidas as placas foram removidas com tampão PBS. Posteriormente, foi adicionado 200 μL de RPMI-Hepes 1640 aos poços e as placas incubadas por 24, 48 e 72 horas. A atividade metabólica do biofilme foi determinada com o reagente MTT e a atividade

formadora de biofilme avaliada no leitor de Elisa com comprimento de onda de 570nm. Os biofilmes foram classificados como baixa, moderada e forte atividade metabólica ($BAM < 0,097$, $MAM = 0,097-0,2$ e $AAM > 0,2$)¹³, os dados obtidos foram tratados estatisticamente usando a linguagem de programação PYTHON com a Biblioteca PANDAS, implementado no IDE de programação Visual Studio Code.

3 RESULTADOS

De um total de 48 PVHIV analisadas, tivemos uma incidência de 27 (56,2%) pacientes com leveduroses. Desses, 15 (55,6%) foram indivíduos do sexo masculino e 12 (44,4%) do sexo feminino, a faixa etária variou entre 18 a 68 anos de idade. Com referência ao estado imunológico, 19 (70,3%) pacientes apresentaram contagens de linfócitos TCD4 menores que 200 células/ μ L e 8 (29,7%) contagens superiores a 200 células/ μ L.

Quinze (55,6%) pacientes tiveram leveduras isoladas na orofaringe, quatro (14,8%) pacientes tiveram leveduras isoladas no sangue (hemoculturas), três (11,1%) isolados de líquido cefalorraquidiano (LCR), dois (7,4%) isoladas do LBA (lavado broncoalveolar), dois (7,4%) de secreção traqueal e um (3,7%) de mielograma.

Quanto as espécies de leveduras isoladas em PVHIV mostramos na

Tabela 1 o comparativo dos resultados nas diferentes metodologias utilizadas. Quinze (55,6%) pacientes apresentaram leveduroses por *Candida albicans*; seis (22,2%) pacientes por *C. tropicalis*; dois (7,4%) *Cryptococcus neoformans*; um (3,7%) *Cryptococcus gatti*; um (3,7%) *C. parapsilosis*; um (3,7%) *C. ortoparapsilosis* e um (3,7%) *C. krusei*.

Tabela 1: Espécies de leveduras isoladas por diferentes metodologias

id_amostra	MALDI-TOF (VITEK® MS)	VITEK®2 Compact	CHROMOagar <i>Candida</i>
dip-hc-9	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
dip-hc-19	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
dip-huoc-28	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
dip-hc-29	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
uti-huoc-40	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida albicans</i>
dip-hc-49	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
dip-hc-59	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
dip-hc-60	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
dip-hc-61	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
dip-hc-65	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
dip-hc-66	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
dip-hc-71	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>

dip-hc-73	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	Crescimento inconclusivo
dip-hc-81	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
dip-huoc-82	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
uti-huoc-84	<i>Candida ortopsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	Crescimento inconclusivo
dip-huoc-86	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	*
dip-hc-90	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
dip-huoc-93	<i>Cryptococcus gattii</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	*
uti-huoc-100	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	*
dip-huoc-107	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida albicans</i>
dip-huoc-117	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
dip-huoc-120	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
dip-huoc-121	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
dip-huoc-122	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
dip-huoc-123	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
uti-huoc-124	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida krusei</i>

* Método não foi aplicado a espécies sugestivas de *Cryptococcus*.

No nosso estudo, a concordância do sistema VITEK®2 Compact com o MALDI TOF (VITEK® MS) foi de 92,59% e como ilustra na Tabela 2. O CAC foi capaz de identificar 74,07% dos isolados fúngicos.

Tabela 2: Percentual de concordância na identificação entre metodologias fenotípicas e proteômica por MALDI-TOF

AMOSTRA	MALDI-TOF (VITEK® MS)	VITEK®2 Compact	CHROMOagar <i>Candida</i>	CONCORDÂNCIA VITEK %	CONCORDÂNCIA CHROMOAGAR %
<i>Candida albicans</i>	15	15	15	100.0%	100.0%
<i>Candida krusei</i>	1	1	1	100.0%	100.0%
<i>Candida ortopsilosis</i>	1	0	0	0.0%	0.0%
<i>Candida parapsilosis</i>	1	1	0	100.0%	0.0%
<i>Candida tropicalis</i>	6	6	4	100.0%	66.67%
<i>Cryptococcus gattii</i>	1	0	0	0.0%	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	2	2	0	100.0%	-
TOTAL	27	25	20	92,59%	74,07%

Concomitantemente, foi realizado o teste de sensibilidade antifúngica *in vitro* com seis antifúngicos: fluconazol, voriconazol, caspofungina, micafungina, anidulafungina e anfotericina B. Em relação ao fluconazol, 4 (14,8%) dos isolados apresentaram resistência, 21 (77,7%) exibiram sensibilidade, um (7,5%) foi sensível dose-dependente. Para o voriconazol, cinco (18,5%) foram resistentes, cinco (18,5%) foram intermediários e 17 (63%) foram

sensíveis. Para a caspofungina, um (4,2%) foi resistente, dois (8,3%) foram intermediários e 21 (87,5%) foram sensíveis. Para a micafungina, dois (8,3%) foram resistentes, nenhum intermediário e 22 (91,7%) dos isolados foram sensíveis. Para anidulafungina, dois (8,3%) foram resistentes, um (4,2%) foi intermediário e 21 (87,5%) foram sensíveis. Quanto a anfotericina B todos os isolados exibiram perfil de sensibilidade. O *breakpoint* com sua respectiva CIM de cada levedura se encontra sumarizado na Tabela 3.

No presente estudo, obtivemos um total de 14 (51,8%) isolados que exibiram um perfil de sensibilidade a todas as drogas testadas. Os isolados de *Cryptococcus neoformans* obtiveram sensibilidade as drogas utilizadas, entretanto o *Cryptococcus gattii* exibiu um perfil de resistência aos azólicos, sendo tendo boa resposta apenas a anfotericina B.

Tabela 3: Teste de sensibilidade antifúngica in vitro exibindo a CIM dos isolados de acordo com o documento M60 do CLSI

id_amostra	MALDI-TOF MS	fl(cim)	vor(cim)	cas(cim)	mic(cim)	ani(cim)	anfo(cim)
dip-hc-9	<i>Candida albicans</i>	S (0,5)	S (0,06)	S (0,06)	S (0,125)	S (0,06)	S (0,03)
dip-hc-19	<i>Candida albicans</i>	S (0,25)	S (0,125)	S (0,03)	S (0,125)	S (0,06)	S (0,03)
dip-huoc-28	<i>Candida albicans</i>	S (2)	S (0,125)	S (0,25)	R (2)	R (2)	S (0,125)
dip-hc-29	<i>Candida albicans</i>	S (0,5)	S (0,125)	S (0,03)	S (0,125)	S (0,06)	S (0,03)
uti-huoc-40	<i>Candida tropicalis</i>	S (0,5)	S (0,06)	S (0,03)	S (0,125)	S (0,06)	S (0,03)
dip-hc-49	<i>Candida tropicalis</i>	S (1)	R (1)	S (0,03)	S (0,125)	S (0,125)	S (0,125)
dip-hc-59	<i>Candida albicans</i>	S (0,5)	S (0,06)	S (0,03)	S (0,125)	S (0,06)	S (0,03)
dip-hc-60	<i>Candida albicans</i>	S (0,5)	S (0,125)	S (0,03)	S (0,125)	S (0,06)	S (0,03)
dip-hc-61	<i>Candida albicans</i>	S (0,25)	S (0,125)	S (0,03)	S (0,06)	S (0,06)	S (0,06)
dip-hc-65	<i>Candida albicans</i>	S (2)	S (0,125)	S (0,03)	S (0,125)	S (0,125)	S (0,06)
dip-hc-66	<i>Candida tropicalis</i>	R (64)	R (16)	S (0,03)	S (0,125)	S (0,125)	S (0,25)
dip-hc-71	<i>Candida tropicalis</i>	S (0,5)	S (0,06)	S (0,06)	S (0,125)	S (0,06)	S (0,25)
dip-hc-73	<i>Candida parapsilosis</i>	R (8)	R (4)	S (0,25)	S (0,06)	S (0,125)	S (0,125)
dip-hc-81	<i>Candida albicans</i>	S (0,25)	S (0,03)	S (0,06)	S (0,125)	S (0,06)	S (0,06)
dip-huoc-82	<i>Candida albicans</i>	S (2)	I (0,5)	S (0,25)	S (0,125)	S (0,06)	S (0,03)
uti-huoc-84	<i>Candida ortopsilosis</i>	R (16)	R (1)	S (0,25)	S (0,25)	S (0,5)	S (0,25)
dip-huoc-86	<i>Cryptococcus neoformans</i>	S (0,125)	S (0,03)	-	-	-	S (0,06)
dip-hc-90	<i>Candida albicans</i>	S (1)	S (0,125)	S (0,03)	S (0,125)	S (0,06)	S (0,03)

dip-huoc-93	<i>Cryptococcus gattii</i>	R (8)	I (0,5)	-	-	-	S (0,5)
uti-huoc-100	<i>Cryptococcus neoformans</i>	S (0,125)	S (0,125)	-	-	-	S (0,03)
dip-huoc-107	<i>Candida tropicalis</i>	S(0,25)	R (1)	S (0,3)	S (0,125)	S (0,125)	S (0,06)
dip-huoc-117	<i>Candida albicans</i>	S (2)	I (0,25)	S (0,125)	S (0,125)	S (0,125)	S (0,06)
dip-huoc-120	<i>Candida albicans</i>	S (1)	I (0,5)	S(0,125)	S (0,03)	S (0,03)	S (0,03)
dip-huoc-121	<i>Candida albicans</i>	S (0,5)	S (0,06)	S (0,06)	S (0,06)	S (0,06)	S (0,03)
dip-huoc-122	<i>Candida tropicalis</i>	SDD(4)	I (0,5)	I (0,5)	S (0,06)	S(0,125)	S (0,03)
dip-huoc-123	<i>Candida albicans</i>	S (2)	S (0,125)	I (0,5)	S (0,125)	I (0,5)	S (0,06)
uti-huoc-124	<i>Candida krusei</i>	-	S (0,125)	R (1)	R (4)	R (4)	S (0,25)

(fl= fluconazol, vor= voriconazol, cas= caspofungina, mic= micafungina, ani= anidulafungina e anfo= anfotericina B, S= sensível, R= resistente, I= intermediário, CIM= Concentração Inibitória Mínima).

Quanto a caracterização do biofilme, 25 (92,7%) das leveduras tiveram a capacidade de formação de biofilme. Destas, 21 (77,7%) leveduras exibiram uma alta atividade metabólica nos três intervalos de tempos pesquisados (24, 48 e 72 horas). Três leveduras (dip-hc-81, dip-huoc-82e dip-huoc-121) 11,1% exibiram um perfil de moderada atividade metabólica nas primeiras 24 horas, seguidas de alta atividade nas 48 e 72 horas posteriores. *C. parapsilosis* (dip-hc-73) obtida em amostras de hemocultura conforme ilustra na (Figura 1) foi a levedura com maior atividade metabólica e maior pico espectral em 24 horas. O paciente isolada essa levedura, apresentou contagem de linfócitos TCD4 de 46 células/ μ L.

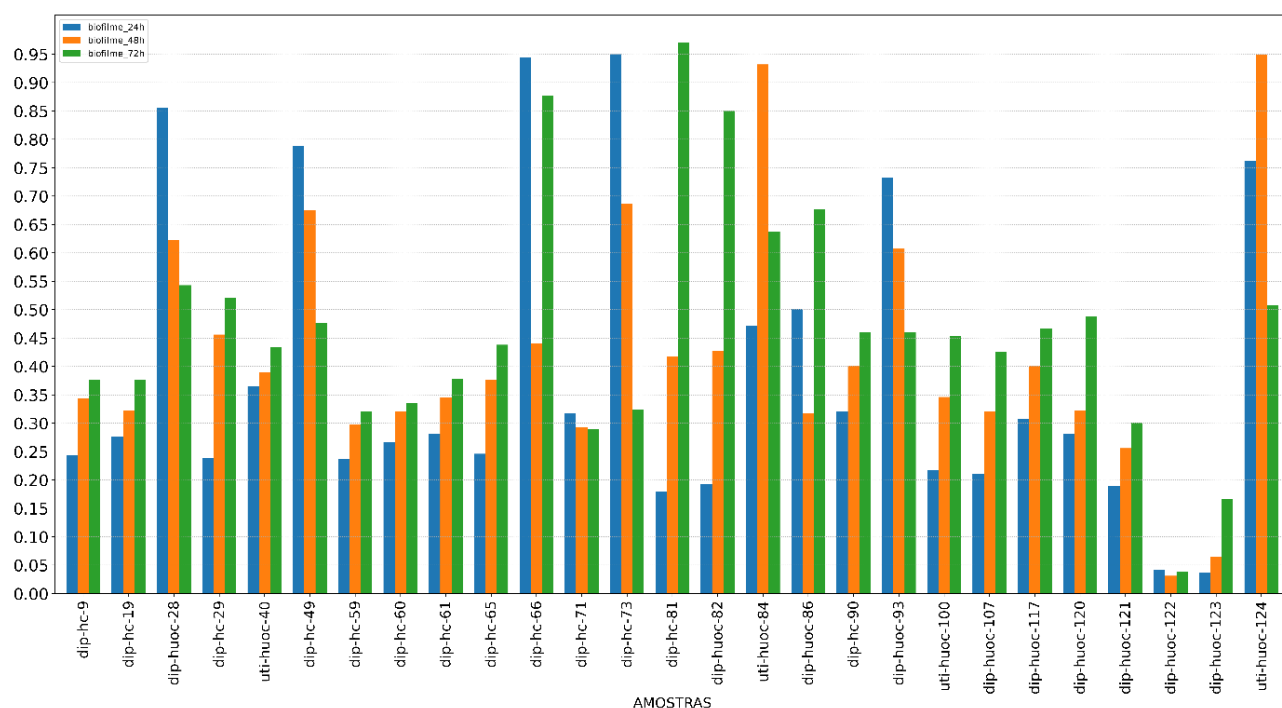


Figura 1: Atividade formadora de biofilme de espécies de levedura avaliada nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

4 DISCUSSÃO

No presente estudo tivemos uma incidência de 56,2% de levedurosos, sendo 55,6% causadas por *C. albicans*. Destes pacientes, 70,3% apresentaram contagens de linfócitos TCD4 menores que 200 células/ μ L e 29,7% contagem superiores a 200 células/ μ L.

Com resultados semelhantes ao presente estudo no que relaciona a contagens de células TCD4, um estudo realizado por Anwar et al. (2012) com 165 PVHIV, confirmou levedurosos em 80 pacientes. Destes, 62 (77,5%) pacientes apresentaram contagens de linfócitos TCD4 menores que 200 células/ μ L e 18 (22,5%) tinham contagem superiores a 200 células/ μ L. A contagem baixa de linfócitos TCD4 é o maior fator de risco para o desenvolvimento de candidíase, com risco aumentado para o surgimento de espécies de *Candida* não *albicans* como causadora de infecções invasivas, bem como maior índice de resistência a azóis e outros agentes antifúngicos²⁸.

Ambe NF et al. (2020) coletaram amostras de secreção oral de 378 PVHIV oriundas do Hospital Distrital de Kumba, como resultado, 162 (42,86%) pacientes foram diagnosticados com candidíase oral e a *Candida albicans* foi a levedura mais prevalente, totalizando 60,2% entre os seis isolados de *Candida* identificados, seguido por *Candida glabrata* (16,9%), *Candida krusei* (12,3%), *Candida tropicalis* (6,4%), *Candida parapsilosis* (2,3%) e *Candida pseudotropicalis* (1,8%). A candidíase oral foi observada com mais frequência entre os

indivíduos que possuíam taxas de linfócitos TCD4 inferior a 200 células/μl (13,23%) e a associação entre as células CD4 e a prevalência de candidíase oral foi estatisticamente significativa.

No presente estudo, os métodos de identificação mostraram-se eficientes, uma vez que obtivemos uma concordância de superior a 92,59% do VITEK®2 Compact com o VITEK® MS, assim como na pesquisa de Batista Araújo et al. (2019) no qual compararam 79 leveduras identificadas pelo VITEK®2 Compact e MALDI-TOF (VITEK®MS), e observaram uma concordância de 92,4%. Entre o CAC e o MALDI TOF a taxa variou entre diferentes cepas, para a *C. albicans* que foi superior a 95%, 91,7% para *C. tropicalis* e 50% *C. krusei*. Quanto as espécies de *Cryptococcus*, estudos anteriores comprovaram a eficácia do MALDI-TOF para a correta diferenciação das espécies²⁶. Estudos comparativos entre o VITEK®2 e MALDI-TOF MS apontam resultados com um nível de acurácia podendo atingir cerca de 97%¹⁵.

Um estudo realizado por Lamichhane et al. (2020) em Katmandu, Nepal com 174 PVHIV, 41 (23,6%) tinham infecção orofaríngea, 61% foram causados por *C. albicans* e 65% produziram biofilme com maior resistividade (51,9%) ao cetoconazol e a menor (22,2%) ao clotrimazol. Na nossa pesquisa, 92,7% das leveduras foram produtoras de biofilme e a *C. parapsilosis* foi quem apresentou maior atividade metabólica. Estudos confirmam que biofilmes formados por espécies de *Candida* não *albicans* apresentaram atividades metabólicas mais elevadas do que biofilmes de *C. albicans*^{19,20}.

Leveduras isoladas em PVHIV além de poder formar biofilmes, são mais propensas a desenvolver resistência sobretudo aos azólicos²⁸. No nosso estudo voriconazol foi a droga com maior índice de resistência com 18,5% dos isolados, seguidas do fluconazol com 14,8%. Tamai, Pakbin & Fasaie (2021) investigaram o perfil de sensibilidade antifúngica do fluconazol, clotrimazol, nistatina, anfotericina B, cetoconazol e flucitosina a *C. albicans* isoladas de PVHIV com infecção orofaríngea e obtiveram uma taxa de resistência superior ao nosso com 32% dos isolados resistentes ao fluconazol, 28% ao cetoconazol e 14% ao clotrimazol. A anfotericina B não teve caso de resistência em nenhum dos estudos. Pesquisas sugerem a anfotericina B como a droga mais eficiente e o fluconazol menos eficiente para espécies de *C. albicans*²⁷.

O diagnóstico fúngico em PVHIV precisa ser assertivo e eficiente, uma vez que leveduroses podem dificultar o tratamento e levar ao óbito. Apesar dos meios cromogênicos serem eficientes, não são capazes de diferenciar algumas leveduras patogênicas. Técnicas automatizadas como o sistema VITEK® 2 e a proteômica por MALDI-TOF apresentam melhor desempenho. Além disso, estudos com MALDI-TOF MS contribuem para aumentar a precisão da técnica e melhorias na base de dados para ampliar o espectro para leveduras, uma vez que

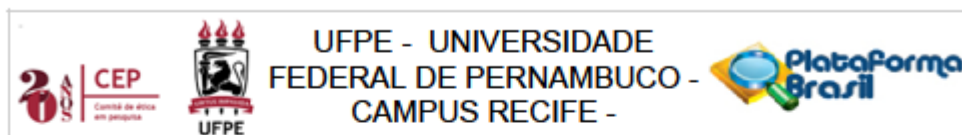
essas têm demonstrado uma tendência a resistência fúngica e formação de biofilmes que são relacionados a patogenicidade.

REFERÊNCIAS

- 1- UNAIDS. 2020 Global AIDS Update seizing the moment tackling entrenched inequalities to end epidemics. Geneva 2020. <https://www.unaids.org/en/resources/documents/2020/global-aids-report>. Accessed July 27, 2022.
- 2- Hardison E, Brown GD. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nature immunology*. 2012; 13: 817- 822.
- 3- Mohamed AA, Lu XL, Mounmin FA. Diagnosis and Treatment of Esophageal Candidiasis: Current Updates. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2019; 20; 1-6.
- 4- Lucas S, Nelson AM. HIV and the spectrum of human disease. *Journal Medical Microbiology*. 2015; 235: 229-241.
- 5- 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.
- 6- Costa CR, Passos XS, Souza LKH, et al. Differences in exoenzyme production and adherence ability of *Candida* spp. Isolates from catheter, blood and oral cavity. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2010; 52: 139-140.
- 7- Cordeiro RA, Serpa R, Mendes PBL, et al. The HIV aspartyl protease inhibitor ritonavir impairs planktonic growth, biofilm formation and proteolytic activity in *Trichosporon* spp. *Biofouling*. 2017; 33: 640-650.
- 8- Sidrim JLC, Rocha MFG. Micologia Médica a Luz dos Autores Contemporâneos; Edição 1, Rio de Janeiro, RJ: Editora Guanabara; 2004: 265-274.
- 9- Soares, UJO, Souza GR, Barbosa AH, et al. Detecção e identificação de leveduras em sucos de laranja natural comercializados. *Alimentos e Nutrição*. 2011; 22: 663-668.
- 10- CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standard-third edition M27-A3. *CLSI*. 2008. Wayne, PA.
- 11- Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ. Variations in DNA subtype, antifungal susceptibility, and slime production among clinical isolates of *Candida parapsilosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1995; 21: 9-14.
- 12- Ruiz LS, Khouri S, Hahn RC, et al. Candidemia by species of the *Candida parapsilosis* complex in children's hospital: prevalence, biofilm production and antifungal susceptibility. *Mycopathologia*. 2013; 175: 231–239.
- 13- Sittampalam GS, Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual - NCBI Bookshelf. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.
- 14- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al. Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 2003.
- 15- Ochiuzzi ME, Cataldi S, Guelfand L, Maldonado I, Arechavala A; Red de Micología CABA, Argentina. Evaluación del sistema Vitek 2 para la identificación de las principales especies de levaduras del género *Candida*. *Rev Argent Microbiol*. 2014; 46:107-110.
- 16- Arastehfar A, Daneshnia F, Kord M, et al. Comparison of 21-Plex PCR and API 20C AUX, MALDI-TOF MS, and rDNA Sequencing for a Wide Range of Clinically Isolated Yeast Species: Improved Identification by Combining 21-Plex PCR and API 20C AUX

- as an Alternative Strategy for Developing Countries. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019; 28; 9-21.
- 17- Idelevich E, Grunewald CM, Wüllenweber J, et al. Rapid identification and susceptibility testing of *Candida* spp. from positive blood cultures by combination of direct MALDI-TOF mass spectrometry and direct inoculation of Vitek 2. *J Med Microbiol.* 2014; 9: 1-14.
 - 18- Nascimento E, Vitali LH, Kress MRVZ, Martinez R. *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* isolates from both HIV-infected and uninfected patients: antifungal susceptibility and outcome of cryptococcal disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2017; 59: 1-7.
 - 19- Lamichhane K, Adhikari N, Bastola A, et al. Biofilm-Producing *Candida* Species Causing Oropharyngeal Candidiasis in HIV Patients Attending Sukraraj Tropical and Infectious Diseases Hospital in Kathmandu, Nepal. *HIV AIDS.* 2020;15: 211-220.
 - 20- Nunes JM, Bizerra FC, Ferreira RC, et al. Molecular Identification, Antifungal Susceptibility Profile, and Biofilm Formation of Clinical and Environmental *Rhodotorula* Species Isolates. *Antimicrobial Agents Chemothe.* 2013; 57:382-389.
 - 21- Araujo MRB, Seabra LF, Sousa MAB. MALDI-TOF mass spectrometry identification of yeast-form fungi: A comparison between methods. *Clin Biomed Res.* 2019; 39:128-135.
 - 22- Aubertine CL, Rivera M, Rohan SM, Larone DH. Comparative study of the new colorimetric VITEK 2 yeast identification card versus the older fluorometric card and of CHROMagar *Candida* as a source medium with the new card. *J Clin Microbiol.* 2006;44: 227-228.
 - 23- BioMérieux.VITEK® 2YST.Ref:21343.043908-02-2016-10. NorthCarolina. USA.<https://www.manualslib.com/manual/1291233/BiomerieuxVitek2.html#manual>. Accessed july,2020.
 - 24- Carbonnelle E, Nassif X. Applications of MALDI-TOF-MS in clinical microbiology laboratory. *Med Sci MS.* 2011; 27:882-888.
 - 25- Tarumoto N, Sakai J, Kodana M, et al. Identification of Disseminated Cryptococcosis Using MALDI-TOF MS and Clinical Evaluation. *Med Mycol J.* 2016; 57:41-46.
 - 26- Araújo MRB, Santos EGM, Wolf V, et al. Identification of *Cryptococcus neoformans* by MALDI-TOF mass spectrometry in blood culture. *Clin Biomed Res.* 2022; 38:200-202.
 - 27- Tamai IA, Pakbin B, Fasaie BN. Genetic diversity and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from Iranian HIV-infected patients with oral candidiasis. *BMC Res Notes.* 2021; 14: 1-7.
 - 28- Lucas S; Nelson AM. HIV and the spectrum of human disease. *J Med Microbiol.* 2015;235: 229–241.
 - 29- Bretagne S, Sitbon K, Desnos-Ollivier M, et al. Active Surveillance Program to Increase Awareness on Invasive Fungal Diseases: The French RESSIF Network (2012 to 2018). *mBio.* 2022; 13: 1-16.
 - 30- CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: approved standard-second edition M60-Ed2. 2020.CLSI. Inst. Wayne, PA.
 - 31- Anwar KP, Malik A, Subhan KH. Profile of candidiasis in HIV infected patients. *Iran J Microbiol.* 2012;4(4):204-209.
 - 32- Ambe NF, Longdoh NA, Tebid P, Bobga TP, Nkfusai CN, Ngwa SB, Nsai FS, Cumber SN. The prevalence, risk factors and antifungal sensitivity pattern of oral candidiasis in HIV/AIDS patients in Kumba District Hospital, South West Region, Cameroon. *Pan Afr Med J.* 2020; 36 (23): 1-14.

ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: LEVEDUROSES EM PACIENTES HIV POSITIVOS: DIAGNÓSTICO, DETECÇÃO DE SENSIBILIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILME E ATRAVÉS DE MALDI-TOF

Pesquisador: Gleiciere Maia Silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 03682818.7.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.135.348

Apresentação do Projeto:

Trata de um projeto intitulado "Leveduroses em pacientes HIV positivos: diagnóstico, detecção de sensibilidade e caracterização de biofilme e através de MALDI-TOF MS", o qual será desenvolvido no Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde-UFPE. A pesquisadora responsável Gleiciere Maia Silva, será orientada pela Professora Heloisa Ramos Lacerda de Melo e Co-orientada por Professor Reginaldo Gonçalves de Lima Neto. Serão incluídos 100 pacientes todos internados no Hospital Universitário Osvaldo Cruz de Recife-PE.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Diagnosticar precocemente leveduroses em pacientes HIV positivos através de MALDI TOF MS, definir o perfil epidemiológico, de susceptibilidade antifúngica dos agentes etiológicos e formação de biofilme dos isolados.

Objetivos Secundários: - Isolar e identificar as leveduras presentes nas amostras clínicas de pacientes HIV positivos internados em UTI DIP e enfermaria DIP;

- Determinar as leveduras de maior ocorrência em pacientes HIV positivos;
- Avaliar atividade antifúngica in vitro e correlacionar a concentração inibitória e fungicida das drogas;
- Detecção de resistência através da espectrofotometria de massas MALDI TOF MS;

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

ANEXO B - SCRIPT EM PYTHON DA ANÁLISE ESTATÍSTICA

tese-v1

August 17, 2022

Análise Estatística da Tese “Leveduroses em pessoas vivendo com HIV: Identificação polifásica, detecção de sensibilidade a antifúngicos e caracterização de biofilme”

```
[ ]: import pandas as pd
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
import os

[ ]: dir_tabelas = 'tabelas/'
dir_graficos = 'graficos/'
if not os.path.isdir(dir_tabelas):
    os.mkdir(dir_tabelas)
if not os.path.isdir(dir_graficos):
    os.mkdir(dir_graficos)

[ ]: #Leitura do dataset em .xlsx e conversão para dataframe
df = pd.read_excel('dados-tese.xlsx', sheet_name=0)
df = df.drop(columns='nome_paciente')
df.head(10)

[ ]: #Data frame das amostras consideradas exibindo os 10 primeiro registros
df_considerados = df[df['considerada'] == 's']
df_considerados[['id_amostra', 'tipo_amostra', 'vitek_teste',
                  'cromoagar_teste', 'malditof_teste']].head(27)

[ ]: #tabela do biofilme baseada nas amostras consideradas
df_biofilme = df_considerados[['id_amostra', 'malditof_teste', 'biofilme_24h',
                              'biofilme_48h', 'biofilme_72h']]
df_biofilme.to_excel(dir_tabelas+'Tabela Biofilme.xlsx', index = None)
df_biofilme

[ ]: #Tabela da Sensibilidade Baseada nas amostras consideradas
df_sensibilidade =
    df_considerados[['id_amostra', 'malditof_teste', 'fl(cim)', 'vor(cim)',
                    'cas(cim)', 'mic(cim)', 'ani(cim)', 'anfo(cim)']]
df_sensibilidade.to_excel(dir_tabelas+'Tabela de Sensibilidade.xlsx', index =
    None)
df_sensibilidade
```

```
[ ]: #função para calcular a frequência de uma coluna em %
def frequencia(name_col, df):
    freq = round((df.groupby(name_col).size() / df[name_col].size)*100, 2)
    #freq.index = freq.index.rename(None)
    return freq

[ ]: #frequencia dos isolados em quantidade do malditof
df_malditof_total = df_considerados.groupby('malditof_teste').size()
df_malditof_total

[ ]: #comparação de acerto do chromoagar em relação ao malditof
df_maldi_cromo = df_considerados[df_considerados['cromoagar_teste'] ==_
    ..df_considerados['malditof_teste']]
df_freq_maldi_cromo = df_maldi_cromo.groupby('malditof_teste').size()
df_freq_maldi_cromo

[ ]: #comparação de acerto do chromoagar em relação ao malditof
df_maldi_vitek = df_considerados[df_considerados['vitek_teste'] ==_
    ..df_considerados['malditof_teste']]
df_freq_maldi_vitek = df_maldi_vitek.groupby('malditof_teste').size()
df_freq_maldi_vitek

[ ]: #tabela comparativa com percentual de acerto do vitek em relação ao malditof
df_acerto = pd.concat([df_malditof_total, df_freq_maldi_vitek,_
    ..df_freq_maldi_cromo], axis = 1)
df_acerto.columns = ['MALDITOF', 'VITEK', 'CROMOAGAR']
df_acerto['AMOSTRA'] = df_acerto.index
df_acerto = df_acerto.reset_index(drop=True)
df_acerto = df_acerto[['AMOSTRA', 'MALDITOF', 'VITEK', 'CROMOAGAR']]
df_acerto = df_acerto.fillna(0)
df_acerto['VITEK'] = df_acerto['VITEK'].astype('int64')
df_acerto['%_ACERTO_VITEK'] = round(df_acerto['VITEK']/
    ..df_acerto['MALDITOF']*100,2)
df_acerto['%_ACERTO_VITEK'] = df_acerto['%_ACERTO_VITEK'].astype('str') + '%'
df_acerto['CROMOAGAR'] = df_acerto['CROMOAGAR'].astype('int64')
df_acerto['%_ACERTO_CROMOAGAR'] = round(df_acerto['CROMOAGAR']/
    ..df_acerto['MALDITOF']*100,2)
df_acerto['%_ACERTO_CROMOAGAR'] = df_acerto['%_ACERTO_CROMOAGAR'].astype('str')_
    ..+ '%'
df_acerto.loc[df_acerto['AMOSTRA'].str.contains('Cryptococcus'),_
    ..'%_ACERTO_CROMOAGAR'] = '-'
df_acerto.to_excel(dir_tabelas+'Tabela_comparativa_polifasica.xlsx', index =_
    ..None)
df_acerto
```

```
[ ]: #Função para gerar gráfico em pizza
# Título(str), Série(list), Rótulos(list), efeito -> Explodes(List),
    Cores(list)
def pizza(title, serie, label, explodes, color):
    serie.plot(kind = 'pie',
        autopct='%1.2f%%',
        labels=label,
        fontsize=14,
        colors = color,
        shadow=True,
        wedgeprops = {'linewidth' : 1, 'edgecolor' : "black" },
        explode=explodes,
        startangle = 90)
    plt.title(title, fontsize = 14)
    plt.axis("equal")
    plt.ylabel(None)
    plt.pie(serie, autopct='%1.1f%%')
    plt.savefig(dir_graficos+title + '.png', format='png', transparent=True,
        dpi=500, bbox_inches='tight')
    plt.show()

[ ]: # Tabela total da quantidade de amostras positivas e negativas
qtd_result = df.groupby('result_amostra').size()
freq_result = frequencia('result_amostra',df)
tab_result = pd.concat([qtd_result, freq_result], axis = 1)
tab_result.columns = ['qtd', '%']
tab_result['result_amostra'] = tab_result.index
tab_result = tab_result.reset_index(drop = True)
tab_result = tab_result[['result_amostra', 'qtd', '%']]
tab_result.to_excel(dir_tabelas+'percentual_resultado.xlsx', index = None)
tab_result

[ ]: #Gráfico do percentual de amostras positivas e negativas
pizza('Percentual de Amostras', freq_result, ["Negativas", "Positivas"], [0.1,
    0.0], ['blue', 'orange'])

[ ]: #Tabela de frequências do sexo baseada nas amostras consideradas
qtd_sexo = df_considerados.groupby('sexo_paciente').size()
freq_sexo = frequencia('sexo_paciente',df_considerados)
tab_sexo = pd.concat([qtd_sexo, freq_sexo], axis = 1)
tab_sexo.columns = ['qtd', '%']
tab_sexo['sexo_paciente'] = tab_sexo.index
tab_sexo = tab_sexo.reset_index(drop = True)
tab_sexo = tab_sexo[['sexo_paciente', 'qtd', '%']]
tab_sexo.to_excel(dir_tabelas+'percentual_sexo.xlsx', index = None)
tab_sexo
```

```
[ ]: #Gráfico das frequências do sexo baseada nas amostras consideradas
pizza('Percentual por Sexo', freq_sexo, ['Feminino', 'Masculino'], [0.1, 0.0],
      color=['pink', 'blue'])

[ ]: #frequência percentual do malditof baseada nas amostras consideradas
freq_malditof = frequencia('malditof_teste', df_considerados)
qtd_malditof = df_considerados.groupby('malditof_teste').size()
tab_malditof = pd.concat([qtd_malditof, freq_malditof], axis = 1)
tab_malditof.columns = ['qtd', '%']
tab_malditof['amostra'] = tab_malditof.index
tab_malditof = tab_malditof.reset_index(drop = True)
tab_malditof = tab_malditof[['amostra', 'qtd', '%']]
tab_malditof.to_excel(dir_tabelas+'tabela_amostras_malditof.xlsx', index = None)
tab_malditof

[ ]: #função para gerar gráfico em barra
# Título(str), serie(list), ylim(valor máximo de Y)
def barra(title, serie, ylim):
    colors = ['blue', 'red', 'green', 'pink', 'yellow', 'purple', 'brown',
              'black']
    serie.plot(kind = 'bar', color = colors)
    plt.grid(axis = 'y', linestyle = ":")
    #plt.title(title)
    plt.ylabel('PERCENTUAL %')
    plt.yticks(range(0, ylim, 5))
    plt.xticks(style = "italic", fontsize=12)
    plt.xlabel(None)
    plt.savefig(dir_graficos + title + '.png', format='png', transparent=True,
              dpi=500, bbox_inches='tight')
    plt.show()

[ ]: #Gráfico barra das frequências dos isolados no MALDITOF baseado nas amostras
      consideradas
barra('Gráfico MALDITOF', freq_malditof, 51)

[ ]: #frequência percentual do VITEK baseada nas amostras consideradas
freq_vitek = frequencia('vitek_teste', df_considerados)
freq_vitek

[ ]: #frequência percentual do cromoagar baseada nas amostras consideradas
freq_cromoagar = frequencia('cromoagar_teste', df_considerados)
freq_cromoagar

[ ]: # Gráfico das frequências percentuais do VITEK baseado nas amostras consideradas
barra('Frequência VITEK', freq_vitek, 51)
```

```
[ ]: #Quantidade de amostras por tipo baseada nas amostras consideradas
qtd_tipo_amostra = df_considerados.groupby('tipo_amostra').size()
qtd_tipo_amostra

[ ]: #percentual de amostras por tipo baseado nas amostras consideradas
freq_tipo_amostra = frequencia('tipo_amostra', df_considerados)
tab_tipo_amostra = pd.concat([qtd_tipo_amostra, freq_tipo_amostra], axis = 1)
tab_tipo_amostra.columns = ['qtd', '%']
tab_tipo_amostra['tipo_amostra'] = tab_tipo_amostra.index
tab_tipo_amostra = tab_tipo_amostra.reset_index(drop = True)
tab_tipo_amostra = tab_tipo_amostra[['tipo_amostra', 'qtd', '%']]
tab_tipo_amostra.to_excel(dir_tabelas+'percentual_amostras.xlsx', index = None)
tab_tipo_amostra

[ ]: #Gráfico percentual de amostras por tipo baseado nas amostras consideradas
barra('Tipos de Amostras', freq_tipo_amostra, 61)

[ ]: #Tabela de frequências percentuais das amostras em relação aos 3 tipos de
      diagnósticos
df_freq = pd.concat([freq_malдитof, freq_vitek, freq_cromoagar, ], axis = 1)
df_freq.columns = ['MALDITOF_%', 'VITEK_%', 'CROMOAGAR_%']
df_freq['AMOSTRA'] = df_freq.index
df_freq = df_freq.reset_index(drop=True)
df_freq = df_freq[['AMOSTRA', 'MALDITOF_%', 'VITEK_%', 'CROMOAGAR_%']]
df_freq = df_freq.fillna(0.0)
df_freq

[ ]: #tabela polifásica comparativa percentual das frequências dos isolados
title = 'Tabela comparativa percentual'
df_freq.plot(x='AMOSTRA', y=['MALDITOF_%', 'VITEK_%', 'CROMOAGAR_%'], kind="bar")
plt.title(title)
plt.ylabel('PERCENTUAL %')
plt.yticks(range(0, 51, 5))
plt.xticks(style = "italic", fontsize=12)
plt.grid(axis = 'y', linestyle = ":")
plt.xlabel(None)
plt.savefig(dir_graficos + title + '.png', format='png', transparent=True,
            dpi=500, bbox_inches='tight')
plt.show()

[ ]: #Gráfico em bara comparativo do teste do biofilme para 24, 48 e 72 horas.
title = 'Gráfico Biofilme'
df_considerados.plot(x='id_amostra', y=['biofilme_24h', 'biofilme_48h',
      'biofilme_72h'], kind="bar", width=0.75, figsize=(25,12))
plt.title(title)
plt.xlabel('AMOSTRAS', fontsize = 16)
plt.xticks(fontsize = 16)
```

```
plt.yticks(np.arange(0.00 , 1.00 , 0.05), fontsize = 18)
plt.grid(axis = 'y', linestyle = ":")
plt.savefig(dir_graficos+title + '.png', format='png', transparent=True,
            dpi=600, bbox_inches='tight')
plt.show()
```