

# Suscetibilidade aos fármacos antifúngicos de leveduras incomuns causadoras de fungemia em um hospital de oncologia

Alessandra Leal da S. Chaves<sup>1,2</sup>, Maria Helena Galdino F. de Carvalho<sup>1</sup>, Luciana Trilles<sup>1</sup>, Rowena Alves Coelho<sup>1</sup>, Gabriela Machado Martins<sup>1</sup>, Ianick Souto Martins<sup>2</sup>, Rodrigo de Almeida Paes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ);

<sup>2</sup>Serviço de Patologia Clínica - HCI, Instituto Nacional do Câncer (INCA), Rio de Janeiro, Brasil

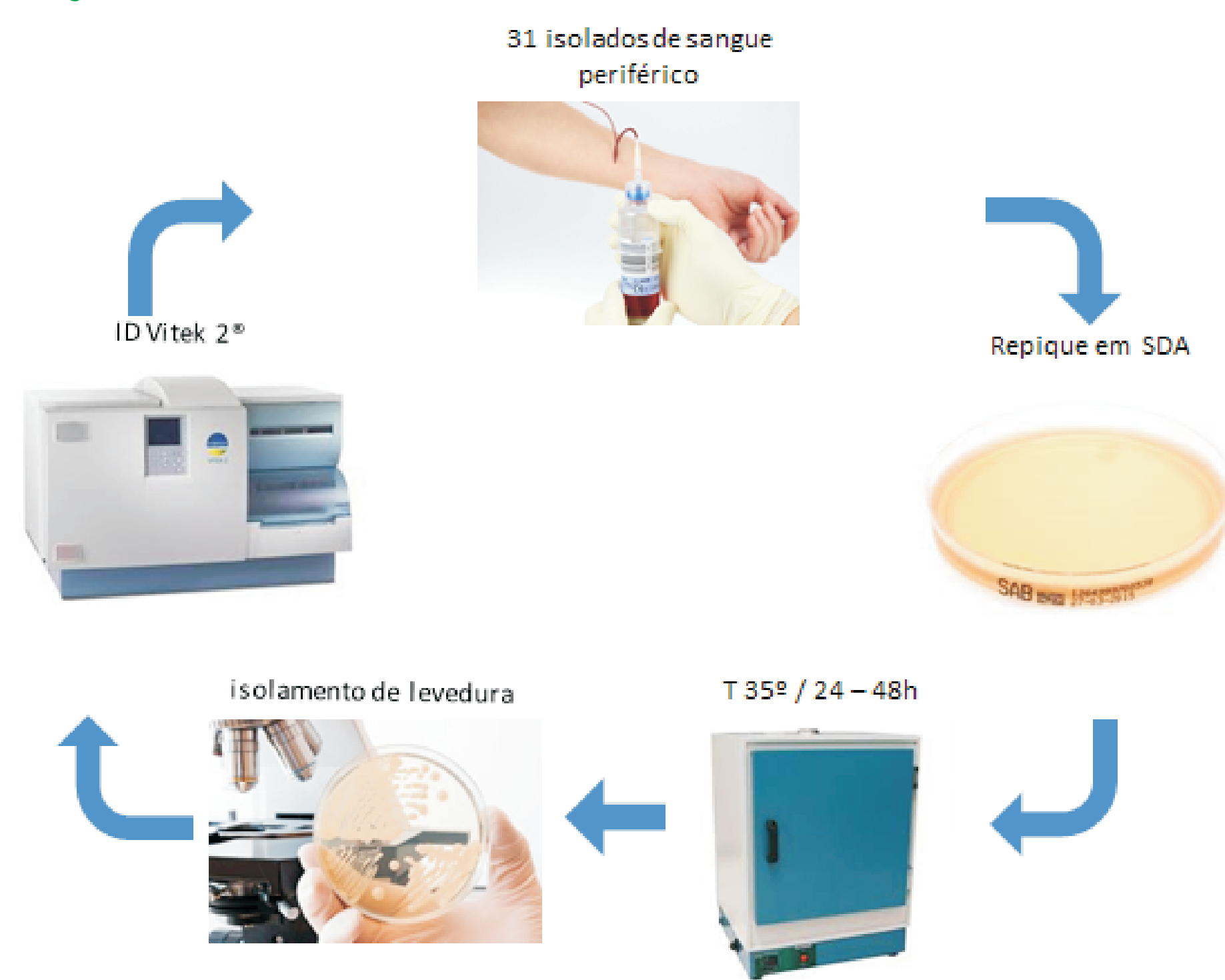
## INTRODUÇÃO

Atualmente as candidemias representam um grupo predominante de infecções hospitalares de corrente sanguínea com mortalidade associada. Nos últimos anos espécies incomuns, principalmente espécies de *Candida* não-*albicans* como *Meyerozyma guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida lusitanae*, *Candida famata* e *Candida haemulonii*, dentre outras, têm sido relatadas como emergentes causadoras de infecção de corrente sanguínea em pacientes oncológicos (1,2). A razão do aumento da incidência destas espécies não é bem estabelecida mas talvez se deva a melhor sensibilidade dos métodos diagnósticos (1). Perfis de maior resistência têm sido relatados em algumas destas espécies principalmente, Complexo *Candida guilliermondii* (3). Tais infecções tem sido atribuídas a internações prolongadas de pacientes suscetíveis (1) o uso prévio de antifúngicos é um fator predisponente (2). Pouco se sabe sobre estas espécies emergentes de *Candida*, em especial no Estado do Rio de Janeiro.

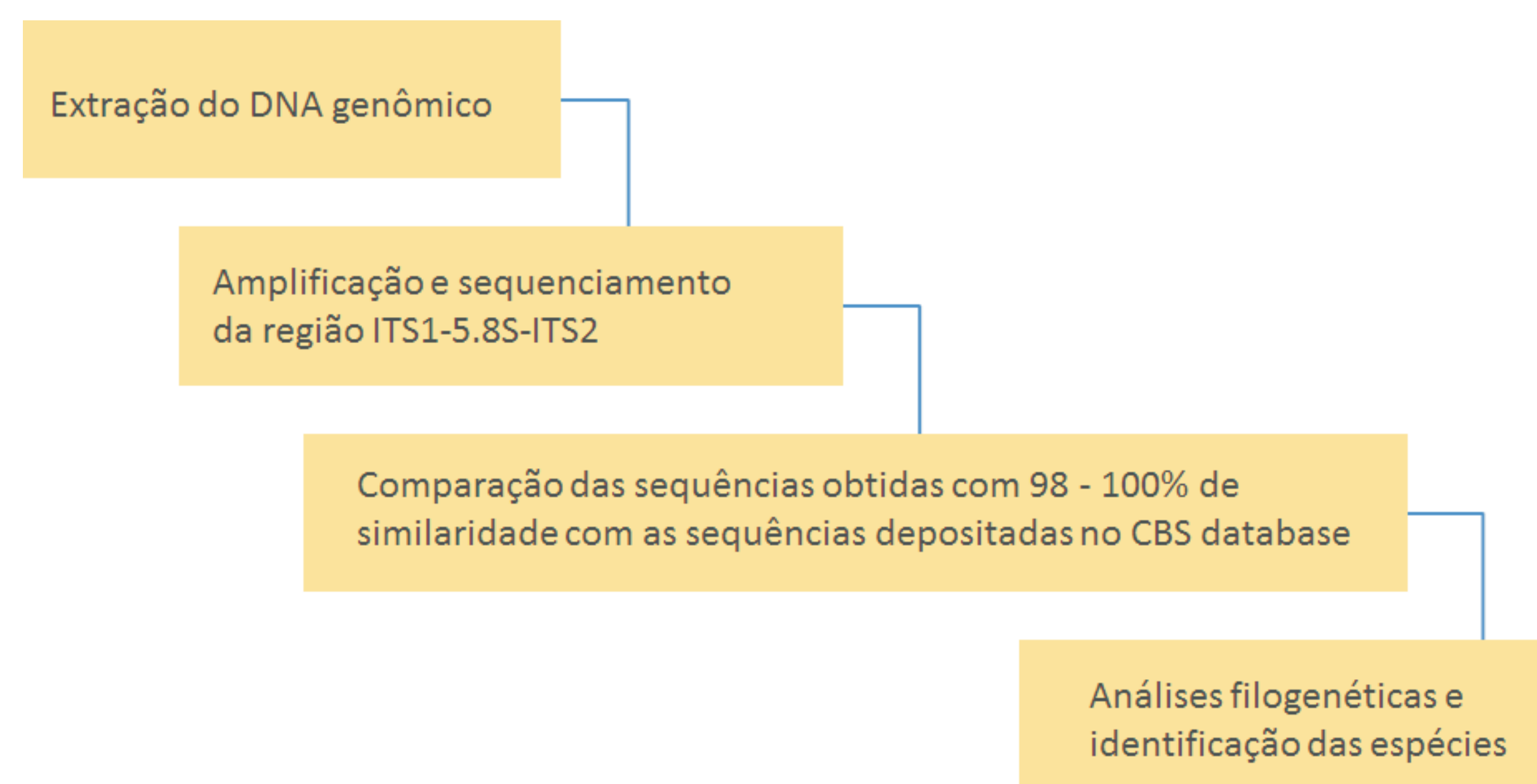
O objetivo deste estudo foi reidentificar por método molecular e determinar o perfil de suscetibilidade aos fármacos antifúngicos pelo protocolo da diluição em caldo EUCAST (5) de 31 isolados clínicos de leveduras incomuns, provenientes de amostras de sangue periférico, de pacientes atendidos no Instituto Nacional do Câncer - INCA-HCI, Rio de Janeiro, Brasil.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Obtenção e identificação dos isolados



### 2. Reidentificação molecular dos isolados



### 3. Teste de suscetibilidade - EUCAST 7.3.1 - 2017

1. Preparo das soluções-estoque dos antifúngicos
2. Diluições seriadas
3. Preparo das microplacas
4. Cultivo SDA 24 - 48h 35°C
5. Preparo do inóculo fúngico 0,5 x 10<sup>5</sup> and 2,5 x 10<sup>5</sup> CFU/mL
6. Inoculação em agar RPMI 1640 + Glicose 2%
7. Incubação 24 - 48h 35°C
- 8.5 Leitura da CIM: anfotericina ≥ 90% de inibição azólicos e equinocandinas ≥ 50% de inibição

Cepas de referência:  
*Candida parapsilosis* ATCC® 22019  
*Candida krusei* ATCC® 6258



Análise dos dados  
Foram analisados 31 isolados de leveduras incomuns, obtidos de sangue periférico de pacientes do INCA, armazenados no Laboratório de Micologia. Os dados foram interpretados de acordo com o protocolo EUCAST 7.3.1 (3) para os antifúngicos anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, caspofungina e micafungina, testados em triplicata. Exceto para *Candida dubliniensis* (Itraconazol e posaconazol <=0,064 (S), >=0,064 (R)) Voriconazol <=0,064 (S), >=0,25 (R) não há ponto de corte estabelecido para as demais leveduras raras.

*Wickerhamomyces anomalus* e Complexo *Candida guilliermondii* foram as espécies mais frequentes encontradas após reidentificação molecular dos isolados de leveduras incomuns, descrita na Tabela 1. A árvore filogenética para a região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA para as leveduras incomuns está representada na Figura 1. Dez isolados foram agrupados por similaridade como Complexo *Candida guilliermondii*. O Complexo *Candida famata* encontra-se mais próximo do Complexo *Candida guilliermondii* por similaridade. A distribuição das frequências das espécies que caracterizam a população estudada estão descritas no Gráfico 1.

Na Tabela 2 estão os resultados encontrados dos valores de CIM para os 31 isolados de leveduras incomuns analisados. De acordo com o ponto de corte estabelecido pelo EUCAST, os isolados de *C. dubliniensis* foram suscetíveis a Itraconazol (CIM 0,08), Voriconazol (CIM 0,08) e posaconazol (CIM 0,08). Esta é a única espécie que possui ponto de corte estabelecido no documento de referência. No entanto o protocolo determina ponto de corte epidemiológico (PCE) para o Complexo *Candida guilliermondii*: ANF B (0,125 µg/ mL), FLU (4 µg/ mL), ITRA (0,25 µg/ mL), VOR (0,064 µg/ mL), POS (0,064 µg/ mL).

Tabela 1 - Reidentificação molecular pela região ITS de 31 isolados de leveduras incomuns em sangue periférico no INCA

Espécie (n)	ID Vitek 2	Reidentificação pela região ITS
LE02	<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
LE03	<i>Candida guilliermondii</i>	Complexo <i>Candida guilliermondii</i>
LE04	<i>Candida guilliermondii</i>	Complexo <i>Candida guilliermondii</i>
LE05	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
LE06	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
LE07	<i>Candida famata</i>	Complexo <i>Candida guilliermondii</i>
LE08	<i>Candida famata</i>	Complexo <i>Candida guilliermondii</i>
LE09	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
LE10	<i>Candida haemulonii</i>	<i>Candida haemulonii</i> var. <i>vulnera</i>
LE12	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
LE14	<i>Candida guilliermondii</i>	Complexo <i>Candida guilliermondii</i>
LE15	<i>Candida guilliermondii</i>	Complexo <i>Candida guilliermondii</i>
LE16	<i>Candida guilliermondii</i>	Complexo <i>Candida guilliermondii</i>
LE17	<i>Candida guilliermondii</i>	Complexo <i>Candida guilliermondii</i>
LE18	<i>Candida kefyr</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
LE19	<i>Candida guilliermondii</i>	Complexo <i>Candida guilliermondii</i>
LE20	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
LE21	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
LE22	<i>Candida lusitanae</i>	<i>Clavispora lusitanae</i>
LE23	<i>Candida haemulonii</i>	<i>Candida haemulonii</i> var. <i>vulnera</i>
LE24	<i>Candida haemulonii</i>	<i>Candida haemulonii</i> var. <i>vulnera</i>
LE26	<i>Candida guilliermondii</i>	Complexo <i>Candida guilliermondii</i>
LE28	<i>Candida haemulonii</i>	<i>Candida haemulonii</i> var. <i>vulnera</i>
LE30	<i>Kodamaea ohmeri</i>	<i>Kodamaea ohmeri</i>
LE33	<i>Candida famata</i>	Complexo <i>Candida famata</i>
LE35	<i>Candida intermedia</i>	<i>Candida intermedia</i>
LE36	<i>Candida famata</i>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
LE37	<i>Candida intermedia</i>	<i>Candida intermedia</i>
LE38	<i>Candida lusitanae</i>	<i>Clavispora lusitanae</i>
LE40	<i>Candida intermedia</i>	<i>Candida intermedia</i>
LE43	<i>Candida kefyr</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>

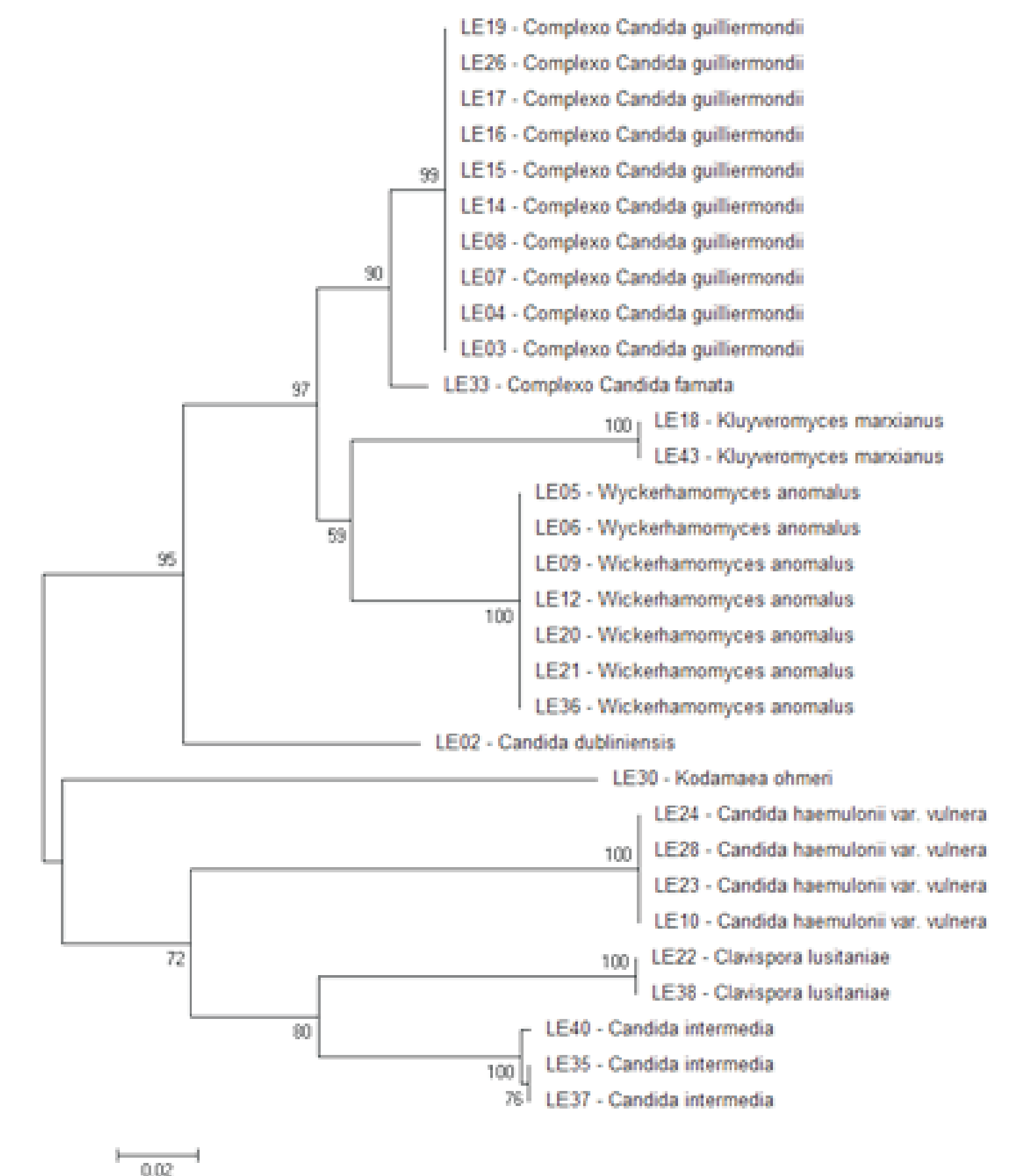


Figura 1. Árvore filogenética Neighbor Joining a partir da seqüência do gene ITS para os 31 isolados de leveduras incomuns analisados neste estudo. Os números sobre os ramos são valores de suporte de bootstrap obtidos a partir de 1000 pseudo-repetições. mg/l) e posaconazol (0,25 mg/l), (EUCAST, 2017).

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima de 31 isolados de leveduras incomuns aos fármacos antifúngicos de acordo com o protocolo EUCAST.

Espécie (n)	CIM (µg/ mL) variação						
	ANF B	FLU	ITRA	VOR	POS	CAS	MICA
Complexo <i>Candida guilliermondii</i> (10)	0,125 - 1	2 - 64	0,064 - 4	0,25 - 4	0,125 - 5	0,032 - 4	1 - 4
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (7)	0,064 - 0,25	0,25 - 8	0,064 - 0,125	0,064 - 0,25	0,125 - 1	0,016 - 0,125	0,016 - 0,125
<i>C. haemulonii</i> var. <i>vulnera</i> (4)	0,25 - 1	64	4	4	1 - 4	0,064 - 0,125	0,25 - 0,5
<i>Clavispora lusitanae</i> (2)	0,016 - 0,032	0,125 - 0,25	0,008 - 0,016	0,008	0,008	0,125	0,25
<i>C. intermedia</i> (3)	0,064 - 0,25	0,5 - 2	0,25	0,016	0,032 - 0,125	0,064 - 0,125	0,125
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (2)	0,125 - 0,25	0,25 - 0,5	0,016 - 0,064	0,008 - 0,016	0,032 - 0,125	0,016	0,125
<i>Candida dubliniensis</i> (1)	0,064	0,125	0,008	0,008	0,008	0,064	2
<i>Kodamaea ohmeri</i> (1)	0,032	4	0,064	0,032	0,032	0,25	0,5
Complexo <i>Candida famata</i> (1)	0,25	0,5	0,125	0,008	0,032	0,064	0,125

Gráfico 1 - Frequência das espécies de leveduras incomuns isoladas de sangue periférico no INCA após reidentificação molecular



## CONCLUSÃO

O Complexo *Candida guilliermondii* e *Wickerhamomyces anomalus* foram as espécies mais frequentes. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo anterior(1). Após análise do perfil de susceptibilidade dos isolados concluímos que o Complexo *Candida guilliermondii* e *Candida haemulonii* var. *vulnera* foram as espécies com maiores CIM's para os fármacos testados, sugerindo maior resistência. Anfotericina B foi o fármaco com melhor ação terapêutica *in vitro* para estes isolados (3,4).

A próxima etapa do estudo será correlacionar os resultados encontrados com dados clínicos dos pacientes e com aspectos fenotípicos das cepas que possam estar associados a virulência ou resistência aos antifúngicos, tais como mudança fenotípica, produção de enzimas hidrolíticas, hidrofobicidade, expressão de bombas de efluxo e capacidade de produção de biofilmes. Esperamos contribuir para o conhecimento sobre leveduras incomuns em pacientes com câncer, bem como entender possíveis mecanismos de resistência destas leveduras.

## REFERÊNCIAS

1. Taj-Aldeen, S. J., et al. Uncommon opportunistic yeast bloodstream infections from Qatar. Medical Mycology. 2014; 52(5):552-6.
2. Bretagne, S., et al. Predisposing factors and outcome of uncommon yeast species-related fungaemia based on an exhaustive surveillance programme (2002-14). Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2017; 72(6):1784-1793.
3. Tavernaba, C. G. et al. Reidentification and antifungal susceptibility profile of *Candida guilliermondii* and *Candida famata* clinical isolates from a culture collection in Argentina. Medical Mycology. 2019; 57(3): 314-323.
4. Ramos, L. S., et al. *Candida haemulonii* complex: species identification and antifungal susceptibility profiles of clinical isolates from Brazil. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2015; 70(1):111-115.
5. Arendrup M.C., et al. EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 7.3.1. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. 2017.