

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HEMATOLOGIA
MESTRADO EM CIÊNCIAS APLICADAS À HEMATOLOGIA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES FÚNGICAS ISOLADAS
DE PROCESSOS INFECCIOSOS DE PACIENTES DA FUNDAÇÃO
HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS

LUCYANE MENDES SILVA

MANAUS

2019

LUCYANE MENDES SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES FÚNGICAS ISOLADAS DE
PROCESSOS INFECCIOSOS DE PACIENTES DA FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE
HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas, em convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, para obtenção do grau de *Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia*.

Orientadora: **Prof^a Dr^a Cristina Motta Ferreira**

Co-orientador: **Prof. Dr. William Antunes Ferreira**

MANAUS

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

862749c Silva, Lucyane Mendes
Caracterização molecular de espécies fúngicas isoladas de processos infecciosos de pacientes da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas / Lucyane Silva. Manaus : [s.n], 2019.
91 f. : ; 3 cm.

Dissertação - PGSS - Ciências Aplicadas à Hematologia (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2019.
Inclui bibliografia
Orientador: Ferreira, Cristina Motta
Coorientador: Ferreira, William Antunes

1. infecções fúngicas. 2. doenças hematológicas. 3. suscetibilidade antifúngica. I. Ferreira, Cristina Motta (Orient.). II. Ferreira, William Antunes (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Caracterização molecular de espécies fúngicas isoladas de processos infecciosos de pacientes da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS A HEMATOLOGIA - UEA/HEMOAM

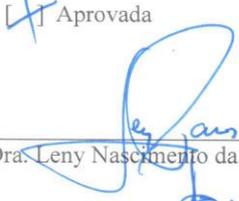


ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 07/2019

Aos trinta dias do mês de agosto do ano de 2019, às 09h00, realizou-se na Sala de Aula 10, Bloco E, 1º andar, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM, sito Av. Constantino Nery, 4397 – Chapada, a Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a) **Lucyane Mendes Silva**, sob o título “**Caracterização molecular de espécies fúngicas isoladas de processos infecciosos de pacientes da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas**”, em complemento aos critérios exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas a Hematologia, tendo como orientador (a) o Prof(a) Dr(a) **Cristina Motta Ferreira**, e coorientador (a) o Prof(a) Dr(a) **William Antunes Ferreira**, segundo encaminhamento do (a) Prof(a) Dr(a) **Cristina Motta Ferreira**, Coordenador (a) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Hematologia e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas. A Banca examinadora foi composta pelos seguintes membros: Profs. Drs.: Leny Nascimento da Motta Passos (HEMOAM), Cintia Mara Costa de Oliveira (UFAM), Kátia Santana Cruz (FMD-HVD). Encerrando os trabalhos, os examinadores deram o parecer final sobre a defesa, tendo sido atribuído à (o) aluna (o) o conceito discriminado no parecer da referida Comissão.

A Dissertação foi considerada:

Aprovada [] Não Aprovada



Profª. Dra. Leny Nascimento da Motta Passos (Presidente)



Profª. Dra. Cintia Mara Costa de Oliveira (Membro)



Profª. Dra. Kátia Santana Cruz (Membro)

DEDICATÓRIA

Dedico a realização de mais um sonho aos meus pais, Luiz Gomes Silva e Francimeire Mendes Silva, que são meu alicerce, razão da minha perseverança e a força que me sustenta nos momentos mais difíceis. Meu esforço é para honrar o amor e o tempo que vocês tão gentilmente me dedicaram todos esses anos, para que pudesse me tornar uma mulher realizada e feliz.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço à Deus, por ouvir minhas orações quando essa conquista era apenas um sonho, pelas oportunidades, desafios e pessoas que me proporcionou conviver durante esta caminhada, dentre tantos aprendizados que me ensinaram grandemente e são responsáveis pelo ser humano que sou hoje.

Agradeço também a minha família, Luiz Gomes Silva, Francimeire Mendes Silva, Lidyane Mendes Silva e Luis Matheus Silva Freire, meus bens maiores e orgulhos dessa vida. Obrigada pelo apoio, compreensão dos meus períodos de ausência e mau-humor, mas principalmente, obrigada por estarem sempre ao meu lado em todas conquistas da minha vida.

À minha orientadora, Cristina Motta Ferreira, por ser uma mãe na pesquisa científica, pela paciência, incentivo, críticas, desafios, amizade e chance de conhecer essa grande pessoa, pela qual tenho profundo respeito e admiração. E ao meu co-orientador, William Antunes Ferreira, pela chance de compartilhar de sua experiência, conhecimento e colaboração.

Aos meus colaboradores, Ani Beatriz Jackisch Matsuura, Roberto Alexandre Alves Barbosa Filho, Maria de Nazaré Saunier, Denise de Almeida Cristo, Guilherme Antunes Ferreira e Marielle Machado Macêdo. O apoio de todos foram fundamentais para a conclusão deste trabalho e sem ele nada disso teria sido possível.

À Universidade do Estado do Amazonas (UEA) e ao Programa de Pós-Graduação em Hematologia (PPGH) pela qualificação profissional oferecida, serviços prestados de forma organizada e buscando a excelência. À Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Fundação Alfredo da Matta (FUAM), Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/FIOCUZ) e Instituto Gonçalo Moniz (IGM/FIOCRUZ) pelo apoio com estrutura física.

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo financiamento de parte desta pesquisa (Edital UNIVERSAL AMAZONAS Nº 030/2013).

EPÍGRAFE

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante.”

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

A incidência de infecções fúngicas tem aumentado em todo o mundo, especialmente no ambiente hospitalar, representando uma das principais complicações infecciosas em pacientes hospitalizados e contribuindo para uma elevada morbimortalidade. Em particularmente em pacientes com doenças hematológicas, que realizam terapia quimioterápica intensa, o que ocasiona a depleção de seu sistema imune, deixando-os suscetíveis a desenvolver infecções como micoses oportunistas, neutropenia e outros fatores de risco. Os agentes etiológicos mais comuns responsáveis por esses processos infecciosos são *Aspergillus* spp. 38-80% e *Candida* spp. 28-58%, sendo relatado resistência frente à antifúngicos amplamente utilizados na terapia. A investigação à nível genético contribui para um melhor entendimento da epidemiologia molecular e mecanismos evolutivos desses patógenos. Assim, este estudo teve como objetivo caracterizar a nível molecular espécies de fungos isolados de processos infecciosos de pacientes atendidos da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Trata-se de um estudo transversal, prospectivo e descritivo. O período de coleta de dados foi de novembro de 2017 a outubro de 2018. Os registros foram obtidos através de prontuário, sistema SoftLab e iDoctor. A identificação das espécies de leveduras e teste de suscetibilidade (Fluconazol, Voriconazol, Caspofungina, Micafungina, Anfotericina B e Flucitosina) foram realizados com o equipamento automatizado Vitek-2 Compact. A identificação das espécies de fungos filamentosos foi realizada com o gene Internal Transcribed Spacer. Ainda no âmbito da epidemiologia molecular, realizou-se a genotipagem pelo método Multi Locus Sequence Typing, para definir os sequence types e ancestral comum dos isolados clínicos e construção de árvore filogenética. Com as análises iniciais dos resultados obtidos, verificou o total de 162 pacientes, 91 (56,2%) do sexo masculino e 71 (44%) feminino, com média de idade de 32 anos; todos de nacionalidade brasileira, sendo que 150 (92,6%) nasceram no estado do Amazonas; 66 (41%) não estudaram; 110 (68%) não possuem ocupação. Dos pacientes diagnosticados com alguma doença hematológica, a leucemia Linfoblástica aguda foi a mais frequente com 64 (39%) casos, seguida pela Leucemia Mielóide Aguda com 39 (24%). O total de 34 (21%) dos pacientes evoluíram para óbito. Do total das 285 amostras coletadas para exames microbiológicos, 241 (84,5%) hemocultura 39 (13,75%) urina, 2 (0,70%) pele, 1 (0,35%) medula óssea, 1 (0,35%) escarro, 1 (0,35%) secreção de cateter. Destas, 33 (12,0%) apresentam crescimento de fungos enquanto 91 (32,0%) bactérias. Não houve crescimento microbiano em 161 (56,0%). Dos 162 pacientes com suspeita de processo infeccioso, 30 (18,51%) apresentaram infecção por espécies de fungos onde 13 (39,39%) de espécies de *Penicillium* spp. foram isoladas de 12 (36,36%) amostras de Hemocultura. A maioria dos isolados leveduriformes apresentaram-se dentro da faixa sensível frente aos antifúngicos testados, não detectando nenhum gene de resistência. Apenas dois isolados de *Candida glabrata* apresentam sensibilidade reduzida ao Fluconazol. Com esses resultados, foi possível identificar e contextualizar diversos aspectos importantes desses patógenos como as questões relacionadas à saúde pública, à clínica, epidemiologia molecular e à terapêutica recomendada para os mais diversos processos infecciosos causados por esses agentes.

Palavras-chave: infecções fúngicas, doenças hematológicas, suscetibilidade antifúngica, epidemiologia molecular

ABSTRACT

The incidence of fungal infections has increased worldwide, especially in the hospital setting, representing one of the major infectious complications in hospitalized patients and contributing to high morbidity and mortality. Particularly in patients with hematological diseases, who undergoing intensive chemotherapy therapy, or who deplete their immune system, leaving them susceptible to developing infections such as opportunistic drugs, neutropenia and other risk factors. The most common etiological agents responsible for infectious processes are *Aspergillus* spp. 38-80% and *Candida* spp. 28-58%, being related to resistance to antifungals widely used in therapy. Research at the genetic level contributes to a better understanding of the molecular epidemiology and evolutionary mechanisms of these pathogens. Thus, this study aimed to characterize the molecular level of fungal species that cause infectious processes of patients treated by the Amazon Hospital Hematology and Hemotherapy Foundation. This is a cross-sectional, prospective and descriptive study. The data collection period was from November 2017 to October 2018. The records were used through medical records, SoftLab system and iDoctor. Identification of yeast species and susceptibility testing (Fluconazole, Voriconazole, Caspofungin, Micafungin, Amphotericin B and Flucytosine) were performed with the automated Vitek-2 Compact equipment. The identification of filamentous fungal species was performed with the Internal Transcript Spacer gene. Also within the scope of molecular epidemiology, genotyping by the Multi Locus Sequence Typing method was performed to define the sequence types and common ancestors of the clinical species and phylogenetic tree. With the initial analysis of the results obtained, we found a total of 162 patients, 91 (56.2%) males and 71 (44%) females, with a mean age of 32 years; all of them of Brazilian nationality, being 150 (92.6%) born in the state of Amazonas; 66 (41%) did not study; 110 (68%) do not have occupation. Of the patients diagnosed with a haematological disease, acute lymphoblastic leukemia was the most frequent with 64 (39%) cases, followed by Acute Myeloid Leukemia with 39 (24%). A total of 34 (21%) patients died. Of the 285 samples collected for microbiological examinations, 241 (84.5%) blood culture, 39 (13.75%) urine, 2 (0.70%) skin, 1 (0.35%) bone marrow, 1 (0, 35%) sputum, 1 (0.35%) catheter secretion. Of these, 33 (12.0%) have fungi growth, while 91 (32.0%) bacteria. There was no microbial growth in 161 (56.0%). Of the 162 patients with suspected infectious process, 30 (18.51%) were infected by fungal species where 13 (39.39%) *Penicillium* spp., 12 (36.36%) blood samples were isolated. Most yeast individuals identified within the sensitive range ahead of tested antifungals did not detect any resistance genes. Only two individuals with *Candida glabrata* have reduced sensitivity to Fluconazole. With these results, it was possible to identify and contextualize several important aspects of these pathogens, such as issues related to public health, clinical, molecular epidemiology and recommended therapy for the most diverse infectious processes caused by these agents.

Keywords: fungal infections, hematological diseases, antifungal susceptibility, molecular epidemiology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exame direto <i>Cryptococcus</i> spp.....	24
Figura 2 – Microcultivo <i>Candida albicans</i>	25
Figura 3 – Microcultivo <i>Aspergillus</i> spp.....	25
Figura 4 – Equipamento automatizado Vitek-2 Compact.....	26
Figura 5 – Cartão de identificação.....	26
Figura 6 – Organização estrutural dos genes ribossômicos fúngicos.....	28
Figura 7 – Desenho da Pesquisa.....	35
Figura 8 – Distribuição da frequência dos pacientes em relação aos municípios do estado do Amazonas.....	40
Figura 9 – Frequência dos pacientes em relação a zona de moradia na cidade de Manaus....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos principais fungos de importância médica.....	21
Tabela 2 – Orientações interpretativas do CLSI para testes de suscetibilidade <i>in vitro</i> de <i>Candida</i> spp. frente aos antifúngicos (M27-A3 e M27-S4) – <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> , 2008.....	27
Tabela 3 – Concentração e volume dos componentes da PCR para amplificação do gene ITS e locus do MLST.....	38
Tabela 4 – Frequência quanto as condições socioeconômicas dos pacientes.....	42
Tabela 5 – Frequência de doenças diagnosticadas nos pacientes.....	43
Tabela 6 – Frequência quanto a terapêutica utilizada nos pacientes diagnosticados com doença hematológica e nos casos suspeitos da infecção.....	44
Tabela 7 – Exames laboratoriais nos pacientes e a frequência quanto aos resultados de normalidade e a anormalidade – primeira amostra.....	45
Tabela 8 – Espécies fúngicas isoladas e identificadas nas amostras biológicas de pacientes com doenças hematológicas.....	46
Tabela 9 – Teste de suscetibilidade realizada nas espécies de leveduras isoladas de pacientes com doenças hematológicas.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

%	Porcentagem
[]	Concentração
<	Menor que
μl	Microlitros
μl	Microlitros
μM	Micrômetros
5-FC	Flucitosina
AE	Elution Buffer (Tampão de Eluição)
AF	Anemia Falcifome
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
AL	Lysis Buffer (Tampão de Lise)
AMB	Anfotericina B
ATCC	American Type Culture Collection (Coleção de Cultura Americana)
ATL	Tissue Lysis Buffer (Tampão de Lise de Tecidos)
AW1	Wash Buffer 1 (Tampão de Lavagem 1)
AW2	Wash Buffer 2 (Tampão de Lavagem 2)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local)
BOD	Biochemical Oxygen Demand (Demanda Bioquímica de Oxigênio)
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CASP	Caspofungina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLSI	Institute for Clinical and Laboratory Standards (Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais)
CO ₂	Dióxido de Carbono
ControlLab	Controle de Qualidade para Laboratórios
CrAg	Cryptococcal Antigen (Antígeno Criptocócico)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
DNAse	Desoxirribonuclease
DSTs	Tipos de Sequências Diplóides

EPI'S	Equipamentos de Proteção Individual
FCL	Fluconazol
FI	Fusariose Invasiva
g	Gramas
GenBank	Genetic Sequence Database (Banco de Dados de Sequência Genética)
GM	Galactomanana
HEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
IA	Aspergilose Invasiva
ID	Identificação
IF	Infecções Fúngicas
IGM/FIOCRUZ	Instituto Gonçalo Muniz/Fundação Oswaldo Cruz
ILMD/FIOCRUZ	Instituto Leônidas e Maria Deane/Fundação Oswaldo Cruz
ISDA	Infectious Diseases Society of America (Sociedade de Doenças Infeciosas da América)
ITS	Internal Transcribed Spacer
l	Litros
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
MEA	Malt Extract Agar (Ágar Extrato de Malte)
mg	Microgramas
MIC	Minimum Inhibitory Concentration (Concentração Inibitória Mínima)
MICA	Micafungina
ml	Mililitros
MLST	Multi Locus Sequence Typing
mM	Milímetros
mm ³	Milímetros Cúbicos
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Informação Biotecnológica)
ng	Nanogramas
nº	Número
NSA	Niger Seed Agar (Ágar Semente de Níger)

°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)
pb	Pares de Base
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
PK	Proteinase K
rcf	Força Centrífuga Relativa
rDNA	Ácido Desoxirribonucleico ribosomal
rpm	Rotações Por Minuto
rRNA	Ácido Ribonucleico ribosomal
SDA	Sabouraud Dextrose Agar (Ágar Sabouraud Dextrose)
ST's	Sequence Types (Tipos de Sequências)
TA	Termo de Assentimento
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TSA	Teste de Suscetibilidade aos Antifúngicos
U	Unidade
UV	Ultravioleta
V	Volts
VRC	Voriconazol
YES	Yeast Extract Agar (Ágar Extrato de Levedura)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Histórico, Classificação e Características Gerais dos Fungos.....	19
1.2. Infecções Fúngicas.....	20
1.2.1. Candidose.....	22
1.2.2. Criptococose.....	23
1.3. Diagnóstico Laboratorial.....	24
1.3.1. Identificação Clássica.....	24
1.3.2. Identificação Automatizada.....	25
1.3.2.1. Suscetibilidade aos antifúngicos.....	26
1.3.3. Identificação Molecular.....	27
1.4. Antifúngicos.....	29
1.5. Epidemiologia de Infecções Fúngicas em Pacientes com Doenças Hematológicas.....	30
2. OBJETIVOS.....	32
2.1. Objetivo Geral.....	32
2.2. Objetivos Específicos.....	32
3. MATERIAL E MÉTODO.....	33
3.1. Aspectos Éticos.....	33
3.2. Modelo de Estudo.....	33
3.3. Universo do Estudo.....	33
3.3.1. Locais do Estudo.....	33
3.3.2. Período de Coleta.....	33
3.3.3. Critérios de Inclusão.....	33
3.3.4. Critérios de Exclusão.....	34
3.4. Desenho da Pesquisa.....	34
3.5. Procedimentos.....	36

3.5.1. Coleta de Dados Clínicos, Epidemiológicos e Laboratoriais.....	36
3.5.2. Coleta das Amostras.....	36
3.5.3. Processamento e Armazenamento das Amostras.....	36
3.5.4. Diagnóstico Laboratorial.....	36
3.5.4.1. Identificação Clássica.....	36
3.5.4.2. Identificação Automatizada e Suscetibilidade aos Antifúngicos.....	37
3.5.5. Caracterizações Moleculares.....	37
3.5.5.1. Extração de DNA.....	37
3.5.5.2. Reações de PCR e Sequenciamento.....	38
3.5.5.3. Análise das Sequências Nucleotídicas e Filogenia.....	39
3.5.6. Análise de Dados.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1. Aspectos Demográficos e Socioeconômicos dos Pacientes.....	40
4.2. Aspectos Clínicos, Terapêuticos e Laboratoriais dos Pacientes.....	43
4.3. Dados dos isolados fúngicos e Pacientes ou Pacientes.....	45
4.4. Artigo.....	48
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
6. ANEXOS.....	72
Anexo A – Leveduras identificadas com o cartão VITEK 2 YST ID segundo orientações do fabricante (bioMérieux).....	72
6.2. Anexo B – Parecer Consubstanciado do CEP do HEMOAM.....	73
6.3. Anexo C – TCLE.....	74
6.4. Anexo D – TA.....	76
6.5. Anexo E – Formulário da Pesquisa.....	78
6.6. Anexo F – Meios de Cultura.....	79
6.7. Anexo G – Colorações.....	81
6.8. Anexo H – Protocolo de Extração de DNA de Fungos Filamentosos.....	82
6.9. Anexo J – Protocolo de Extração de DNA de Fungos Leveduriformes.....	84

6.10. Anexo J – Protocolo de Purificação de DNA com enzima ExoSAP (Thermo Fisher Scientific)	86
6.11. Anexo K – Comprovante de Submissão de Artigo Científico.....	87
6.12. Anexo L – Trabalho relacionado à Dissertação enviado à Evento Científico.....	88
6.12.1. Resumo 1.....	88
6.12.2. Resumo 2.....	89
6.12.3. Panfleto.....	89

1. INTRODUÇÃO

1.1.Histórico, Classificação e Características Gerais dos Fungos

Registros históricos referentes a meados do século XIX mencionam Agostino Bassi como “Pai da Micologia” por relatar que o agente *Beauveria bassiana* era o responsável pela doença Muscardina, que acometia os bichos-da-seda. Entretanto, foi no período correspondente a 1837 e 1841 que Robert Remak descreveu a primeira micose humana denominada de *Tinea favosa*, dando início assim ao que foi denominado como a história da Micologia Médica. No ano de 1856, Rodolf Virchow, identificou o primeiro caso de Aspergilose Pulmonar. Um marco histórico aconteceu em 1892 quando Raimond Jacques Sabouraud formulou o meio de cultura atualmente conhecido como Ágar Sabouraud Dextrose, além de organizar as classificações das doenças ocasionadas por fungos dermatófitos e devido a esses relevantes feitos, foi este pesquisador nomeado como “Pai da Micologia Moderna”, fatos significantes na transição do estudo das dermatofitoses para o de micoses sistêmicas. Em 1894, o primeiro caso de doença causada por *Coccidioides immitis* foi descrito em um soldado na Argentina, onde o relato descreve um quadro crônico de lesões cutâneas tumorais recorrentes. Samuel Tylor Darling, em 1905, descobriu o patógeno *Histoplasma capsulatum*. Posteriormente, precisamente em 1908, Adolfo Lutz observou lesões na cavidade oral de pacientes e observou que eram causadas pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*^{1,2,3,4}.

Após o ano de 1969, o pesquisador Whittaker contribuiu grandemente propondo que os fungos fossem classificados como um reino distinto dos vegetais, sendo nomeado Reino Fungi composto por fungos, algas (gênero *Prototheca*) e líquens. Características semelhantes fizeram com que fossem inseridos no mesmo reino, tais como o modo de nutrição (por absorção, por exemplo), e os que vivem como sapróbios, parasitas e os simbioses⁵. Segundo a classificação mais recente, que têm como base estudos filogenéticos, passou a considerar os seguintes filos: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Mucormycota*, *Zoopagomycota*, *Blastocladiomycota*, *Chytridiomycota* e *Cryptomycota*, portanto, passaram a ser conceituados 7 filos, 10 subfilos, 35 classes, 12 subclasses e 129 ordens^{6,7}.

A célula fúngica é composta por diferentes estruturas celulares, dentre elas podemos citar a parede celular, citoplasma e núcleo. A parede celular é um envoltório extracelular constituído

de quitina (N-acetilglicosamina) com papel estrutural; as hexoses que são responsáveis pela produção de energia e a melanina, cuja função é resistir aos raios ultravioletas e enzimas líticas. Imersas no fluido do citoplasma, as principais organelas incluem o retículo endoplasmático, responsável pela síntese de lipídios e proteínas; o complexo de Golgi com a função de modificar, armazenar e exportar proteínas; as mitocôndrias responsáveis pela respiração celular e vacúolos pelo armazenamento de substâncias. O núcleo tem características análogas de uma célula eucariótica, porém, possuem o menor genoma entre os seres eucarióticos, podendo variar de 12 a 88 pb, ainda assim é cerca de onze vezes maior que uma célula procariótica como a *Escherichia coli*^{8,9}.

Atualmente, os Fungos são descritos como organismos eucarióticos, essencialmente aeróbios, ubíquos, heterotróficos, cuja reprodução pode ser telemórfico e/ou anamórfico. Constituem um reino amplo e diversificado, podem ser encontrados parasitando organismos vivos ou na matéria orgânica em decomposição¹⁰.

1.2. Infecções Fúngicas

Estima-se que existam cerca de 1,5 milhões de espécies fúngicas, sendo que destas, foram descritas apenas 70 mil e cerca de 300 são conhecidos por parasitar só seres humanos. As Micoses são condições nas quais os fungos ultrapassam as barreiras de resistência do corpo e estabelecem infecções, e na sua maior parte são auto curáveis e benignas, porém outras são crônicas, de difícil ou terapêutica ainda inexistente ou não protocolada. Podem ser classificadas de acordo com o tecido inicialmente colonizado, como: superficiais, cutâneas, subcutâneas, profundas e oportunistas^{11,12,13} (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Classificação dos principais fungos de importância médica

Classificação	Área de acometimento	Doença	Agente etiológico
<i>Micoses superficiais</i>	Camada superficial da pele e pelo	Pitiríase Versicolor	<i>Malassezia</i> spp.
		Piedra Preta	<i>Piedraia hortae</i>
		Piedra Branca	<i>Trichosporon</i> spp.
		Tinea Nigra	<i>Hortae werneckii</i>
<i>Micoses Cutâneas</i>	Camada mais profunda da epiderme e acomete porções queratinizadas	Candidose	<i>Candida</i> spp.
		Dermatofitose	<i>Trichophyton</i> spp.
			<i>Microsporum</i> spp. <i>Epidermophyton</i> spp.
<i>Micoses Subcutâneas</i>	Camada da derme, tecido subcutâneo, músculo, osso	Esporotricose	<i>Sporotrix schenckii</i>
		Lacaziose	<i>Lacazia loboi</i>
		Cromobastomicose	<i>Fonsecaea</i> spp. <i>Phialophora</i> spp. <i>Cladosporium</i> spp.
<i>Micoses Profundas</i>	Qualquer tecido e órgão	Criptococose	<i>Cryptococcus</i> spp.
		Histoplasmose	<i>Histoplasma</i> spp.
		Paracoccidioidomicose	<i>Paracoccidioides</i> spp.
<i>Micoses Oportunistas</i>	Necessidade de imunossupressão do indivíduo	Aspergilose	<i>Aspergillus</i> spp.
		Fusariose	<i>Fusarium</i> spp.
		Peniciliose	<i>Penicillium</i> spp.

1.2.1. Candidose

A levedura *Candida* é um fungo comensal no ser humano, no entanto, pode ocasionar a doença devido às condições do sistema imune, e é importante mencionar que aproximadamente 92% das infecções invasivas associadas com este Gênero, podem ser causadas por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*^{14,15}.

Os fatores de riscos mais importantes para o desenvolvimento dessas infecções estão relacionados à utilização de antibióticos na terapia, seguido de neutropenia ($<500/\text{mm}^3$), com o uso de cateter urinário, acesso venoso central, bem como algumas doenças hematológicas que, devido à terapêutica, podem comprometer o sistema imune, casos de câncer sólido, HIV/AIDS, transplante, diabetes, doença genética, doença gastrointestinal, pancreatite, doença neurológica, entre outros¹⁶.

A apresentação clínica da Candidose varia de acordo com o tipo de infecção e o grau de imunossupressão, sendo a orofaríngea, cutânea, vulvovaginal as principais, porém pode acometer outras áreas como o trato gastrointestinal, pulmão, globo ocular e ainda pode disseminar ocasionando meningite^{17,18}.

A micose cutânea, infecção de caráter oportunista, mais comumente diagnosticada em humanos, são ocasionadas pelos Ascomycetes do gênero *Candida*, no qual 20 espécies podem causar a doença, sendo a mais comum a *C. albicans*. Estudos globais relatam o aumento de casos da doença desde os anos 80^{19,18}, a incidência é estimada em 72,8% de casos por milhão de habitantes no ano²⁰.

As culturas de sangue ou outras amostras coletadas em condições estéreis, têm sido consideradas como padrão ouro para o diagnóstico de Candidose invasiva²¹, outros testes como pesquisas de antígeno e anticorpo, ou ensaios de detecção β -D-glucano, e PCR estão agora fazendo parte da prática clínica^{22,23}.

No tratamento da Candidose invasiva são administrados Anfotericina B, Fluconazol, Itraconazol ou Cetoconazol, no entanto é recomendado o uso de acordo com a região afetada²¹.

1.2.2. Criptococose

Os Basidiomycetes do gênero *Cryptococcus*, também são responsáveis por micose sistêmica. As espécies patogênicas aos seres humanos são *C. neoformans* e *C. gattii*. Em nível global estima-se que ocorram em média 215,000 de casos anualmente que resultam em torno de 180,000 óbitos^{24,25}.

A doença é adquirida pela inalação de propágulos infectantes, sendo que ambos os patógenos *C. neoformans* e *C. gattii* constituem complexos de espécies amplamente distribuídos no ambiente, principalmente associados a fezes de aves e detritos de madeira^{26,27}.

Ter AIDS representa atualmente o fator de risco mais importante para a sua manifestação, no entanto, pacientes com doenças hematológicas, cirrose descompensada, transplantes, neoplasias, doenças auto-imunes e o uso de drogas imunossupressoras tem sido descrito como outros fatores^{28,13}.

Quadros agudos ou sub-agudos de meningoencefalite são as manifestações clínicas mais importantes devido a frequente ocorrência e ampla variedade e intensidade dos sintomas menígeos que podem surgir associados ou não a alterações visuais como amaurose e diplopia indicativas de comprometimento de nervos cranianos, assim como outras complicações neurológicas decorrentes do parasitismo fúngico no tecido nervoso e da reação inflamatória^{29,30}.

O diagnóstico laboratorial é baseado na análise de múltiplos fluídos biológicos, principalmente de LCR coletado com maior frequência em virtude da meningoencefalite. Realiza-se o exame direto com tinta nanquim para visualização das estruturas fúngicas e para a determinação qualitativa da carga fúngica. Atualmente o teste rápido CrAg para detecção do agente tem sido introduzido na rotina para diagnóstico precoce principalmente na investigação de casos assintomáticos, permitindo iniciar um tratamento pré-emptivo³¹.

Segundo as diretrizes da OMS, recomenda-se alta dose de Fluconazol, quando não houver a opção de Anfotericina B e Flucitosina. Apesar da sua longa duração, o tratamento tem se mostrado eficiente na maioria dos casos^{32,33}.

1.3. Diagnóstico Laboratorial

1.3.1. Identificação Clássica

De acordo com seus aspectos morfológicos, os fungos podem se apresentar sob dois tipos: leveduras ou filamentosos. Contudo, dependendo da exposição a temperatura, além da concentração de CO₂ e condição nutricional, há espécies que apresentam ambas as formas, e devido a essas características, são denominadas como fungos dimórficos. Crescem em temperaturas diferenciadas, podendo ser psicrófilos, mesofílicos ou termofílicos, e a faixa de crescimento varia de rápido (24 horas a 7 dias) a lento (20 dias ou mais)^{34,19}.

A taxonomia clássica dos fungos pode ser feita analisando-se suas características morfológicas macroscópicas (cor, textura e topografia), e microscópicas, através das características estruturais de cada tipo morfológico. As leveduras são células esféricas ou ovais (**Figura 1**), e algumas formam pseudo-hifas, como a espécie *Candida albicans* (**Figura 2**) e não possuem grande variedade de características micromorfológicas, necessitando de provas bioquímicas para a identificação em nível de espécie. Características estas que diferem dos fungos filamentosos, os quais apresentam hifas septadas ou cenocíticas, delicadas ou grosseiras, simples ou ramificadas (**Figura 3**), permitindo a identificação do gênero, e maioria das vezes, a espécie^{34,35,36,37}.

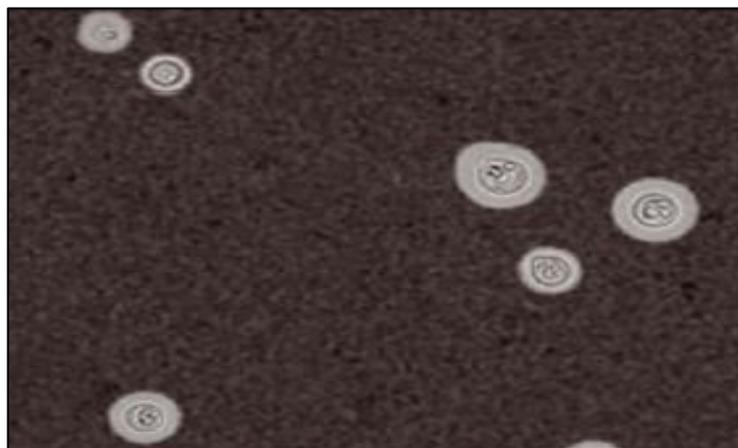


Figura 1 – Exame direto de *Cryptococcus* spp.

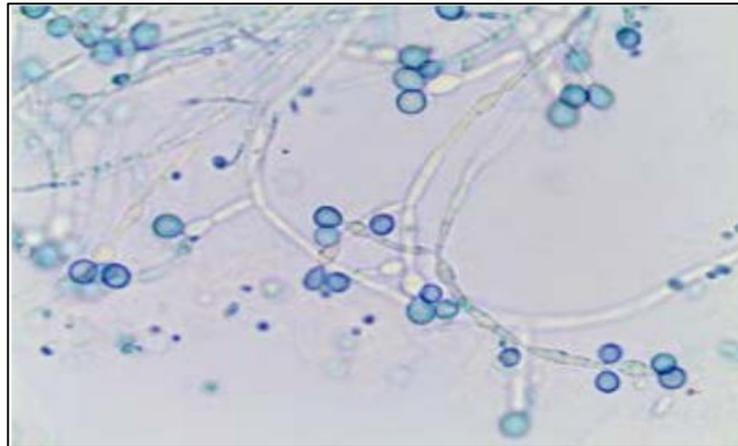


Figura 2 – Microcultivo *Candida albicans*

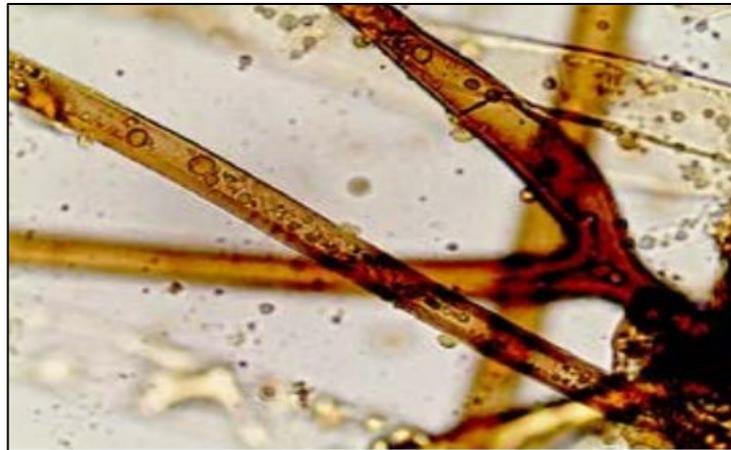


Figura 3 – Microcultivo *Aspergillus* spp.

Figura 1, 2, 3 – Fonte: https://controllab.com/pdf/topicos_micologia_4ed.pdf

1.3.2. Identificação Automatizada

O equipamento Vitek-2 Compact (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) (**Figura 4**) é um método automatizado encontrado na rotina laboratorial de centros hospitalares. Ele realiza a identificação apenas de fungos leveduriformes (**Anexo A**) e teste suscetibilidade frente aos antifúngicos mais utilizados na terapêutica, como FCL, VRC, CASP, MICA, AMB e 5-FC sendo seguida interpretação segundo CLSI M27-A3 e M27-S4^{38,39,40}. É considerado um sistema integrado modular formado por impressora, terminal de dados, módulo de controle computadorizado, leitor-incubador e unidade de enchimento seladora. O equipamento usa

substratos cromogênicos desidratados depositados em finos cartões de plástico (**Figura 5**). Estes substratos ao entrarem em contato com a suspensão do microorganismo a ser identificado, são reidratados. É um sistema, que usa tecnologia de fluorescência, detectando o crescimento do agente patogênicos, reações metabólicas nas microcavidades dos cartões de plástico, assim que ocorrerem mudanças de coloração decorrentes das reações bioquímicas e densidade óptica. Não se faz necessário utilizar reagentes adicionais, e o tempo para liberação dos resultados das identificações de leveduras são disponibilizados no período de 4 a 18 horas^{41,42}.



Figura 4 – Equipamento automatizado Vitek-2 Compact

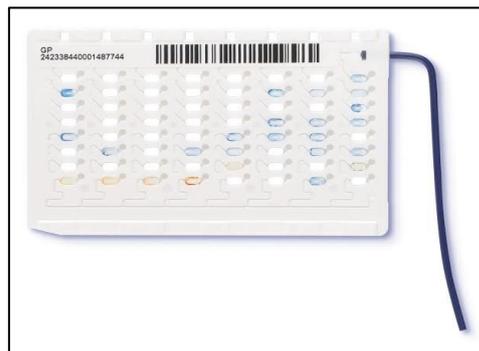


Figura 5 – Cartão de identificação

Figura 4 – Fonte: <https://bimedis.com/a-item/bacteriological-analyzers-biomerieux-vitek-2-compact-15-1106292>

Figura 5 – Fonte: <https://www.biomerieux.co.uk/cosmetics/vitek-2-compact>

1.3.2.1. Suscetibilidade aos antifúngicos

O valor da Concentração Inibitória Mínima (MIC) (**Tabela 2**) de um antifúngico, não define o resultado do tratamento. A capacidade de resposta do sistema imune do paciente, o estágio evolutivo da doença antes de a mesma ser diagnosticada, a formação de pús nas vísceras ou cavidades, próteses ou cateteres infectados são fatores que irão interferir na eficácia do

tratamento em relação a atividade inibitória ou microbicida da terapia. Diante dessa limitação, os valores absolutos do MIC podem apenas ser interpretados como: resistência *in vitro*, maior chance de falha terapêutica e, sensibilidade *in vitro*, maior probabilidade de eficácia no tratamento terapêutico utilizado^{43,44,45}.

Tabela 2 – Orientações interpretativas do CLSI para testes de suscetibilidade *in vitro* de *Candida* spp. frente aos antifúngicos (M27-A3 e M27-S4) – *Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008*

Antifúngicos	Interpretação da concentração inibitória mínima (µg/mL) após 48 horas		
	Suscetível (S)	Suscetível-dose dependente (S-DD)	Resistente (R)
Anfotericina B¹	-	-	>1
Caspofungina^{2,3}	≤0,25	-	≥1
Fluconazol³	≤2	4	≥8
5-Flucitosina	≤4	-	≥32
Itraconazol	≤0,125	0,25-0,5	≥1
Micafungina	≤2	-	-
Voriconazol³	≤0,125	0,25-0,5	≥1

¹a metodologia proposta pelo CLSI não permite atribuição dos parâmetros S e S-DD para a anfotericina B e conclui que os isolados que apresentarem CIM > 1 µg/mL são tidos como provavelmente resistentes a tal antifúngico.

²a leitura dos testes de suscetibilidade frente a caspofungina deve ser realizada após 24 horas de crescimento.

³os valores de CIM descritos para fluconazol, voriconazol e caspofungina são específicos para a espécie *Candida albicans* e estão propostos no documento M27-S4⁴⁰ do CLSI.

1.3.3. Identificação Molecular

A técnicas moleculares são consideradas revolucionárias, pois geram resultados em poucas horas superando limitações do diagnóstico convencional, e conseqüentemente, ocorre a melhora na escolha terapêutica antifúngica⁴⁶.

Dentre elas, a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) possui elevado nível de sensibilidade na identificação dos agentes de micoses através de seu DNA. É constituída por três ciclos: fase de desnaturação, em que ocorre o aquecimento para a separação da dupla fita de DNA; fase de anelamento, consiste no resfriamento para permitir que os primers formem pontes de hidrogênio com as sequências alvo do DNA e a fase de extensão da fita de DNA⁴⁷.

Quando se refere a identificação molecular, o alvo comum nas pesquisas utilizando a PCR é o DNA ribossomal (rDNA), cujos genes estão presentes em todos microrganismos⁴⁸.

Para se identificar o agente por sequenciamento de DNA, o gene alvo deve conter regiões de sequências conservativas que permitam a utilização de primers universais (iniciadores) e essas regiões devem ser variáveis suficientemente para discriminação à nível de gênero e espécie^{49,50}.

As regiões Internal Transcribed Spacer (ITS) (**Figura 6**), que constituem o DNA ribossomal, cuja estrutura é composta por quatro genes ribossomais (subunidade 18S, subunidade 5.8S, subunidade grande 28S e subunidade 5S), separados por regiões ITS por meio do rRNA, onde os alvos mais comuns são as regiões ITS1 e ITS4, consideradas o “código de barras” para identificação molecular dos fungos⁵¹.

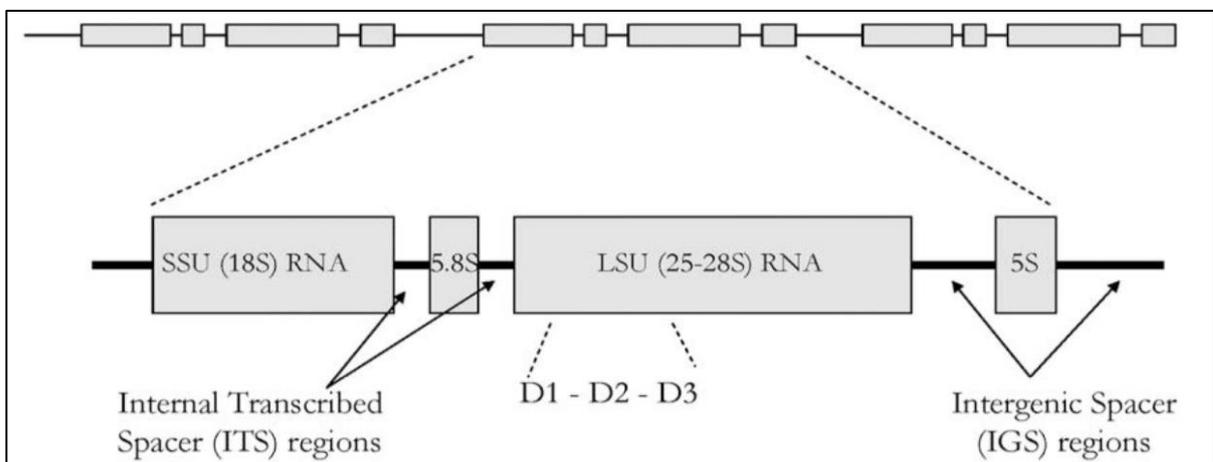


Figura 6 – Organização estrutural dos genes ribossômicos fúngicos

Figura 6 – Fonte: Wengenack & Binnicker, 2009.

O GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy), do National Center for Biotechnology Information (NCBI) é considerado um dos mais relevantes bancos de dados que classificam os fungos, com o apoio dos laboratórios internacionais que reúnem sequências de mais de 212 milhões (acesso em 26/04/2019) organismos distintos⁵².

Outra técnica bastante utilizada na pesquisa clínica, e que faz uso da PCR como ferramenta, é o Multi Locus Sequence Typing (MLST). A partir da sequência de fragmentos internos dos genes housekeeping os isolados são identificados. Devido ao polimorfismo encontrado nesses genes, os quais definem o perfil alélico ou tipo de sequência diplóide, podem ser comparados

com um banco de dados de Tipos de Sequências Diplóides (DSTs) através do site <http://www.mlst.net>. O uso dessa técnica permite o estudo detalhado de diversas cepas e suas evoluções⁵³.

1.4. Antifúngicos

A identificação do agente etiológico é primordial, principalmente das infecções fúngicas invasivas, pois a patogenicidade e seu perfil de suscetibilidade frente aos antifúngicos varia entre as espécies^{54,55}.

Os antifúngicos são agentes fungicidas ou fungistáticos utilizados para tratar ou prevenir contra as infecções fúngicas, podendo ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação^{8,10}.

O ergosterol constitui a membrana celular, e no decorrer do crescimento fúngico, ocorre a biossíntese de ergosterol que é um dos processos mais relevantes da célula. Até se tornar ergosterol acontecem várias ações enzimáticas, iniciando pelo esqualeno sofrendo ação enzimática da esqualeno epoxidase, transformando-se em esqualeno epóxido. Essa enzima é substrato de outras até se transformar em ergosterol. Os agentes que atuam contra essa enzima, replicação fúngica, através da intercessão de sua síntese^{8,10,56}.

Os antifúngicos, anfotericina B e nistina, são classificados como poliênicos. Ligam-se ao ergosterol formando canais ocasionando elevação da permeabilidade da membrana, assim sofrendo perda de eletrólitos, moléculas além da alteração na homeostasia^{10,57}.

A citosina desaminase serve como intermédio de entrada do agente flucitosina penetrar na célula fúngica. Esse agente uma adentrado na célula, é convertido em 5-fluoracil, inibindo o timidilato-sintetase e, conseqüentemente, a síntese de DNA^{10,57}.

Os azóis podem se difundir nos tecidos infectados por serem apolares, são considerados compostos sintéticos heterocíclicos e subdivididos em imidazóis e triazóis. A afinidade de ligação do composto antifúngico ao sistema enzimático citocromo P-450 presente no fungo,

depende da quantidade de nitrogênios no anel azol. Possuem elevada versatilidade e amplo espectro^{10,58,57}.

As equinocandinas tem utilização exclusiva parenteral: anidulafungina, caspofungina e micafungina representam a classe terapêutica. São considerados fungicidas para espécies de leveduras como *Candida*. A 3-B-D-glucana é um componente fundamental na formação da parede celular, e essa classe atua inibindo o complexo enzimático^{54,57}.

1.5. Epidemiologia de Infecções Fúngicas em Pacientes com Doenças Hematológicas

As IF ainda são consideradas um sério problema de saúde pública no mundo. Foi relatado mais de 1 bilhão de pessoas acometidas ou diagnosticada com alguma infecção por fungos, sendo 25 milhões desses pacientes em risco iminente de dano grave de órgãos ou até a morte por esses patógenos⁵⁹. Podem representar um risco ainda maior se afetam indivíduos ou pacientes com algum comprometimento do sistema imunológico imunocomprometidos como em pacientes com doenças hematológicas que necessitam ser submetidos a tratamento por quimioterapia. Registros epidemiológicos das últimas décadas comprovam a alta taxa de mortalidade que pode alcançar até 82% nesse grupo de pacientes^{60,61,62}.

Dentre as espécies de fungos mais comumente identificados como responsáveis por processos infecciosos graves que acometem pacientes com alguma doença hematológica, estão Aspergilose 38-80% e Candidose 28-58%^{63,64}. A Fusariose é considerada por alguns autores como a terceira doença mais comum, e por ser uma micose invasiva pode causar infecções fatais⁶⁵. Contudo, mesmo ainda sendo considerados “eventos raros”, infecções por outros gêneros como Mucormiose, Feohifomicose, Tricosporonose podem resultar em morbimortalidade^{66,61}.

Santos et. al.⁶⁷, em Porto Alegre-Brasil, a pesquisa analisou as indicações para uso de GM sanguíneo em que foram seguidas diferentes variáveis como aspectos clínicos e demográficos, entre 2015-2016. 30/245 pacientes obtiveram positividade de GM, os pacientes com desordens hematológicas representaram 60.1% dos casos, sendo 19.6% a LMA com maior frequência.

Nucci et. al.⁶⁸, no Rio de Janeiro-Brasil, realizou um estudo entre 2006-2007 em que comparou a epidemiologia, aspecto clínico, diagnóstico e tratamento dos pacientes com doenças hematológicas infectados por aspergilose invasiva e fusariose invasiva. Foram recrutados 36 pacientes com IA e 26 com FI, sendo a LMA a mais frequente em 40.3% dos casos.

Júnior et.al.⁶³, em Goiás-Brasil, foram estudadas características epidemiológicas e suscetibilidade frente aos antifúngicos, do ano de 2009-2011. Observou-se positividade de 19/117 casos de infecção por fungo, sendo 10 por *Aspergillus* spp., 6 *Candida* spp., 2 *Fusarium* spp. e 1 *Acremonium* spp. E doença hematológica mais diagnosticada foi a LMA com 24.7%.

Na região Norte, dados epidemiológicos ainda são inexistentes, sendo este o primeiro realizado com essa população de estudo. Contudo, foi realizado um levantamento referente ao diagnóstico micológico positivo, no período de janeiro de 2014 a dezembro de 2017 com pacientes da Fundação HEMOAM. Dos 23 pacientes diagnosticados LLA com (13), LMA (8) e AF (2), e 48 casos de infecções fúngicas foram registrados acometendo esses pacientes, sendo as espécies mais frequentes, Candidose (46) e Criptococose (2).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Caracterizar a nível molecular espécies de fungos isolados de processos infecciosos de pacientes atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

2.2. Específicos

- Descrever os aspectos clínico-epidemiológicos e laboratoriais, dos pacientes diagnosticados com infecção fúngica;
- Identificar, à nível de espécie, as leveduras pelo método automatizado e fungos filamentosos pelo método molecular;
- Determinar a suscetibilidade dos antifúngicos das leveduras frente ao Fluconazol, Voriconazol, Caspofungina, Micafungina, Anfotericina B e Flucitosina pelo método automatizado;
- Descrever os aspectos relacionados a genotipagem desses patógenos a partir de metodologias como as utilizadas pelo Multi Locus Sequence Typing (MLST) para definir os sequence types (STs) e ancestral comum dos isolados clínicos e construção de árvore filogenética.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Aspectos Éticos

Este projeto foi submetido e aprovado pelo CEP do HEMOAM, seguindo a Resolução 466/12, sendo obtido o CAAE de N° 73548017.5.0000.0009 (**Anexo B**).

3.2. Modelo de Estudo

Trata-se de um estudo transversal, prospectivo e descritivo.

3.3. Universo do Estudo

3.3.1. Locais do Estudo

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia Clínica e Multidisciplinar do HEMOAM, onde foram executadas as etapas de isolamento por cultivo e antifungigrama dos respectivos isolados fúngicos. No laboratório o de Genômica do HEMOAM e no Multiusuário em Saúde do ILMD/FIOCRUZ, realizou-s os procedimentos de extração de DNA, PCR e a purificação dos produtos de PCR. As reações de sequenciamento foram feitas pela Plataforma Tecnológica de Sequenciamento de DNA do IGM/FIOCRUZ.

3.3.2. Período de Coleta

A coleta foi realizada entre novembro de 2017 a outubro de 2018.

3.3.3. Critérios de Inclusão

- Doadores de sangue e indivíduos portadores de alguma doença hematológica de ambos os sexos, e qualquer faixa etária com suspeita clínica ou com diagnóstico laboratorial de processo infeccioso fúngico.

3.3.4. Critérios de Exclusão

- Pacientes com indisponibilidade de dados clínico-epidemiológicos e laboratoriais no prontuário, e para acesso no sistema iDoctor e/ou SoftLab.

3.4. Desenho da Pesquisa

Os procedimentos realizados de acordo com os objetivos do presente estudo estão descritos no fluxograma (**Figura 7**).

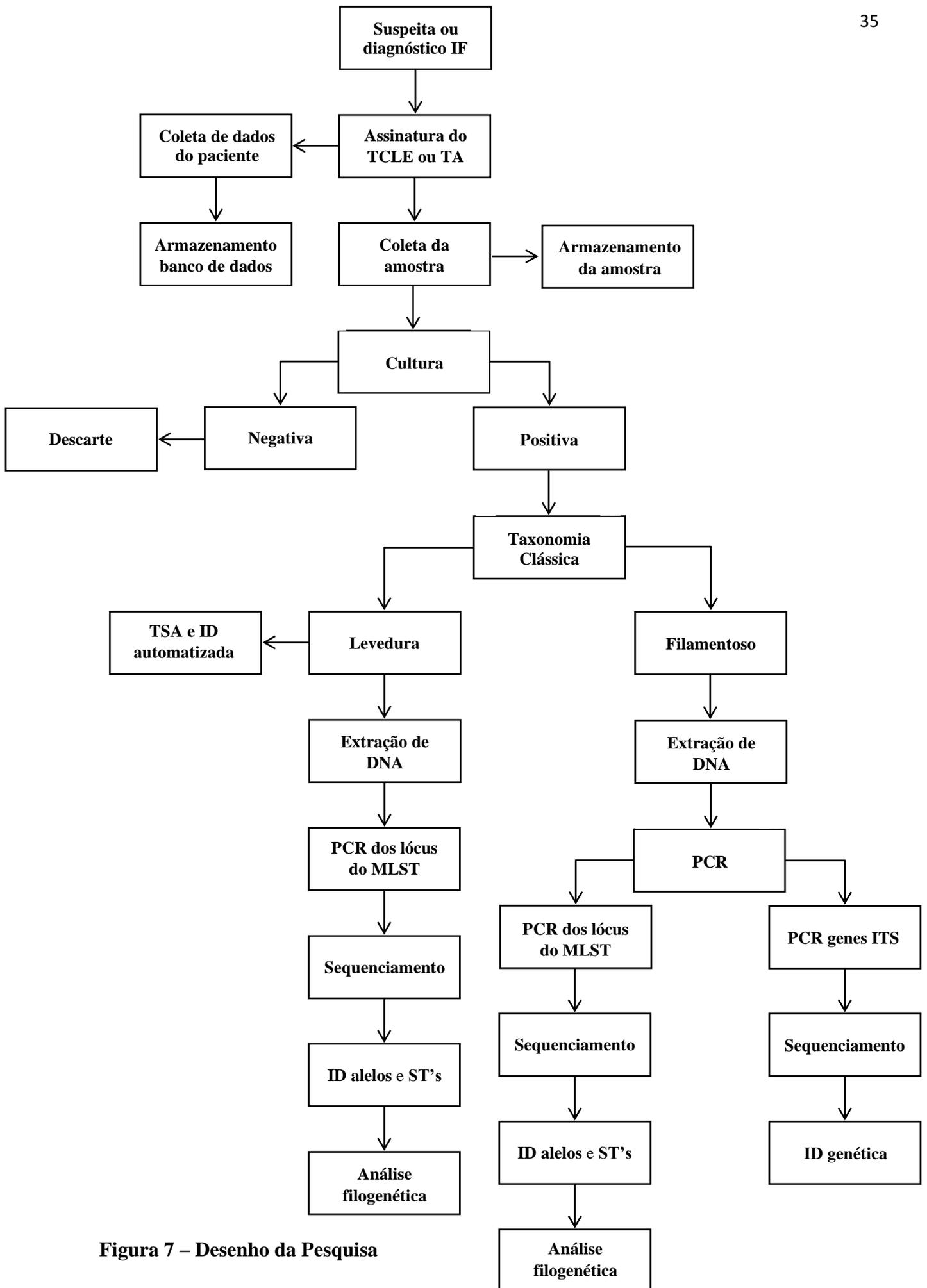


Figura 7 – Desenho da Pesquisa

3.5. Procedimentos

3.5.1. Coleta de Dados Clínicos, Epidemiológicos e Laboratoriais

A abordagem do paciente com suspeita de infecção por fungo foi realizada durante a consulta médica. Posteriormente foi feito o convite para participar do estudo e os esclarecimentos quanto aos objetivos e métodos, apresentando aos participantes da pesquisa ou a seu responsável, o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (**Anexo C**) adequado para adultos e Termo de Assentimento (TA) (**Anexo D**) para crianças.

Após esclarecimento e aceite, os mesmos ou responsáveis foram entrevistados sobre informações demográficas e socioeconômicas, como idade, naturalidade e grau de escolaridade. Para obtenção dos dados clínicos e conduta terapêutica e ocorrência de óbito, consultou-se o prontuário do paciente e o sistema iDoctor. A verificação e a inserção de novas informações sobre resultados de exames laboratoriais, foram obtidas diretamente do sistema SoftLab (**Anexo E**).

3.5.2. Coleta das Amostras

A coleta das amostras foi realizada seguindo as recomendações da Anvisa³⁴ e orientações segundo Koneman⁴¹, sendo transportadas imediatamente para o laboratório.

3.5.3. Processamento e Armazenamento das Amostras

As amostras clínicas foram semeadas em meio cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA) modificado⁶⁹ e incubadas na estufa BOD à 30 °C durante 2-30 dias. Se houvesse crescimento positivo, eram repicadas em meio de cultura específico como Malt Extract Agar (MEA), Niger Seed Agar (NSA) ou Yeast Extract Agar (YES), e incubados na estufa BOD à 30 °C durante de 2-30 dias³⁴. Em seguida, as culturas foram armazenadas em microtubos contendo meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA) líquido no freezer a -80 °C (**Anexo F**).

3.5.4. Diagnóstico Laboratorial

3.5.4.1. Identificação Clássica

A taxonomia foi realizada a partir da cultura fúngica, visualizando suas características morfológicas macroscópicas como, cor, textura, topografia, bordas, difusão do pigmento e taxa de crescimento. E para visualização das estruturas microscópicas, foi realizada a coloração de Gram e tinta nanquim, para observar a presença ou ausência de células ovais/redondas e/ou pseudo-hifas com características morfológicas sugestivas de leveduras do gênero *Candida* ou *Cryptococcus*^{70,71}. E corante azul de lactofenol-algodão para observar estruturas como hifa demácia ou hialina, septada ou cenocítica, forma, disposição e estruturas reprodutivas em que ajudam na diferenciação taxonômica à nível de gênero dos fungos filamentosos³⁴ (**Anexo G**).

3.5.4.2. Identificação Automatizada e Suscetibilidade aos Antifúngicos

Todos os fungos leveduriformes isolados foram identificados a nível de espécie e submetidos ao teste de suscetibilidade frente aos antifúngicos Anfotericina B, Flucitosina, Voriconazol, Caspofungina, Fluconazol e Micafungina, segundo método especificado para utilização do equipamento VITEK-2 Compact⁷² e os critérios de interpretação do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)^{39,40}.

3.5.5. Caracterizações Moleculares

3.5.5.1. Extração de DNA

A extração do DNA fúngico foi realizada utilizando-se o kit comercial (Kit QIAamp Tissue and Blood, Qiagen, Hilden, Germany), sendo realizados protocolos distintos dependendo do tipo fúngico (**Anexo H**) e (**Anexo I**).

A concentração e o grau de pureza do DNA extraído foi mensurado por meio de avaliação espectrofotométrica, utilizando o equipamento NanoDrop® 2000 da Thermo Scientific. Para a verificação da integridade do DNA foi realizada a técnica de eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Life Technologies) sendo visualizados e fotografados sob luz UV no sistema de foto documentação Molecular Imager® Gel Doc™ XR+

Imaging System da BIO RAD. Posteriormente, as amostras viáveis para continuidade dos experimentos foram armazenadas no freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5.5.2. Reações de PCR e Sequenciamento

A reação de PCR do gene ITS foi realizada utilizando-se os iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), segundo White et al. 1990⁷³. Para os lócus do MLST foram utilizados os protocolos descritos no site (<http://www.mlst.net>) de acordo com a espécie fúngica isolada, como *Cryptococcus neoformans* segundo Meyer et. al.⁷⁴, *Candida albicans* segundo Bounoux et. al.⁷⁵, *Candida glabrata* segundo Dodgson et. al.⁷⁶, *Candida tropicalis* segundo Tavanti et. al.⁷⁷.

Os produtos de PCR do gene ITS e lócus do MLST, foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% a 80 V por 40 minutos. Utilizou a enzima ExoSAP para hidrólise do excesso de primers e nucleotídeos não incorporados na reação de PCR amplificado, os amplicons foram purificados seguindo a recomendação do fabricante (Thermo Fisher Scientific) (**Anexo J**). E posteriormente, sequenciados utilizando o equipamento 3130/genetic analyzers (applied Biosystems Hitachi).

Tabela 3 – Concentração e volume dos componentes da PCR para amplificação do gene ITS e lócus do MLST

Componentes do mix de PCR (Concentração de estoque)	Concentração para PCR	Volume para uma concentração
Água ultrapura	-	11,5 μl
Tampão (10 X)	1 X	2,5 μl
MgCl ₂ (50 mM)	2 mM	2,5 μl
dNTP's (2 mM)	0,2 mM	5 μl
Primer senso (10 μM)	0,5 μM	0,5 μl
Primer antissenso (10 μM)	0,5 μM	0,5 μl
Taq DNA Polimerase (5 U/ μl)	1,5 U/ μl	0,5 μl
DNA molde	10 ng	2 μl
	Volume final:	25,0 μl

3.5.5.3. Análise das Sequências Nucleotídicas e Filogenia

Para o gene ITS, as sequências nucleotídicas foram analisadas com o programa BLAST, que compara as sequências obtidas com as depositadas no GenBank e fornece informações quanto à homologia entre elas, determinado o gênero e espécie.

O site MLST database (<http://www.mlst.net>), foi utilizado para comparação entre as sequências depositadas no banco de dados do referido site, e a identificação dos alelos correspondentes, para combinação desses alelos e identificação do tipo de sequência.

A construção da árvore filogenética das sequências foi realizada utilizando-se o software Geneious v10.0.10, pelo método estatístico de Neighbor-Joining, descrito por Saitou, Nei⁷⁸ modelo de distância genética de Tamura-Nei, incluindo as substituições do tipo transições mais transversões. Para a analisar a confiabilidade das estimativas das árvores, foi utilizado o método estatístico não paramétrico de Bootstrap, com percentual mínimo de 100% de replicações. Este método permite calcular as distribuições estatísticas estimadas por meio de criação repetida.

3.5.6. Análise de Dados

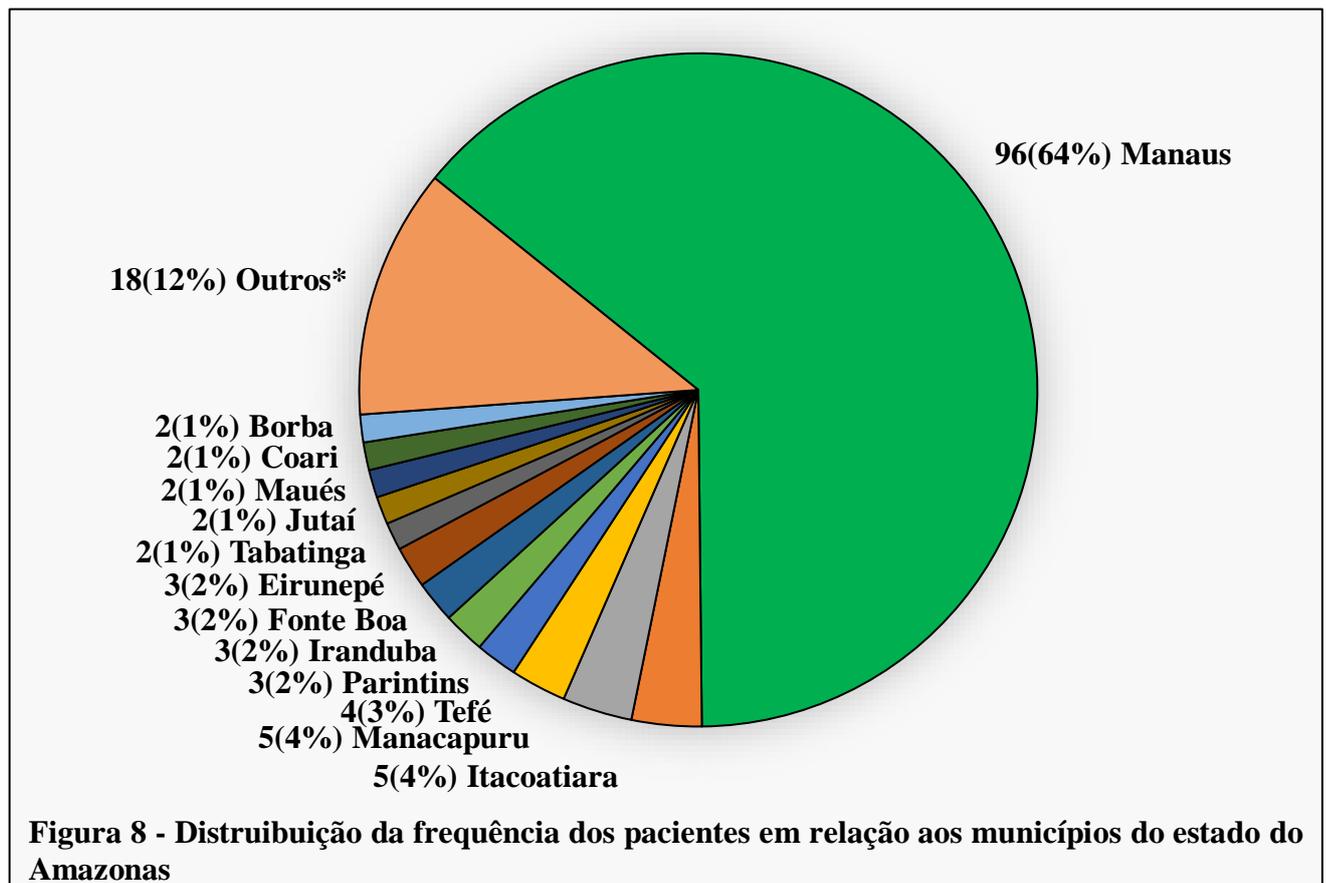
Os dados coletados foram armazenados em planilha do Excel e os resultados descritos e demonstrados através de tabelas de frequência e gráficos.

4. RESULTADOS

4.1. Aspectos Demográficos e Socioeconômicos dos Pacientes

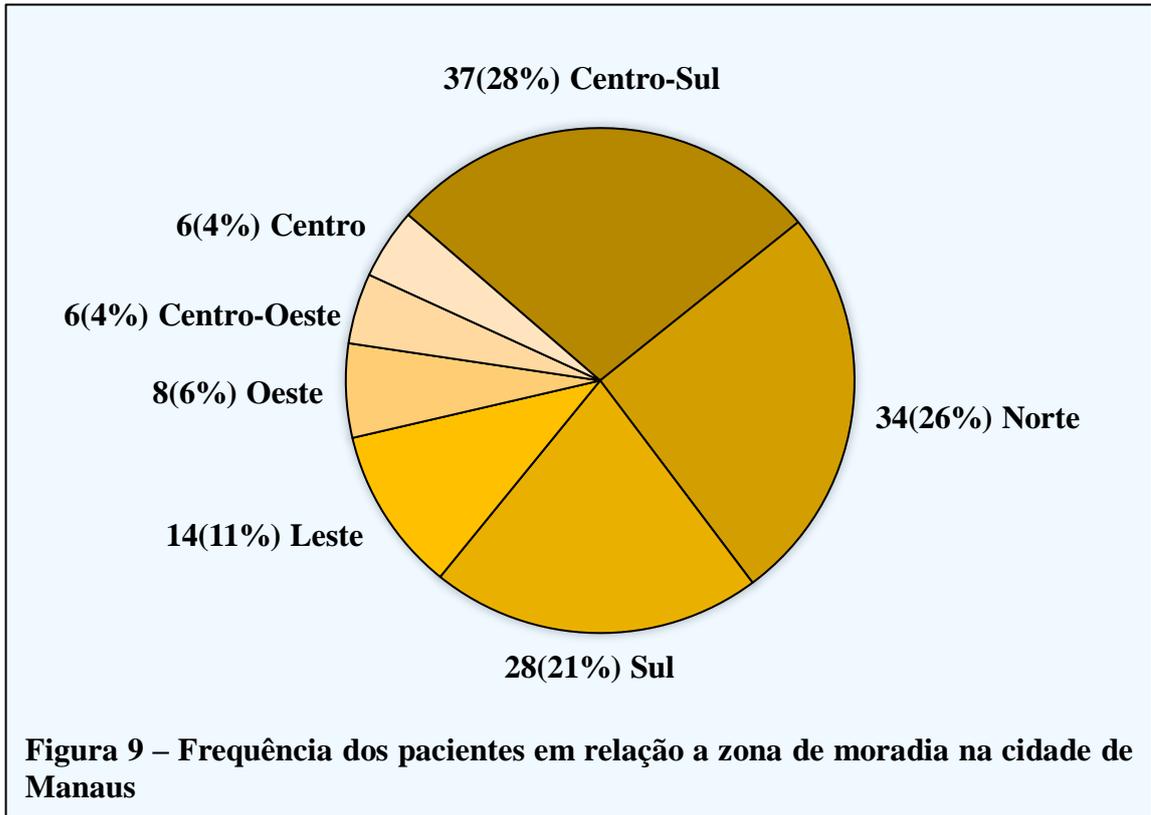
Foram atendidos, no período de novembro/2017 a outubro/2018, 162 pacientes, tendo sido obtidas 285 amostras biológicas. Dos 162 pacientes, 91 (56,2%) eram do sexo masculino e 71 (44%) feminino; a idade variou entre 2 a 83, com média de 32 anos; 106(65%) eram solteiros, 41 (25%) casados, 11 (7%) divorciados e 4 (3%) viúvos; 109 (67%) da cor parda e 53 (33%) cor branca.

Todos são de nacionalidade Brasileira e quanto a naturalidade, dos 162 pacientes incluídos, 150 (92,6%) do estado do Amazonas (**Figura 8**), 8 (5%) do Pará (Faro, Oriximiná, Alenquer, Altamira, Santarém), 1 (0,6%) do Maranhão (Pinheiro), 1 (0,6%) do Rio Grande do Sul (Tapera), 1 (0,6%) de Rondônia (Ji-Paraná) e 1 (0,6%) de Roraima (Caracará).



*Manicoré, Santo Antônio do Içá, Manaquiri, Lábrea, Canutama, Benjamin Constant, Autazes, Careiro, Pauíni, Apuí, Rio Preto da Eva, Nova Olinda do Norte, Boca do Acre, Carauari, Anamá, Tapauá, Barcelos, Tonantins.

Considerando a zona de moradia, 133 (82%) residem no município de Manaus, com predominância de 37 (28%) na zona Centro-Sul e 34 (26%) zona Sul (**Figura 9**).



Dados quanto ao grau de escolaridade revelaram que 66 (41%) não estudaram e 41 (25%) cursaram até 1^a-4^a série do ensino fundamental. O rendimento salarial familiar oscilou entre 1-3 salários mínimos com distribuição de 130 (80%) entre 0-1 salário mínimo e 32 (20%) entre 2-3 salários mínimos e 110 (68%) sem ocupação (**Tabela 3**).

Tabela 4 – Frequência quanto as condições socioeconômicas dos pacientes

Condições	Pacientes (n=162)	
	(nº)	(%)
<i>Grau de escolaridade</i>		
Sem estudo	66	41%
1 ^a -4 ^a série do EF	41	25%
5 ^a -8 ^a série do EF	26	16%
EMI	17	10%
EMC	7	5%
ESI	3	2%
ESC	2	1%
<i>Rendimento Salarial Familiar</i>		
0-1 SM	130	80%
2-3 SM	32	20%
<i>Ocupação</i>		
Sem ocupação	110	68%
Autônomo	23	15%
Aposentado	10	6%
Do lar	5	3%
Servidor Público	4	2%
Outras ocupações*	10	6%

EF (Ensino Fundamental), **EMI** (Ensino Médio Incompleto), **EMC** (Ensino Médio Completo), **ESI** (Ensino Superior Incompleto), **ESC** (Ensino Superior Completo); **SM** (Salário Mínimo); *Agricultor (3), Administrador (2), Pescador (1), Motorista (1), Estudante (1), Gerente de restaurante (1) e Advogado (1).

4.2. Aspectos Clínicos, Terapêuticos e Laboratoriais dos Pacientes

Dos 162 pacientes, 155 (96%) estavam internados e 7 (4%) foram atendidos no ambulatório. Dos pacientes diagnosticados com alguma doença hematológica, a leucemia Linfoblástica aguda foi a mais frequente com 64 casos (39%), seguida pela Leucemia Mielóide Aguda com 39 (24%). Dentre esses pacientes, 7 (22%) tinham insuficiência cardíaca (**Tabela 4**). No momento da internação, apenas o primeiro episódio de neutropenia febril 121 (75%) foram analisados. O total de 34 (21%) dos pacientes evoluíram para óbito.

Tabela 5 – Frequencia de doenças diagnósticadas nos pacientes

Tipos de Doenças	Pacientes (n=162)	
	(n°)	(%)
<i>Doença Hematológica</i>		
Leucemia Linfoblástica Aguda	64	39%
Leucemia Mielóide Aguda	39	24%
Linfoma Não-Hodgkin	16	10%
Anemia Falciforme	13	8%
Anemia Hemolítica Idiopática	10	6%
Anemia não especificada	9	6%
Leucemia não especificada	5	3%
Outras doenças hematológicas*	6	4%
<i>Outras doenças</i>		
Sem outras doenças	131	81%
Insuficiência cardíaca	10	6,2%
Hepatite B	5	3%
Diabetes mellitus	4	2,4%
Lúpus	3	1,8%
Miocardiopatia	2	1,2%
Outras comorbidades**	7	4,4%

*Trombocitemia Essencial (3), Síndrome Mielodisplásica não especificada (2) e Mieloma Múltiplo (1).

**Gastrite (1), AIDS (1), HIV (1), Hérnia de disco (1), Arritmia cardíaca (1), Insuficiência hepática (1) e Encefalite (1).

Todos os pacientes deste estudo estavam em tratamento quimioterápico, sendo que as administrações foram realizadas de forma associada e não associada, dependendo do esquema terapêutico indicado. No caso de suspeita de alguma infecção, os pacientes foram submetidos a tratamento “empírico” com antibióticos e antifúngicos (**Tabela 5**).

Tabela 6 – Frequencia quanto a terapêutica utilizada nos pacientes diagnosticados com doença hematológica e nos casos suspeitos de infecção

Medicamentos	Pacientes (nº=162)	
	(nº)	(%)
Quimioterapia		
Leucemia Linfoblástica Aguda (nº=64)		
GBTLI-2009	28	44%
GBTLI-2009+MTX+6-MP	16	25%
FLAG-IDA	9	14%
Hyper-CVAD	8	12%
FLAG	3	5%
Leucemia Mieloblástica Aguda (nº=39)		
Ara-C	16	41%
FLAG	14	36%
Ara-C+IDA	6	15%
BFM-2004	3	8%
Linfoma Não-Hodgkin (nº=16)		
R-CHOP	6	37,5%
CHOP	6	37,5%
R-FND	4	25%
Anemia Falciforme (nº=13)		
HU	10	77%
VEC	3	23%
Anemia Hemolítica Idiopática (nº=10)		
CSA+GAT	10	100%
Anemia não especificada (nº=9)		
Cbl	9	100%
Leucemia não especificada (nº=5)		
Ara-C	5	100%
Outras doenças hematológicas (nº=6)*		
Outros quimioterápicos*	6	100%
Grupo de Antibióticos e Antifúngicos**		
Beta-lactâmicos	44	27%
Aminoglicosídeos	37	23%
Antagonistas de Folato (Sulfa)	22	14%
Fluoroquinolonas	19	12%
Glicopeptídeos	13	8%
Nitroimidazol	11	7%
Azóis	9	5%
Polienos	7	4%

GBTLI-2009 (Protocolo do Grupo Brasileiro para o tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda(LLA)-2009), **GBTLI-2009+MTX+6-MP** (Protocolo do Grupo Brasileiro para o tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda(LLA)-2009+Metotrexato+Mercaptopurina), **FLAG-IDA** (Fludarabina, Citarabina, G-CSF, Idarrubicina), **Hyper-CVAD** (Metotrexato, Citarabina), **FLAG** (Fludarabina, Citarabina, G-CSF), **Ara-C** (Citarabina), **Ara-C+IDA** (Citarabina+Idarrubicina), **BFM-2004** (Protocolo do Grupo Europeu Berlim-Frankfurt Münster para o tratamento da Leucemia Mieloblástica Aguda(LMA)-2004), **R-CHOP** (Rituximabe, Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina, Prednisona), **CHOP** (Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina, Prednisona), **R-FND** (Rituximabe, Fludarabina, Mitoxantrona, Dexametasona), **HU** (Hidroxiureia), **VEC** (Vincristina), **CSA+GAT** (Ciclosporina+Imunoglobulina Antitímócito), **Cbl** (Cobalamina), **AZA-CR** (Azacitidina), **CTD** (Ciclofosfamida, Talidomida, Dexametasona); *Trombocitemia Essencial (3)- HU (3), Síndrome Mielodisplásica não especificada (2)- AZA-CR (2) e Mieloma Múltiplo (1)- CTD (1); **Utilizados em pacientes com suspeita ou com diagnóstico laboratorial de processo infeccioso bacteriano ou fúngico.

Do total das 285 amostras coletadas para exames microbiológicos, 241 (84,5%) hemocultura 39 (13,75%) urina, 2 (0,70%) pele, 1 (0,35%) medula óssea, 1 (0,35%) escarro, 1 (0,35%) secreção de cateter. Na **Tabela 6**, observa-se os resultados dos exames laboratoriais e realizados nos pacientes com doença hematológica onde 100% dos 285 apresentaram hematócrito com valor fora da anormalidade, assim como a creatinina com 62% (178).

Tabela 7 – Exames laboratoriais realizados nos pacientes e a frequência quanto aos resultados de normalidade e a anormalidade – primeira amostra

Variáveis	Amostra (nº=285)	
	(nº)	(%)
<i>Exame de Hemograma</i>		
Hematócrito		
VN	0	0%
VA	285	100%
Leucograma		
VN	35	12%
VA	250	88%
Contagem de Plaquetas		
VN	164	58%
VA	121	42%
<i>Exame Bioquímico</i>		
Creatinina		
VN	107	38%
VA	178	62%
Bilirrubina		
VN	130	46%
VA	155	54%
Lactato		
VN	145	51%
VA	140	49%

VN (Valor Normal), VA (Valor Anormal)

4.3. Dados dos isolados fúngicos e Pacientes ou Pacientes

Dos 162 pacientes com suspeita de processo infeccioso, 30 (18,51%) apresentaram infecção por espécies de fungos onde 13 (39,39%) de espécies de *Penicillium* spp. foram isoladas de 12 (36,36%) amostras de Hemocultura. As espécies fúngicas isoladas, o tipo de amostra biológica e a doença hematológica correlacionada, encontram-se descritos na **Tabela 7**.

Tabela 8 – Espécies fúngicas isoladas e identificadas nas amostras biológicas de pacientes com doenças hematológicas

Levedura (nº=13)	Amostra Biológica (nº=13)	Doença Hematológica (nº=11)
<i>Candida albicans</i>	Hemocultura	Anemia Hemolítica Idiopática
<i>Candida albicans</i>	Pele	Trombocitemia essencial
<i>Candida famata</i>	Hemocultura	Leucemia Mieloblástica Aguda
<i>Candida famata</i>	Hemocultura	Leucemia Linfoblástica Aguda
<i>Candida glabrata</i>	Urocultura	Leucemia Linfoblástica Aguda
<i>Candida glabrata</i>	Escarro	Linfoma Não-Hodgkin
<i>Candida guilliermondii</i>	Hemocultura	Leucemia Mieloblástica Aguda
<i>Candida parapsilosis</i>	Pele	Leucemia Linfoblástica Aguda
<i>Candida parapsilosis</i>	Hemocultura	Leucemia Linfoblástica Aguda
<i>Candida parapsilosis</i>	Secreção de cateter	Leucemia Mieloblástica Aguda
<i>Candida tropicalis</i>	Hemocultura	Leucemia Linfoblástica Aguda
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Medula óssea	Leucemia Mieloblástica Aguda
Filamentosos (nº=20)	Amostra Biológica (nº=20)	Doença Hematológica (nº=20)
<i>Aspergillus</i> spp	Hemocultura	Leucemia Linfoblástica Aguda
<i>Aspergillus</i> spp	Hemocultura	Leucemia Linfoblástica Aguda
<i>Aspergillus</i> spp	Hemocultura	Leucemia Linfoblástica Aguda
<i>Aspergillus</i> spp	Hemocultura	Anemia Falciforme
<i>Aspergillus</i> spp	Hemocultura	Anemia Falciforme
<i>Aspergillus</i> spp	Urocultura	Anemia não especificada
<i>Penicillium</i> spp	Hemocultura	Leucemia Mieloblástica Aguda
<i>Penicillium</i> spp	Hemocultura	Leucemia Mieloblástica Aguda
<i>Penicillium</i> spp	Hemocultura	Leucemia Mieloblástica Aguda
<i>Penicillium</i> spp	Urocultura	Leucemia Mieloblástica Aguda
<i>Penicillium</i> spp	Hemocultura	Leucemia Linfoblástica Aguda
<i>Penicillium</i> spp	Hemocultura	Leucemia Linfoblástica Aguda
<i>Penicillium</i> spp	Hemocultura	Leucemia Linfoblástica Aguda
<i>Penicillium</i> spp	Hemocultura	Leucemia Linfoblástica Aguda
<i>Penicillium</i> spp	Hemocultura	Leucemia Linfoblástica Aguda
<i>Penicillium</i> spp	Hemocultura	Anemia Falciforme
<i>Penicillium</i> spp	Hemocultura	Anemia Hemolítica Aguda
<i>Penicillium</i> spp	Hemocultura	Anemia não especificada
<i>Penicillium</i> spp	Hemocultura	Mieloma Múltiplo
<i>Penicillium</i> spp	Hemocultura	Síndrome Mielodisplásica não especificada

A **Tabela 8** demonstra os resultados dos testes de suscetibilidade realizados nas espécies de leveduras com os respectivos valores de MIC. Conforme padrão interpretativo do CLSI Manual CLSI M-27-A3; M27-S4 (2008), a maioria dos isolados fúngicos apresentaram-se dentro da faixa sensível frente aos antifúngicos testados, não detectando nenhum gene de resistência. Apenas dois isolados de *Candida glabrata* apresentam sensibilidade reduzida ao Fluconazol.

Tabela 9 – Teste de suscetibilidade realizado nas espécies de leveduras isoladas de pacientes com doenças hematológicas

Leveduras	Antifúngicos (MIC)						
	FCL		VRC	CASP	MICA	AMB	5-FC
	S ($\leq 2\mu\text{g/mL}$)	SR ($4\mu\text{g/mL}$)	S ($\leq 0,125\mu\text{g/mL}$)	S ($\leq 0,25\text{g/mL}$)	S ($\leq 2\text{g/mL}$)	S*	S ($\leq 4\mu\text{g/mL}$)
<i>Candida albicans</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>Candida albicans</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>Candida famata</i>	*	*	*	*	*	*	*
<i>Candida famata</i>	*	*	*	*	*	*	*
<i>Candida glabrata</i>	S	4.0	S	S	S	S	S
<i>Candida glabrata</i>	S	4.0	S	S	S	S	S
<i>Candida guilliermondii</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>Candida parapsilosis</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>Candida parapsilosis</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>Candida parapsilosis</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>Candida tropicalis</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>Cryptococcus laurentii</i>	*	*	*	*	*	*	*
<i>Cryptococcus neoformans</i>	-	-	-	-	-	S	-

MIC (Concentração Inibitória Mínima); **S** (Sensível), **SR** (Sensibilidade reduzida); **FCL** (Fluconazol), **VRC** (Voriconazol), **CASP** (Caspofungina), **MICA** (Micafungina), **AMB** (Anfotricina B), **5-FC** (Flucitosina); * (Espécie/antifúngico sem ponto de corte); - (Teste não realizado pelo equipamento).

Os resultados relacionados a identificação à nível de espécie dos fungos filamentosos, e genotipagem das leveduras e fungos filamentosos a partir de metodologias como *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) para definir os sequences types (STs) e ancestral comum dos isolados clínicos e construção de árvore filogenética, ainda estão sendo executados e serão analisados e inseridos posteriormente em um segundo artigo envolvendo essas espécies isoladas.

Todavia, tais procedimentos foram realizados com a única cepa de *Cryptococcus neoformans* isolada, e os respectivos dados encontram-se no Artigo abaixo, submetido ao periódico internacional SCIENTIFIC REPORTS, Qualis A1 (**Anexo K**).

4.4. Artigo

Molecular epidemiology of a new ST623 from *Cryptococcus neoformans*, isolated from a Patient with Hodgkin's Lymphoma at a Hematology Center in Amazonas-Brazil

Authors: Lucyane Mendes Silva^{1,2}, Roberto Alexandre Alves Barbosa Filho³, William Antunes Ferreira^{2,4}, Maria de Nazaré Saunier^{1,2}, Guilherme Motta Antunes Ferreira^{1,2}, Marielle Machado Macedo^{1,2}, Denise de Almeida Cristo^{1,2}, Marla Jalene Alves⁵, Ani Beatriz Jackisch-Matsuura⁵, Cristina Motta Ferreira^{1,2}.

Authors:

LUCYANE MENDES SILVA. ¹Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas–HEMOAM. ²Universidade do Estado do Amazonas-UEA. Manaus, AM, Brasil.

ROBERTO ALEXANDRE ALVES BARBOSA FILHO. ³Universidade Federal do Amazonas- UFAM. Manaus, AM, Brasil.

WILLIAM ANTUNES FERREIRA.⁴Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta-FUAM. ²Universidade do Estado do Amazonas-UEA. Manaus, AM, Brasil.

MARIA DE NAZARÉ SAUNIER. ¹Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas–HEMOAM. ²Universidade do Estado do Amazonas-UEA. Manaus, AM, Brasil.

GUILHERME MOTTA ANTUNES FERREIRA. ¹Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas–HEMOAM. ²Universidade do Estado do Amazonas-UEA. Manaus, AM, Brasil.

MARIELLE MACHADO MACEDO. ¹Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas–HEMOAM. ²Universidade do Estado do Amazonas-UEA. Manaus, AM, Brasil.

DENISE DE ALMEIDA CRISTO. ¹Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas–HEMOAM. ²Universidade do Estado do Amazonas-UEA. Manaus, AM, Brasil.

MARLA JALENE ALVES. ⁵Instituto Leônidas e Maria-Deane. FIOCRUZ, Manaus, AM, Brasil.

ANI BEATRIZ JACKISCH-MATSUURA. ⁵Instituto Leônidas e Maria-Deane. FIOCRUZ, Manaus, AM, Brasil.

CRISTINA MOTTA FERREIRA. ¹Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas–HEMOAM. ²Universidade do Estado do Amazonas-UEA. Manaus, AM, Brasil.

Abstract

Cryptococcosis is a disease of wide geographic distribution. It is most critical when it affects immunocompromised patients, with AIDS, tuberculosis or other diseases that require prolonged hospitalization. The molecular epidemiology is described, along with the phylogenetic relationships and the population of a new ST from *C. neoformans* (ST 623), isolated from an infection in a patient with Hodgkin's Lymphoma, with several complications that contributed to death from the disease. The antifungal susceptibility test for fluconazole, amphotericin B and flucytosine, MLST, the phylogenetic relationship and population analysis were performed. A new genotype from *C. neoformans* ST623 was identified, circulating in the city of Manaus. The neutrality test indicated that, except for the *SOD1* region, all other MLST regions are undergoing non-stochastic selection. *C. neoformans* is one of the most important agents of cirrhosis in Amazonas. In this study, the ST623 identified in a patient with Hodgkin's lymphoma is a new finding for the Amazon region and for the world. The analyzed populations presented the genotypes from Germany as a common ancestor. The MLST genes are undergoing non-stochastic selection, by selective pressure, environmental or drug use, thus favoring the emergence of new future variants of this species.

Key-words: Filogeny, *C. neoformans*, MLST, Hodgkin disease, ST623

Introduction

Cryptococcosis is a serious disease possessing a wide geographic distribution, with a global estimate of 223,100 cases of cryptococcal meningitis globally, including approximately 1624,700 deaths.¹ The annual incidence of cryptococcosis was 6.6 cases per million person in Australia, and a mortality rate more than 70% in the regions of sub-Saharan Africa.^{1,2,3} In Latin America, there are records of 2,400 deaths per year. In countries like Colombia, the annual incidence is 2.4 / cases / 10⁶ inhabitants, while in HIV-positive patients, the incidence rises to 3,000 cases / 10⁶ inhabitants. In Mexico, the prevalence in patients with immunosuppression caused by different diseases is 21%; while in Venezuela it is 19%, rising to 27% in the HIV population; in Argentina about 20%⁴. In the city of Rio de Janeiro, Brazil, the annual incidence of cryptococcal meningitis is 0.45 cases / 10⁶ inhabitants, while in northeastern Brazil, it is considered endemic.⁵ Data from the Brazilian Ministry of Health show an annual incidence of 7,000 cases of cryptococcal meningoencephalitis.⁶

This disease is an opportunistic mycosis caused by two types of complexes called *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*,⁷ classified into four subtypes: VNI-VNII, VNIII, VNIV and VGI, VGII, VGIII, VGIV⁸ frequently isolated from bird excreta and tree hollows, penetrating the human host by inhaling infectious propagules,⁹ or through injured skin, causing different infections such as pulmonary cryptococcosis, nodules on the skin or, in some cases, hematogenous dissemination, causing meningitis and cryptococcal fungemia.^{3,7,10,11,12}

This infection is more severe when it affects immunocompromised patients, transplant patients with hepatic cirrhosis, AIDS, tuberculosis or other diseases requiring prolonged hospitalization,^{7,9,10,11} however, infectious conditions in immunocompetent patients may also occur.³

As it is considered an opportunistic mycosis, but severe in certain patients, the availability of more sensitive tests for an enhanced routine laboratory diagnosis and treatment efficacy are indispensable for the proper control and monitoring of cryptococcosis. This paper describes the molecular epidemiology, the phylogenetic relationships and population of a new ST from *C. neoformans* (ST 623), isolated from an infection in a patient with Hodgkin's Lymphoma, with several complications that contributed to the course of the disease to death.

Case Report

Chronological evolution

The events described below occurred between June 2016 and November 2017.

JMR, male patient, 72 years old; illiterate; married; place of birth: Careiro do Várzea Amazonas; occupation: retired farmer; resident in Manaquiri, Amazonas-Brazil, currently living in the city of Manaus-AM, with his own residence of masonry and basic sanitation (piped water, electricity, garbage collection); with a family history of heart disease (mother); denies smoking; denies alcoholism; denies previous transfusions. In **June 2016**, he reported that he observed a tumor approximately 4 cm in diameter in the occipital region, among others distributed diffusely throughout the body. Seven months later, on **01/2017**, he sought care at the State Center of Reference in Dermatology - "Alfredo da Mata" Foundation; where a posterior cervical lymph node biopsy was performed and the Immunohistochemistry (IHC) was diagnosed as a marginal zone lymphoma. During the same period, an abdomen scan was

ordered, and he was referred to the Foundation Hospital of Hematology and Hemotherapy Blood Center of Amazonas (HEMOAM), a reference center for Onco-hematologic Diseases. On the twelfth day of June of the same year, the patient presented: abdominal computed tomography (TC Abd): cervical region with expansive / infiltrative lymph node mass, determining almost complete thrombosis of the left internal jugular vein + pulmonary emphysema + multiple mediastinal and axillary lymph node enlargement involving visceral level and left internal mammary chain, retroperitoneal and mesenteric, inguinal, thoraco-lumbar and internal jugular vein thrombosis E (tumor compression); Hepatitis C (HCV) reagent. On **06/05/2017**, he was treated at HEMOAM with generalized pruritus symptom and palpable liver (4 cm below the costal ridge border - RCD). He was medicated with antihistamine and antipruritic. On **07/06/2017**, after consultations with hematologists, blood tests were performed, complementary to the diagnosis to start chemotherapy of **LYMPHOMA**.

He started the chemotherapy protocol for **MARGINAL ZONE LYMPHOMA** Cluster of differentiation (CD) 20(+), Cancer Staging III, weight loss greater than 10% (**EC IIIA**) on **08/08/2017** and still complained of generalized pruritus, which led to the antihistaminic and antipruritic exchange. On day **08/22/2017**, still under chemotherapeutic treatment, he continued to report diffuse pruritus, with no improvement factors. The presence of red pruritic spots on the entire pelvic and inner thigh regions was evidenced. Despite the improvement in tumors, the presence of a palpable mass in the right submandibular region remained.

Between **09/17/2017** and **09/19/2017**, still under the chemotherapy protocol for lymphoma, the patient presented a fever (37.5°C), coryza and sneezing and elevation of transaminases with rates three times above normal limits. In the fourth cycle of chemotherapy performed on **10/10/2017**, there was improvement of paresthesia and pruritus. Subsequently, on **10/23/2017**, he attended the HEMOAM emergency room reporting weakness, a febrile peak of 38°C, vertigo, lack of appetite, nausea and epigastralgia. Blood tests: Hemoglobin (Hb): 12.6; Hematocrit (Ht) 36.8°C; platelet: 101,000; neutrophil: 9.8; leucocyte: 2490. Diagnostic hypothesis: febrile neutropenia (aplasia after chemotherapy). The patient was admitted for parenteral treatment with the antibiotics cefepime + clarithromycin. Due to his worsening clinical condition, he was transferred to Hospital Universitário Getúlio Vargas in Manaus (HUGV) on **11/06/2017**; remaining in the ward, with clinical evolution of: Bacterial pneumonia + Neurological syndrome (seizure absence? + disorientation + cognitive alteration) + Hydroelectrolytic disturbance (hypokalemia) + Intestinal constipation + Plaquetopenia. Cefepime and Clarithromycin therapy was discontinued, substituted by the antibiotic

Meropenem. From 11/07/2017 to 11/09/2017, the clinical condition evolved to cardio-respiratory arrest in Asystole, followed by resuscitation and transferred to the Intensive Care Unit (ICU); still critical under antibiotic therapy, another cardiac arrest on 11/09/2017 due to respiratory septic shock, culminating in **DEATH**.

Materials and Methods

Sample collection

Three hemoculture samples from peripheral blood were collected from the patients and incubated for 5 days at 35°C in BACT-ALERT (bioMerieux, Inc) in October 2017 during his stay at the HEMOAM-Manaus-AM Foundation, a reference center in the northern region of the country, which treats patients with benign or malignant hematological diseases.

Ethics Statement

This study was approved by the CEP/HEMOAM Foundation Human Research Ethical Committee (CAAE N° 73548017.5.0000.0009). Patients and a parent or guardian of any child participant enrolled in the study provided their written informed consent, before specimens were collected and the results and data were used for the management of each respective patient.

Cultivation, identification and antifungal susceptibility test

Following the positive blood culture, the subculture of the fungus was carried out in modified Sabouraud dextrose agar medium and later in the media of canothothin-glycine blue bromothymol (CGB) and Niger Seed Agar for species differentiation.¹³ The identification, susceptibility test and minimum inhibitory concentration (MIC) values for the antifungal fluconazole agents, amphotericin B and flucytosine were performed by an automated method using the VITEK-2 Compact equipment (bioMerieux, Brazil), according to the manufacturer's recommendation. Aliquots of the samples were stored at -80°C for further molecular testing.

Characterization of the MLST alleles

The DNA of *C. neoformans* was extracted from colonies recovered in the Sabouraud liquid medium, using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The molecular type of the fungus was determined applying the enzymatic restriction protocol (PCR-RFLP) according Martins et al.⁹ The analysis of Multilocus Sequence Typing (MLST) was performed utilizing the seven housekeeping genes (*CAP59*, *URA5*, *IGS1*, *PLB1*, *SOD1*, *GPD1*, *LAC1*) for *C. neoformans*, according to the site protocol (<http://mlst.mycologylab.org/>). Sequencing was executed employing the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific), on the automated ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The Geneious v.11 software was used for bioinformatics and sequencing product analysis, and the results were compared to the genomic DNA sequences deposited in the site database (<http://mlst.mycologylab.org/>).

Procedures for phylogenetic relationships and population analyses

Sequences of the MLST genes from *C. neoformans* isolated from the patients were compared with other sequences deposited in the NCBI Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), described in previous studies conducted in Brazil,^{6, 14} and populations of *C. neoformans* identified in Europe and Asia,^{15,16} totaling 498 samples described in Fig.1, of which 164 were selected by simple random sampling without replacement, with a margin of error of 6.27%, and 95% confidence level for analysis. Information on sample collection sites, allele data and MLST genotypes of each was obtained from the supplemental materials of the articles.

Editing and multiple alignment of MLST allele Sequences

The nucleotide sequences of the seven alleles of the 164 samples were edited and aligned by the MEGA X program using the MUSCLE tool.^{17,18} For the reconstruction of phylogenetic relationships, the aligned sequences of the seven MLST alleles were concatenated. For the Tajima neutrality test,¹⁹ the alignment of each allele was done separately.

Reconstruction of the Phylogenetic relationships

For the characterization of the phylogenetic relationships, the UPGMA method was utilized,²⁰ in which the concatenated sequences of the seven genes were inferred from a distance matrix constructed by the Kimura-2-parameter method, with gamma distribution and 1000 resampling for the bootstrap statistical test.^{21,22} The selection of the applied methods and reconstruction of the phylogeny were performed using the MEGA X program.

Tajima Neutrality Test

After alignment of the sequences of each MLST gene, the Tajima neutrality statistical test was performed with 1000 replicates with the DnaSP 6 softwares, in order to verify if the alleles evolved in a stochastic manner or underwent some form of selection.^{19,23}

Results

The automated microbiological and susceptibility testing, performed after collection of the first blood sample, identified a clinical isolate of *C. neoformans* and showed that the fungus was sensitive to antifungals tested, with MICs of 1 µg/mL for fluconazole, 2 µg/mL for flucytosine and MIC of 0.5µg/mL for amphotericin. The molecular analysis performed by the PCR-RFLP protocol, identified the molecular type VNI, and comparative analyzes with the sequences deposited on the MLST website, made it possible to identify a new clone of *C. neoformans*, the ST623 circulating in the city of Manaus and most likely throughout the state. The GenBank accession number of the *C. neoformans* allele, from our study, are MN065812, MN065813, MN065814, MN065815, MN065816, MN065817, MN065818.

MLST and Phylogenetic analysis

The comparative analysis of the MLST genes of the fungus in a study with sequences deposited in the site database, allowed the identification of a new genotype of *C. neoformans*, ST623, circulating in the city of Manaus. In counting the genotypes by population where the new ST was inserted, along with those described by other authors from other regions and countries, it was possible to observe the predominance of ST93 in the state of Amazonas and Minas Gerais, whereas ST4 in Thailand and ST5 in China (Table 1).

Table 1. Genotype count (STs) per analyzed group

Groups	ST																Total per group*
	2	4	5	6	23	31	39	53	63	69	71	77	93	177	192	623	
Amazonas													32			1	33
China			22					1					1				24
Germany			3		6												9
India	1		1		3							4	8				17
Indonesia	2		2						1					2			7
Japan			8														8
Kuwait					1				1			1		1			4
Minas Gerais					2	1	2		2		1		21				29
Myanmar			1														1
Rio de Janeiro	1																1
Roraima													1				1
Thailand		30															30
Total per ST*	1	33	34	3	9	4	2	1	2	2	1	4	64	2	1	1	164

In the phylogenetic tree (Figure 1), the main groups are highlighted, including the large populations mentioned above and the ST5 and ST23 genotypes (yellow) from the German population, which form the ancestral group of the other populations analyzed. The ST93 genotype forms a monophyletic group with its closest ancestor, genotype 177. A proximity relation was detected between the ST623 genotype identified at HEMOAM in Manaus-AM (black arrow) and the ST53 and ST5 genotypes (red).

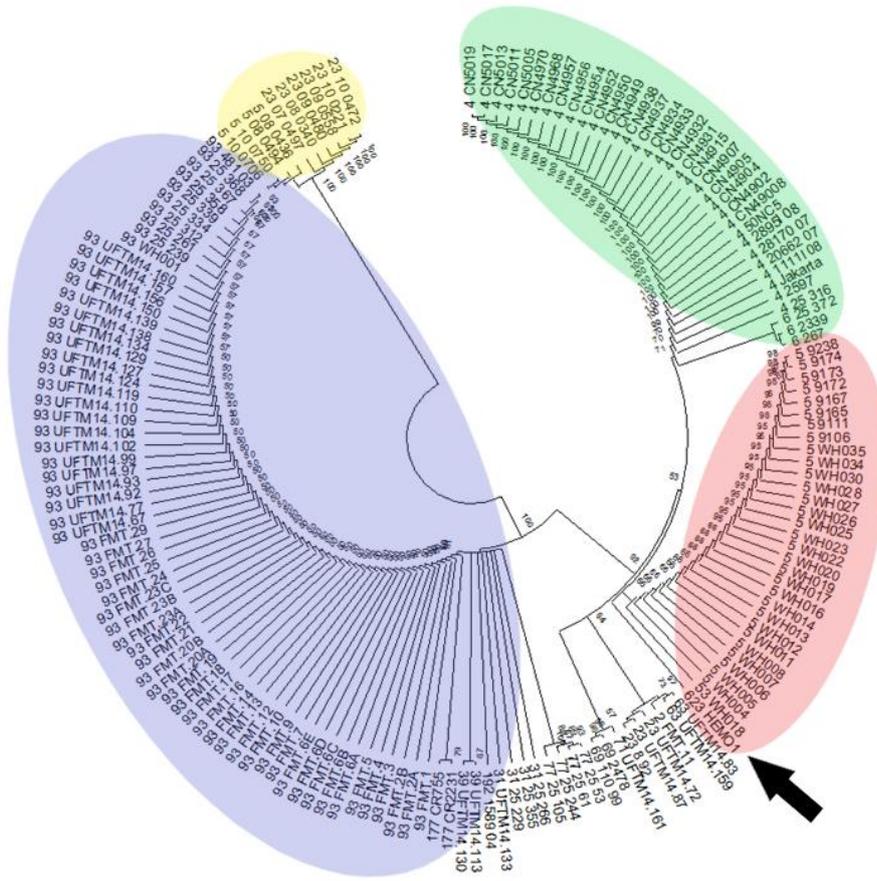


Figure 1. Phylogenetic relationships of the MLST genes between the different STs of the analyzed populations

The Tajima neutrality test (Table 2) indicates that, except for *SOD1* (non-genetic variability) in the MLST region, the rest (*CAP53*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1* and *URA5*) are undergoing some form of non-stochastic selective pressure, favoring the emergence of new variants.

Table 2. Nucleotide frequencies and their components associated with the Tajima neutrality test for each MLST gene

Gene	Percentage of nucleotides				Size (n)	Variable sites (S)	S/n (Ps)	Θ	π	Tajima's D test
	A	C	G	T						
<i>CAP53</i>	23.2	26.9	25.1	24.8	615	193	0,31	0,056	0,016	-2,309
<i>GPD1</i>	24.1	23.2	22.3	30.4	553	51	0,09	0,016	0,011	-0,908
<i>IGS1</i>	25.9	14.7	30.5	28.9	724	13	0,02	0,003	0,007	3,131
<i>LAC1</i>	26.7	23.9	21.2	28.1	476	48	0,10	0,018	0,012	-1,034
<i>PLB1</i>	24.1	23.2	22.3	30.4	533	40	0,08	0,016	0,011	-0,908
<i>SOD1</i>	21.8	33.8	20.7	23.7	536	0	0,00	0,000	0,000	n/c
<i>URA5</i>	23.1	26	25	25.9	725	262	0,36	0,064	0,020	-2,219

OBS: **A, C, G e T** are the percentage for each nucleotide in the genes in question. **Size (n)** corresponds to the total number of sites of each gene. **Variable sites (S)** correspond to sites that showed nucleotide changes during alignment. The **S** corresponds to the ratio S/n. Θ corresponds to $Ps/a1$. π corresponds to nucleotide diversity. **Statistic D of Tajima** corresponds to the reference parameter to verify the neutral theory of evolution for each gene. All values of Tajima Statistic D presented statistical significance $P < 0.01$. Values above zero suggest that the population has been subjected to balancing selection or a recent population bottleneck. Values below zero suggest population expansion or directional selection.

Graph 1 and Table 3 shows the selection of alleles in the studied populations (values below zero), since the most frequent ones are present in the most common genotypes. Overall, sixteen different ST genotypes were identified from a total of 164 sequences analyzed. These results may influence the diagnosis of genotyping based on these regions, since the number of alleles of regions with $D < 0$ tends to decrease after a few generations.

Graphic 1. Frequency of the ST genotypes identified in the analyzed populations with the associated trend line

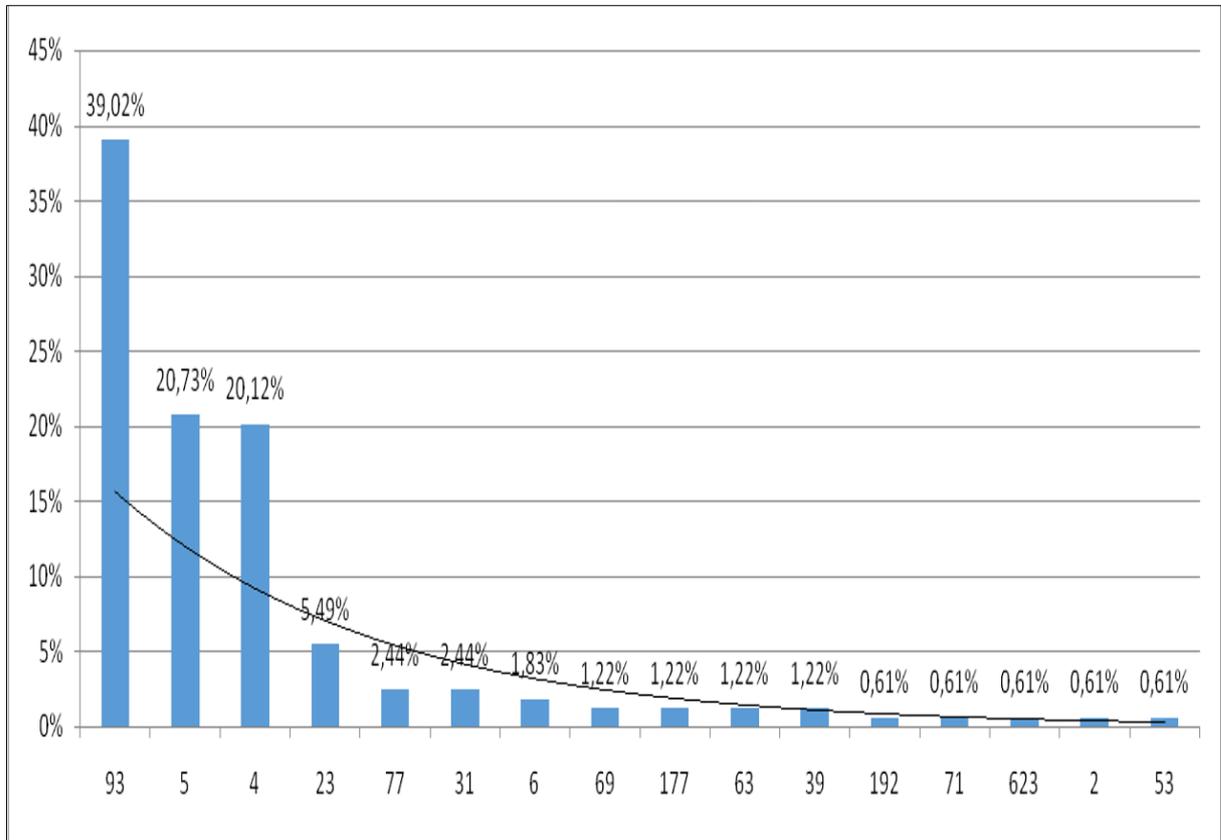


Table 3. Relationship between allele counts and ST genotype in the analyzed population

Alleles	ST															Total per allele	
	2	4	5	6	23	31	39	53	63	69	71	77	93	177	192		623
CAP53																	
1		33	34	3		4	2	1				4	64	2	1	1	149
7	1				9				2	2	1						15
GPD1																	
1	1	33		3	9	4	2		2			4				1	59
3			34					1									36
5									2	1							3
23													64	2			66
IGS1																	
1	1	33	30	3	3			1	2	2	1					1	77
10						4							64	2			70
11							2										2
19			4		6												10
25												4					4
59															1		1
LAC1																	
1	1															1	2
2					9												9
3				3		4	2	1		2	1	4	64	2	1		84
4		33															33
5			34														34
18									2								2
PLB1																	
1	1				9				2								12
2		33	34	3		4		1				4			1	1	81
3										2							2
4							2				1		64	2			69
SOD1																	
1	1	33	34	3	9	4	2	1	2	2	1	4	64	2	1	1	164
URA5																	
1			34			4	2	1	2	2	1	4	64		1	1	116
2	1				9												10
5		33		3										2			38
Total per ST	1	33	34	3	9	4	2	1	2	2	1	4	64	2	1	1	Total: 164

Discussion

In the last decades there has been a significant increase in cases of fungal infections in hospitals, especially in immunodeficient patients.^{24,25,26,27} Although cryptococcosis is most commonly detected in HIV-positive patients, this infection has been discovered in about 9% of patients with hematological malignancies and 18% in transplanted patients.²⁸ In patients with underlying disease, such as lymphoma or other immunosuppression, these infections often cause death, due to the delay in the clinical diagnosis of the disease because of asymptomatic periods and symptoms indistinguishable from this infection.^{29,30}

Patient with hematological diseases treated at HEMOAM, attributable to their underlying disease, are frequently submitted to chemotherapy, which substantially compromises their innate immune system. This makes them more susceptible to infections, including those caused by fungi, which contribute to a delay in therapeutic treatment leading to death²⁹ often due to their nonspecific clinical presentation and lack of well-defined diagnostic criteria³¹ for prophylaxis and empirical therapy.²⁵

Another important aspect that requires attention is the risk factors that contribute to the infection of *C. neoformans*. In general, they are related to long-term hospitalization and prolonged antibiotic therapy, treatment with corticosteroids,³² diabetes, sarcoidosis, Hodgkin's disease, other malignancies (lymphomas, leukemias, multiple myeloma), systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and transplants,^{30,33} coupled with the fact that some fungal infections are difficult to eradicate, persisting in the host.^{29,25,32} The isolate of *C. neoformans* ST623 from this study showed sensitivity to antifungals, resembling other studies conducted in our region, whose *C. neoformans* isolates have not yet shown resistance.⁶ However, although the isolate in this study showed sensitivity to antifungals, as a result of a series of complications, the patient died.

Currently, studies confirm that *C. neoformans* VNI has been responsible for 90% more cases of cryptococcosis associated with HIV patients in Latin America.⁴ In the state of Amazonas, it is one of the most important agents of cryptococcosis.⁶ The ST623 genotype from *C. neoformans* VNI, identified in this study in a patient with Hodgkin's lymphoma, is a new finding for the Amazon region and for the world.

Some *C. neoformans* genotypes are more prevalent in immunosuppressed patients and in environmental samples, such as ST93 and ST77.^{6,14} ST93 has been frequently reported in different countries, such as Indonesia, India, Uganda and Brazil, mainly in the northern region,

while ST5 in Asia.^{6,14} Various reports state that this wide dispersion in different continents may have been facilitated by pigeons.^{14,34,6,13,33} ST2 has been prevalent in Germany and reported in other countries such as Africa, Argentina and the United States. This genotype has also been reported in Brazil, both in the state of Amazonas and in Minas Gerais.⁶

In relation to the phylogeny, it is observed that the sequences identified as the ST93 genotype come from several different populations and form a monophyletic group having genotype 177 as the closest ancestral group. The topology of the tree also suggests an ancestry relationship of this group with the ST39 genotype.

The monophyletic group formed by the ST4 genotypes (green - Figure 1) from India, Indonesia and Thailand, presents the ST6 genotype group as the closest common ancestor. The ST5 genotypes from the populations of China and Japan form a monophyletic group among themselves (red - Figure 1), with the ST53 genotype as the closest common ancestor. Although not well-defined by the phylogenetic tree, there is a close proximity between the ST623 genotype, found in Manaus-AM (black arrow) and the ST53 and ST5 genotypes. The ST2 genotype, from Rio de Janeiro, forms a monophyletic group with ST23 and ST63 genotypes from Minas Gerais.

The discovery of the new ST623 reflects the selective pressure that the species of *C. neoformans* has been suffering as well as providing not only the appearance of new genotypes but an increased frequency of certain genotypes and in the species population as well. However, new studies are needed to examine how it is spreading among the Amazon population, or whether there are other new genotypes circulating that have not yet been discovered. Phylogenetic analysis also suggests that ST623 has descended from genotypes of Chinese origin, after the appearance of the other Amazonian genotypes analyzed. In addition, the phylogenetic distance between the German genotype and the others indicates that the group formed by these genotypes arose at a time well before the emergence of the other sequences.

In the analysis, it was observed that MLST genes, except for *SOD*, are undergoing a nonstochastic selection (Table 5, Graph 1). The IGS1 region is experiencing a balancing or disruptive selection with a statistical significance of $P < 0.01$, favoring the emergence of new variants of this region, probably because this sequence corresponds to an intergenic region. However, the other analyzed regions (*CAP53*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1* and *URA5*), which characterize coded regions of proteins with diverse cellular functions (thus, tending to undergo different selective pressure of the IGS1 region), presented results that favor an increased

frequency of the most common allele and a decreased frequency of rarer alleles, with a significance of $P < 0.01$ as well.

Conclusion

The rapidly worsening clinical condition of the patient with lymphoma that culminated in death may have been due to the infection caused by the ST623 genotype from *C. neoformans*, which causes great concern related to both clinical and molecular epidemiology and the environment. The phylogenetic study demonstrated that the common ancestor had a population origin in Germany and, independent of this group, had different genotypes. The genetic distances of the concatenated sequences of the samples of this group were smaller, compared with the rest of the analyzed sequences. The new genotype (ST623) identified at HEMOAM, is evolutionarily closer to genotypes 53 and 5, from China. It should be noted that the selective pressure process that the analyzed MLST genes from *C. neoformans* are experiencing is of the non-stochastic type.

Therefore, further studies are necessary to correctly identify these processes that may be related to different types of environments such as hospitals, use of antifungals or even habitats in nature, thus favoring the emergence of new future variants of this species.

Data Availability

All data generated or analysed during this study are included in this published article

References

1. Wei F, Zhenzong Fa, Wanqing Liao. Epidemiology of Cryptococcus and cryptococcosis in China. *Fungal Genetics and Biology*. **78**, 7–15 (2015).
2. Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM, et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis*. **17**, 873–881 (2017).
3. Lin Y-Y, Shiau S, Fang C-T. Risk Factors for Invasive Cryptococcus neoformans Diseases: A Case-Control Study. *PLoS ONE*. **10**, e 0119090 (2015).

4. Firacative C, Lizarazo J, Illnait-Zaragoz MT, Castaeda E, Latin American Cryptococcal Study Group. The status of Cryptococcosis in Latin America. *Mem. Inst Oswaldo Cruz.* **113**, 1-23 (2018).
5. Leimann BC, Koifman RJ. Cryptococcal meningitis in Rio de Janeiro state, Brazil, 1994-2004. *Cad Saude Publica.* **24**, 2582-92 (2008).
6. Rocha DFS, Cruz KS, Santos CSdS, Menescal LSF, Neto JRdS, Pinheiro SB, et al. MLST reveals a clonal population structure for *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI isolates from clinical sources in Amazonas, Northern-Brazil. *PLoS ONE.* **13**, e0197841 (2018).
7. John W. Amburgy, Joseph H. Miller,¹ Benjamin J. Ditty,¹ Patrick Vande Lune,² Shaaf Muhammad, and Winfield S. Fisher. *Cryptococcus gattii* in an Immunocompetent Patient in the Southeastern United States. *Case Reports in Infectious Diseases.* 8280915 (2016).
8. Meyer W, Castaeda A, Jackson S, Huynh M, Castaeda E, the IberoAmerican Cryptococcal Study Group. Molecular Typing of Ibero American *Cryptococcus neoformans* Isolates. *Emerging Infectious Diseases.* **9**, 189-195 (2003).
9. Martins LMS, Wanke B, Lazera MS, Trilles L, Barbosa GG, Macedo RCL, et al. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **106**, 725-730 (2011).
10. Moreira LA, Batista SC, Gritti A, Silva JBM, Vido MHC. Meningoencefalite causada por *Cryptococcus neoformans* em pacientes portadores de HIV/AIDS. *Revista Educao em Foco.* **9**, 72-81 (2017).
11. Canavari IC, Vargas GH, Tinucci-Costa M. Camplesi AC. Criptococose: literature review. *Revista eletrnica de veterinria.* **18**, 1-5 (2017).
12. Ellabib MS, Aboshkiwa MA, Husien WM, D'Amicis R, Cogliati M. Isolation, Identification and Molecular Typing of *Cryptococcus neoformans* from Pigeon Droppings and Other Environmental Sources in Tripoli, Libya. *Mycopathologia.* **181**, 603-8 (2016).
13. Ferreira CM, Andrade DR, Souza VS, Ferreira GMA, Ferreira WA. Effectiveness of Modified Sabouraud Medium in Relation to the Bacterial Growth. *SOJ Microbiol Infect Dis.* **4**, 1-3 (2016).
14. Ferreira-Paim K, Andrade-Silva L, Fonseca FM, Ferreira TB, Mora DJ, Andrade-Silva J, et al. MLST Based population genetic analysis in a global context reveals clonality amongst *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI isolates from HIV patients in Southeastern Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* **11**, 29 (2017).

- 15.Sanchini A, Smith IM, Sedlacek L, Schwarz R, Tintelnot K, Rickerts V. Molecular typing of clinical *Cryptococcus neoformans* isolates collected in Germany from 2004 to 2010. *Med Microbiol Immunol.* **5**, 333-40 (2014).
- 16.Khayhan K, Hagen F, Pan W, Simwami S, Fisher MC, Wahyuningsih R, Chakrabarti A, Et al. Geographically structured populations of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in Asia correlate with HIV status and show a clonal population structure. *PLoS One.* **38**, e72222 (2013).
- 17.Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution.***35**,1547-1549 (2018).
- 18.Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research.* **32**,1792-1797 (2004).
- 19.Tajima F. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics.***123**, 585-595 (1989).
- 20.Sneath PHA, Sokal RR. Numerical Taxonomy. *Freeman*, San Francisco (1973).
- 21.Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution.* **16**,111-120 (1980).
- 22.Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.* **39**,783-791 (1985).
- 23.Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, Sánchez-Gracia A. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Mol. Biol. Evol.* **34**, 3299-3302 (2017).
- 24.Alangaden GJ. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. *Infect Dis Clin N Am.* 201–225 (2011).
- 25.Rafik A, Diouri M, Bahechar N, Chlihi A. Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections in the National Center for Burns in Casablanca, Morocco. *Annals of Burns and Fire Disasters.* **2**, 90-93 (2016).
- 26.Bougnoux ME, Brun S, Zahar JR. Healthcare-associated fungal outbreaks: New and uncommon species, New molecular tools for investigation and prevention. *Antimicrobial Resistance and Infection Control.* **7**,45 (2018).
- 27.Sidiq F, Hoostal M, Rogers SO. Rapid identification of fungi in culture-negative clinical blood and respiratory samples by DNA sequence analyses. *BMC Res Notes.* **9**,293 (2016).

28. Person AK, Kontoyiannis DP, Alexander BD. Fungal Infections in Transplant and Oncology Patients. *Infect Dis Clin North Am.* **2**, 439–459 (2010).
29. Korfel A, Menssen HD, Schwartz S, Thiel E. Cryptococcosis in Hodgkin's disease: description of two cases and review of the literature. *Ann Hematol.* **76**, 283–286 (1998).
30. Gentil FA, Dias DT, Pacheco DF, Luz EA, Costa LGFS, Brum RMO. Criptococose: Relato De Caso. *Acta Biomedica Brasiliensia.* **2**, 102-109 (2016).
31. Camplesi Junior M, Silva HM, Arantes AM, Costa CR, Ataide FS, Silva TC, et al. Invasive Fungal Infection in Patients with Hematologic Disorders in a Brazilian Tertiary Care Hospital. *Rev.Soc. Bras.Med Trop.* **1**: 80-85 (2017).
32. Roussey JÁ, Olszewski MA, Osterholzer JJ. Immunoregulation in Fungal Diseases. *Microorganisms.* **4**; 2-22 (2016).
33. Pereira AM, Ferrarini F, Rodrigues AG, Romano LH. Criptococose em paciente Imunocomprometidos e Imunocompetentes. *Revista Saúde em Foco.* **10**, 236-243 (2018).
34. Beale MA, Sabiti W, Robertson EJ, Fuentes-Cabrejo KM, O'Hanlon SJ, Jarvis JN. Genotypic diversity is associated with clinical outcome and phenotype in cryptococcal meningitis across Southern Africa. *PLoS Negl Trop Dis.* **9**, e0003847 (2015).

Competing interests

The author(s) declare no competing interests.

Authors Contributions

Data Curation: Lucyane Mendes Silva, Roberto Alexandre Alves Barbosa, Cristina Motta Ferreira, William Antunes Ferreira.

Investigation and Methodology: Lucyane Mendes Silva, Guilherme Motta Antunes Ferreira, Marielle Machado Macedo, Denise de Almeida Cristo, Marla Jarlene Alves, Ani Beatriz JackischMatsuura, Cristina Motta Ferreira, William Antunes Ferreira.

Software, formal analysis: Roberto Alexandre Alves Barbosa, William Antunes Ferreira.

Conceptualization, Validation, Visualization and Writing-Review&Editing: William Antunes Ferreira, Cristina Motta Ferreira, Roberto Alexandre Alves Barbosa.

Original draft preparation: William Antunes Ferreira, Roberto Alexandre Alves Barbosa, Maria de Nazaré Saunier, Ani Beatriz Jackisch-Matsuura, Cristina Motta Ferreira.

Conceptualization, Funding acquisition, Project Administration, Resources: Cristina Motta Ferreira.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schadewaldt H. First steps of medical mycology in Germany. *Mykosen*. 1981; 24(11): 654-667.
2. Gemeinhardt H. 150 years of medical mycology. *Zeitschrift für die gesamte Hygiene und ihre Grenzgebiete*. 1990; 36(4): 191-194.
3. Espinel-Ingroff A. History of medical mycology in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*. 1996; 9(2): 235-272.
4. Ajello L. Italian contributions to the history of general and medical mycology. *Medical Mycology*. 1998; 36(1): 1-11.
5. Whittaker RH. New Concepts of Kingdoms of Organisms. *Science*. 1969; 163: 151-160.
6. Spatafora JW, Aime MC, Grigoriev IV, Martin F, Stajich JE, Blackwell M. The fungal tree of life: From molecular systematics to genome-scale phylogenies. *Microbiology Spectrum*. 2017; 5(5).
7. Stajich JE. Fungal Genomes and Insights into the Evolution of the Kingdom. *Microbiology Spectrum*. 2017; 5(4).
8. Sidrim JJC, Rocha MFG. *Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos*. 1th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
9. Chowdhary A, Perfect J, Hoog GS. Black Molds and Melanized Yeasts Pathogenic to Humans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2015; 5: a019570.
10. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Takahashi NM. *Tratado de Micologia Médica*. 9th ed. São Paulo: Sarvier; 2002.
11. Li J, Vinh DC, Casanova JL, Puel A. Inborn errors of immunity underlying fungal diseases in otherwise healthy individuals. *Current Opinion in Microbiology*. 2017; 40: 46-57.

12. Rocha DFS, Cruz KS, Santos CSS, Menescal LSF, Neto JRS, Pinheiro SB. MLST reveals a clonal population structure for *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI isolates from clinical sources in Amazonas, Northern-Brazil. 2017; 13(6): e0197841.
13. Górska K, Blaszkowska J, Dzikowiec M. Neuroinfections caused by fungi. *Infection*. 2018; 46(4): 443-459.
14. Andes DR, Safdar N, Baddley JW, Alexander B, Brumble L, Freifeld A, et al. The epidemiology and outcomes of invasive *Candida* infections among organ transplant recipients in the United States: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Transplant Infectious Diseases*. 2016; 18: 921-931.
15. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans *Candida* species. *Frontiers in Microbiology*. 2017; 7: 2173.
16. Canela HMS, Cardoso B, Vitali LH, Coelho HC, Martinez R, Ferreira MEDS. Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. *Mycoses*. 2018; 61: 11-21.
17. Antinori S, Milazzo L, Sollima S, Galli M, Corbellino M. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. *European Journal of Internal Medicine*. 2016; 34: 21-28.
18. Mantadakis E, Pana ZD, Zaoutis T. Candidemia in children: Epidemiology, prevention, and Management. *Mycoses*. 2018; 15.
19. Köhler JR, Hube B, Puccia R, Casadevall A, Perfect JR. *Fungi that Infect Humans*. *Microbiology Spectrum*. 2017.
20. Guinea J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014; 20: 5-10.
21. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2015; 62: 150.
22. Brady AC, Wong B, Pfeiffer CD. Utilizing Rapid Diagnostics for Detection of *Candida* Species. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*. 2015; 7(3): 127-141.
23. Mutschlechner W, Karall D, Hartmann C, Streiter B, Baumgartner-Sigl S, Orth-Höller D, et al. Mammary candidiasis: molecular-based detection of *Candida*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2016; 35: 1309-1313.
24. Fang W, Fa Z, Liao W. Epidemiology of *Cryptococcus* and cryptococcosis in China. *Fungal Genetics and Biology*. 2015; 78: 7-15.
25. Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infectious Disease*. 2017; 17(8): 873-881.

26. Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, Meyer W, Cuomo CA, Wollenburg KR, et al. The Case for Adopting the "Species Complex" Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *mSphere*. 2017; 2(1): e00357-16.
27. Ellabib MS, Aboshkiwa MA, Husien WM, D'Amicis R, Cogliati M. Isolation, Identification and Molecular Typing of *Cryptococcus neoformans* from Pigeon Droppings and Other Environmental Sources in Tripoli, Libya. *Mycopathologia*. 2016; 181(7-8):603-608.
28. Maziarz EK, Perfect JR. Cryptococcosis. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2016; 30(1):179-206.
29. Jarvis JN, Bicanic T, Loyse A. Determinants of mortality in a combined cohort of 501 patients with HIV-associated cryptococcal meningitis: Implications for improving outcomes. *Clinical Infectious Diseases*. 2014; 58(5): 736-745.
30. Esher SK, Zaragoza O, Alspaugh JA. Cryptococcal pathogenic mechanisms: a dangerous trip from the environment to the brain. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2018; 113(7): e180057.
31. Chammard TB, Temfack E, Lortholary O, Alanio A. Diagnostic and therapeutic strategies in cryptococcosis: impact on outcome. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2018; 113(7): e180050.
32. WHO - World Health Organization. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children. 2018. Available from: [http:// www.who.int/hiv/pub/guidelines/cryptococcal-disease/en/](http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/cryptococcal-disease/en/).
33. Molloy SF, Kanyama C, Heyderman RS, Loyse A, Kouanfack C, Chanda D, et al. Antifungal Combinations for Treatment of Cryptococcal Meningitis in Africa. *The New England Journal of Medicine*. 2018; 378:1004-1017.
34. Anvisa. Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica - Módulo VII. Brasília: 2013.
35. Chowdhary A, Perfect J, Hoog GS. Black Molds and Melanized Yeasts Pathogenic to Humans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2015; 5: a019570.
36. Levetin E, Horner WE, Scott JA. Taxonomy of Allergenic Fungi. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2016; 4(3): 375-385.e1.
37. Dadar M, Tiwari R, Karthik K, Chakraborty S, Shahali Y, Dhama K. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control - An update. *Microbial Pathogenesis*. 2018; 117: 128-138.
38. Quinto-Aleman D, Canerina-Amaro A, Hernández-Abad LG, Machín F, Romesberg FE, Gil-Lamaignere C. Yeasts acquire resistance secondary to antifungal drug treatment by adaptive mutagenesis. *PLoS One*. 2012; 7(7): e42279.

39. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Third Edition, M27-A3. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008. p. 40.
40. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement - M27-S4. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012. p. 32.
41. Koneman EW, Allen SD, Winn WC, Janda WM, Procop GW, Schreckenberger PC, et al. Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan; 2010. 1565 p.
42. Crocker J, Burnett D. The Science of Laboratory Diagnosis. 2 ed. Nova Jersey, EUA: Wiley; 2005. 564 p.
43. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Calandra TF, Edwards JE, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009;48(5):503-35.
44. Pfaller MA, Rex JH, Rinaldi MG. Antifungal susceptibility testing: technical advances and potential clinical applications. *Clin Infect Dis*. 1997;24(5):776-84.
45. Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, et al. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clin Infect Dis*. 1997;24(2):235-47.
46. McKeating C, White PL, Posso R, Palmer M, Johnson E, McMullan R. Diagnostic accuracy of fungal PCR and β -D-glucan for detection of candidaemia: a preliminar evaluation. *J Clin Pathol*. 2017;0:1–5.
47. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. 1997. *BioTechniques*. 2013 Jun;54(6):314-20.
48. Moreira-Oliveira MS, Mikami Y, Miyaji M, Imai T, Schreiber AZ, Moretti ML. Diagnosis of candidemia by polymerase chain reaction and blood culture: prospective study in a high-risk population and identification of variables associated with development of candidemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;24(11):721-6.
49. CLSI. Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by DNA Target Sequencing; Approved Guideline. CLSI document MM18-A, Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
50. Arbefeville S, Harris A, Ferrieri P. Comparison of sequencing the D2 region of the large subunit ribosomal RNA gene (MicroSEQ®) versus the internal transcribed spacer (ITS) regions using two public databases for identification of common and uncommon clinically relevant fungal species. *Journal of Microbiological Methods*. 2017;140:40-46.

51. Wengenack NL, Binnicker MJ. Fungal molecular diagnostics. *Clin Chest Med.* 2009;30(2):391-408, viii.
52. Meiklejohn KA, Damaso N, Robertson JM. Assessment of BOLD and GenBank – Their accuracy and reliability for the identification of biological materials. *PLoS One.* 2019; 14(6): e0217084.
53. Choo KH, Lee HJ, Knight NJ, Holmes AR, Cannon RD. Multilocus sequence typing (MLST) analysis of *Candida albicans* isolates colonizing acrylic dentures before and after denture replacement. *Medical Mycology.* 2016; 1–7.
54. Colombo AL, Guimarães T, Camargo LF, Richtmann R, Queiroz-Telles F, Salles MJ, et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Braz J Infect Dis.* 2013;17(3): 283-312.
55. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One.* 2013;8(3):e59373.
56. Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW. *Manual Of Clinical Microbiology.* 10, editor. Washington, DC: American Society For Microbiology; 2011.
57. Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int J Microbiol.* 2012;2012:713687.
58. Carvalho VO. Identificação e análise de mutações no gene ERG11 de isolados de *Candida* susceptíveis e resistentes ao fluconazol [Master's Program]. Brasil: Universidade de São Paulo; 2010.
59. Cornely OA, Flörl CL, Lagrou K, Arsenijevic VA, Hoenigl M. Improving outcome of fungal diseases - Guiding experts and patients towards excellence. *Mycoses.* 2017; 1-6.
60. Junior MC, Silva HM, Arantes AM, Costa CR, Ataide FS, Silva TC, et al. Invasive fungal infection in patients with hematologic disorders in a Brazilian tertiary care hospital. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2017; 50(1): 80-85.
61. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) [Internet]. Estados Unidos. 2014 [citado em 2018 Jul 12]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/fungal/global/index.html>.
62. M Dong, X Li, J Liu, Z Song, H Zhao, S Wei, et. al. Successful surgical management of invasive pulmonary fungal infection in patients with leucemia. *Infection and Drug Resistance.* 2019;12 1675-1681.
63. Junior MC, Silva HM, Arantes AM, Costa CR, Ataide FS, Silva TC, et al. Invasive fungal infection in patients with hematologic disorders in a Brazilian tertiary care hospital. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2017; 50(1): 80-85.
64. Cheikh JE, Ceballos P, Dalle JH, Ducastelle-Leprêtre S, Dulon E, Herbrecht R. Micafungin prophylaxis in routine medical practice in adult and pediatric patients with hematological

malignancy: A prospective, observational study in France. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2019; 94(3):268-273.

65. Borges DP, Santos AWA, Magalhaes SMM, Sidrim JJ, Rocha MFG, Cordeiro RA, Brilhante RSN, Bandeira SP, Junior JTV, Pinheiro RF. *Fusarium solani* infection as an initial manifestation of AML transformation in myelodysplastic syndrome: A case report. *Journal de Mycologie Médicale*. 2018.

66. Foster CE, Edwards MS, Brackett J, Schady DA, Healy CM, Baker CJ. Trichosporonosis in Pediatric Patients With a Hematologic Disorder. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. 2017;1-6.

67. JS, Hermes DM, Pasqualotto AC. Galactomannan use in clinical practice: providing free testing is not the answer. *Braz J Infect Dis*. 2017.

68. Nucci F, Nouér SA, Capone D, Nucci M. Invasive Mold Disease in Hematologic Patients: Comparison between Fusariosis and Aspergillosis. 2018;24(10): 1105.e1-1105.e4.

69. Ferreira CM, Andrade DR, Souza VS, Ferreira GMA, Ferreira WA. Effectiveness of Modified Sabouraud Medium in Relation to the Bacterial Growth. *SOJ Microbiology & Infectious Diseases*. 2016; 4(2): 1-3.

70. Rocha DFS. G [Internet]. Epidemiologia molecular dos agentes da Criptococose e perfil de susceptibilidade antifúngica de isolados clínicos obtidos em um centro de referência no Amazonas. Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD); 2016.

71. Jimenez KL. Características moleculares e perfil de sensibilidade a antifúngicos de leveduras do gênero *Candida* spp isoladas de paciente com candidíase vulvovaginal. Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD); 2015.

72. Vitek-2 Compact [Internet]. Estados Unidos. 2014 [citado em 2018 Jul 17]. Disponível em: https://store.pda.org/tableofcontents/ermm_v2_ch01.pdf

73. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White (eds.). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. 1990; 315-322.

74. Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol*. 2009;47(6):561-570.

75. Bournoux ME, Morand S, d'Enfert C. Usefulness of Multilocus Sequence Typing for Characterization of Clinical Isolates of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40(4): 1290-1297.

76. Dodgson AR, Pujol C, Denning DW, Soll DR, Fox AJ. Multilocus Sequence Typing of *Candida glabrata* Reveals Geographically Enriched Clades. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41(12): 5709-5717.

77. Tavanti A, Davidson AD, Johnson EM, Maiden MCJ, Shaw DJ, Gow NAR., et. al. Multilocus Sequence Typing for Differentiation of Strains of *Candida tropicalis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43(11): 5593-5600.
78. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 1987; 4: 406-425.

6. ANEXOS

6.1. Anexo A – Leveduras identificadas com o cartão VITEK 2 YST ID segundo orientações do fabricante (bioMérieux)

Ordem alfabética	
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida zeylanoides</i>
<i>Candida boidinii</i>	<i>Cryptococcus albidus</i>
<i>Candida catenulata</i>	<i>Cryptococcus laurentii</i>
<i>Candida colliculosa</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Cryptococcus terreus</i>
<i>Candida famata</i>	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
<i>Candida freyschussii</i>	<i>Geotrichum klebahnii</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Kloeckera spp.</i>
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Kodamaea ohmeri</i>
<i>Candida haemulonii</i>	<i>Malassezia furfur</i>
<i>Candida inconspicua/Candida lambica</i>	<i>Malassezia pachydermatis</i>
<i>Candida intermedia</i>	<i>Millerozyma farinosa (Pichia farinosa)</i>
<i>Candida kefyr</i>	<i>Prototheca wickerhamii</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Prototheca zopfii</i>
<i>Candida lipolytica</i>	<i>Rhodotorula glutinis/Rhodotorula mucilaginosa</i>
<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Rhodotorula minuta</i>
<i>Candida magnoliae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Candida norvegensis</i>	<i>Saprochaete capitata (Geotrichum capitatum)</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>
<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Stephanoascus ciferrii</i>
<i>Candida pulcherrima</i>	<i>Trichosporon asahii</i>
<i>Candida rugosa</i>	<i>Trichosporon inkin</i>
<i>Candida sake</i>	<i>Trichosporon mucoides</i>
<i>Candida spherica</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
<i>Candida tropicalis</i>	
<i>Candida utilis</i>	

6.2. Anexo B – Parecer Consubstanciado do CEP do HEMOAM

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Resistência à antifúngicos e epidemiologia molecular de espécies fúngicas isoladas de processos infecciosos em pacientes com doenças hematológicas da Fundação HEMOAM

Pesquisador: Lucyane Mendes Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 73548017.5.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.361.498

6.3. Anexo C – TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE)

**Resistência à antifúngicos e epidemiologia molecular de espécies fúngicas isoladas de processos infecciosos em pacientes com doenças hematológicas da Fundação HEMOAM
Nº CAAE: 73548017.5.0000.0009**

Este é um trabalho de pesquisa que tem como finalidade realizar um exame do micróblio que esteja provavelmente causando uma infecção em seu corpo, e o resultado do exame poderá trazer boas coisas para a sua saúde, assim como de outras pessoas que no futuro possam também ter esse tipo de doença, pois todas elas serão encaminhadas para o médico que fará o tratamento adequado. Para que possamos realizar este estudo será necessário coletar o seu sangue usando, para isso, uma seringa e agulha descartáveis para protegê-lo(a). Informamos que, somente no momento da coleta de sangue, você sentirá um leve aperto no braço, por causa do garrote, e um pouco de dor, no momento da picada da agulha, mas nada disto comprometerá sua saúde ou bem-estar físico. Poderá sentir também, dependendo do tipo de exame e a solicitação do médico, uma sensação de cócegas devido ao swab (cotonete grande) que será passado em alguma parte de seu corpo (garganta, nariz, ferida), mas também sem prejuízo ou dano físico. Devido a importância deste estudo, somente a amostra do soro, obtida de seu sangue, e a amostra do fungo, serão armazenados no freezer para serem realizados estudos posteriores, caso necessário, que contribuirão de uma maneira importante para o conhecimento a respeito dessas infecções. Caso o(a) Sr(a) concorde em participar, estará nos ajudando a ter informações sobre a sua saúde e como prevenir algumas doenças graves que geralmente afetam os pacientes com doenças hematológicas, conhecendo o micróblio e suas características, poderemos contribuir evitando essas infecções. O projeto poderá ser encerrado se ocorrerem problemas além dos mencionados acima que possam afetá-lo(a), em nenhum momento você deixará de ser atendido pela equipe médica do HEMOAM, por não participar deste projeto. Se ocorrer algum problema, como marcas roxas ou nervosismo, a equipe médica e de enfermagem estarão por perto para prestar atendimento, caso necessite. Garantimos o sigilo e privacidade dos seus testes. Todos os resultados dos exames feitos serão mantidos em segredo e somente o(a) Sr(a) e/ou o responsável pelo projeto poderão ver os resultados. Você receberá uma via deste documento e esclarecemos que como vocês estão internados no HEMOAM para tratamento, não haverá

despesas em relação a nenhum item do projeto assim como não será necessária indenização, pelo fato desta pesquisa não ocasionar nenhum dano ao participante. Também queremos lhe dizer que eles poderão ser publicados em uma revista médica para que outros colegas da nossa profissão possam tomar conhecimento e tentar ajudar outras pessoas. O(A) Sr(a) terá liberdade a qualquer momento de sair do estudo sem que isso lhe traga algum prejuízo ao seu modo de vida e qualquer dúvida poderá ser tirada com a responsável que é a Biomédica, Lucyane Mendes Silva, pelo telefone 3655-0231 ou na Fundação HEMOAM, Laboratório de Genômica pelo período da tarde.

Eu,.....recebi a explicação de que serei um dos participantes dessa pesquisa. Se eu não souber ler ou escrever, uma pessoa de minha confiança lerá este documento para mim e depois escreverá nesta página o meu nome. Por estar devidamente informado(a) e esclarecido(a) sobre este termo, livremente, sem qualquer pressão por parte dos pesquisadores, expressei meu consentimento para a minha inclusão.

.....

Data/...../.....

Assinatura do paciente ou responsável

Contato: () _____

.....

Assinatura do pesquisador que conversou com o paciente ou responsável

6.4. Anexo D – TA

TERMO DE ASSENTIMENTO (TA)

**Resistência à antifúngicos e epidemiologia molecular de espécies fúngicas isoladas de processos infecciosos em pacientes com doenças hematológicas da Fundação HEMOAM
Nº CAAE: 73548017.5.0000.0009**

Este é um trabalho de pesquisa que tem como finalidade realizar um exame do micróbio que esteja provavelmente causando uma infecção em seu filho(a), e o resultado do exame poderá trazer boas coisas para a saúde dele(a) assim como de outras crianças que no futuro possam também ter esse tipo de doença, pois todas elas serão encaminhadas para o médico que fará o tratamento adequado. Para que possamos realizar este estudo será necessário coletar o sangue do seu filho(a) usando, para isso, uma seringa e agulha descartáveis para proteger seu filho(a). Informamos que, somente no momento da coleta de sangue, seu filho(a) sentirá um leve aperto no braço, por causa do garrote, e um pouco de dor, no momento da picada da agulha, mas nada disto comprometerá a saúde ou bem-estar físico dele(a). A criança poderá sentir também, dependendo do tipo de exame e a solicitação do médico, uma sensação de cócegas devido ao swab (cotonete grande) que será passado em alguma parte de seu corpo (garganta, nariz, ferida), mas também sem prejuízo ou dano físico ao seu filho(a). Devido a importância deste estudo, somente a amostra do soro, obtida do sangue de seu filho, e a amostra do fungo, serão armazenados no freezer para serem realizados estudos posteriores, caso necessário, que contribuirão de uma maneira importante para o conhecimento a respeito dessas infecções. Caso o(a) Sr(a) concorde que seu filho(a) participe, estarão nos ajudando a ter informações sobre a saúde dele(a) e também como prevenir algumas doenças graves que geralmente afetam os pacientes com doenças hematológicas, conhecendo o micróbio e suas características, poderemos contribuir evitando essas infecções. O projeto poderá ser encerrado se ocorrerem problemas além dos mencionados acima que possam afetar a criança e, em nenhum momento seu filho deixará de ser atendido pela equipe médica do HEMOAM, por não participar deste projeto. Se ocorrer algum problema, como marcas roxas ou nervosismo, a equipe médica e de enfermagem estarão por perto para prestar atendimento, caso seu filho necessite. Garantimos o sigilo e privacidade dos testes de seu filho. Todos os resultados dos exames feitos serão mantidos em segredo e somente o(a) Sr(a) e/ou o responsável pelo projeto poderão ver os

resultados. Você receberá uma via deste documento e esclarecemos que como vocês estão internados no HEMOAM para tratamento, não haverá despesas em relação a nenhum item do projeto assim como não será necessária indenização, pelo fato desta pesquisa não ocasionar nenhum dano ao participante. Também queremos lhe dizer que eles poderão ser publicados em uma revista médica para que outros colegas da nossa profissão possam tomar conhecimento e tentar ajudar outras pessoas. O seu filho(a) terá liberdade a qualquer momento de sair do estudo sem que isso lhe traga algum prejuízo ao seu modo de vida e qualquer dúvida poderá ser tirada com a responsável que é a Biomédica, Lucyane Mendes Silva, pelo telefone 3655-0231 ou na Fundação HEMOAM, Laboratório de Genômica pelo período da tarde. Eu,.....responsável pelo paciente menor de idade.....recebi a explicação de que o mesmo será um dos participantes dessa pesquisa. Se eu não souber ler ou escrever, uma pessoa de minha confiança lerá este documento para mim e depois escreverá nesta página o meu nome. Por estar devidamente informado(a) e esclarecido(a) sobre este termo, livremente, sem qualquer pressão por parte dos pesquisadores, expressei meu consentimento para a minha inclusão.

.....

Data/...../.....

Assinatura do responsável

Contato: () _____

.....

Assinatura do pesquisador que conversou com o responsável

6.5. Anexo E – Formulário da Pesquisa

FORMULÁRIO DA PESQUISA - CAAE Nº 73548017.5.0000.0009					
ASPECTOS DEMOGRÁFICOS E SOCIOECONÔMICOS					
Nome:			Idade:		Sexo: M () F ()
Contato: () ()		Raça:		Estado civil:	
Nacionalidade:		Naturalidade:		Reside em:	
Zona:					
Grau de escolaridade: <input type="checkbox"/> Não estudou <input type="checkbox"/> 1ª-4ª série do ensino fundamental <input type="checkbox"/> 5ª-8ª série do ensino fundamental <input type="checkbox"/> Ensino médio incompleto <input type="checkbox"/> Ensino médio completo <input type="checkbox"/> Ensino superior incompleto <input type="checkbox"/> Ensino superior completo					
Rendimento salarial familiar: <input type="checkbox"/> 0-1 salário mínimo <input type="checkbox"/> 2-3 salários mínimos <input type="checkbox"/> 4-5 salários mínimos <input type="checkbox"/> Acima de 5 salários mínimos					
Ocupação:					
MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E CONDUTAS TERAPÊUTICAS					
Tipo de atendimento:		Temperatura:		Contagem de neutrófilos:	
Doença hematológica:		Outras doenças:		Quimioterapia:	
Antibiótico: Não () Sim ()		Antifúngico: Não () Sim ()		Desfecho:	
EXAMES LABORATORIAIS					
nº do prontuário		nº do exame		Data da coleta:	
Origem da amostra:					
Crescimento em cultura: Não () Sim ()		Infecção bacteriana: Gram positiva: Não () Sim () Gram negativa: Não () Sim ()		Infecção fúngica: Fungo leveduriforme: Não () Sim () Fungo filamentosos: Não () Sim ()	
nº da cepa					
Hemograma (1ª vez/resultado normal): Hematócrito: Não () Sim () Leucócito: Não () Sim () Plaqueta: Não () Sim ()			Bioquímico (1ª vez/resultado normal): Creatinina: Não () Sim () Bilirrubina: Não () Sim () Lactato: Não () Sim ()		

6.6. Anexo F – Meios de Cultura

ASD modificado

Preparo da Solução Mãe do Antibiótico

1. Diluir o Meropenem de 500 mg em 97,65 ml de Água de Injeção para obter a [] de 5.120 mg/l;
2. Acondicionar a solução mãe em frasco âmbar no freezer a -20 °C.

Diluição da Solução Mãe do Antibiótico

1. Retirar 20 ml da solução mãe;
2. Acrescentar 140 ml de Água de Injeção para obter [] de 640 mg/l;
3. Acondicionar a solução mãe diluída em frasco âmbar no freezer a -20 °C.

Preparo do Meio de Cultura Modificado

1. Preparar 500 ml de ASD:

Dextrose.....	20 g
Peptona.....	5 g
Ágar.....	7,5 g
Água Destilada.....	500 ml

2. Adicionar 125 ml da solução mãe diluída.

MEA

Extrato de Malte.....	20 g
Peptona.....	1,0 g
Dextrose.....	20 g
Ágar.....	20 g
Água Destilada.....	1 l

NSA

Semente de Girassol.....	200 g
Peptona.....	5 g
Dextrose.....	10 g
Ágar.....	20 g
Água Destilada.....	1 l

YES

Extrato de Levedura.....	20 g
Sacarose.....	150 g
Ágar.....	15 g
Água Destilada.....	1 l

ASD líquido

Extrato de Carne.....	3 g
Cloreto de Sódio.....	5 g
Peptona.....	10 g
Água Destilada.....	1 l

6.7. Anexo G – Colorações

Coloração de Gram

1. Cobrir o esfregaço com cristal violeta durante 1 minuto;
2. Lavar rapidamente em água corrente;
3. Cobrir todo o esfregaço com lugol por 1 minuto;
4. Lavar rapidamente em água corrente;
5. Lavar uma ou duas vezes, rapidamente, com a solução diferenciadora: álcool ou acetona por 10 a 15 segundos;
6. Lavar rapidamente em água corrente;
7. Cobrir o esfregaço com fucsina por 30 segundos;
8. Lavar rapidamente em água corrente;
9. Deixar a lâmina secar;
10. Observar no microscópico óptico.

Tinta Nanquim

1. Colocar uma gota de tinta nanquim e uma gota de sedimento da amostra sobre uma lâmina;
2. Cobrir a preparação com lamínula;
3. Observar no microscópico óptico (objetivas de 10x e 40x).

Corante Azul de Lactofenol-Algodão

1. Retirar com auxílio de alça de platina em “L” um pedaço da colônia sobre uma lâmina;
2. Colocar 1 a 2 gotas do corante e cobrir a preparação com lamínula;
3. Observar no microscópico óptico (objetiva de 40x).

6.8. Anexo H – Protocolo de Extração de DNA de Fungos Filamentosos

Pré-Extração:

1. LEIA todo este protocolo por no mínimo duas vezes antes de iniciar os procedimentos;
2. Verificar se os seguintes materiais estão estéreis: microtubo de 1,5 ml, caixas de ponteiros de 1.000 µl e 200 µl;
3. Repicar os fungos em placa contendo meio de cultura SDA ou MEA com cloranfenicol e incubar a 30 °C por 5-7 dias;
4. Utilizar os EPI'S básicos (jaleco, máscara, touca e principalmente as luvas durante todos os procedimentos para evitar a ação de DNAses).

Primeira Etapa de Extração (Lise Celular):

1. Limpar a cabine de extração com álcool 70%, forrando a mesma com papel toalha. Separar e organizar todos os materiais (pipetas e caixas de ponteiros de 1.000 µl e 200 µl, microtubo de 1,5 ml, estante para microtubo, alça bacteriológica, lápis) e reagentes que serão utilizados e ligar a luz UV por 15 minutos;
2. Adicionar 800 µl de água no microtubo de 1,5 ml;
3. Transferir ¼ de massa micelial;
4. Homogeneizar no vórtex por 15 segundos;
5. Colocar no TissueLyser a 25 oscilações por 4 minutos;
6. Centrifugar a 5.000 rcf por 10 minutos e desprezar o sobrenadante;
7. Adicionar 180 µl de ATL e incubar a 37 °C por 30 minutos;
8. Adicionar 25 µl de PK, 200 µl de AL e incubar a 56 °C por 30 minutos;
9. Adicionar 200 µl de etanol absoluto;
10. Homogeneizar no vórtex por 30 segundos e centrifugar a 5.000 rcf por 5 segundos;

Segunda Etapa de Extração (Purificação):

1. Transferir todo o material para o tubo coletor com coluna de sílica e desprezar o microtubo utilizado inicialmente;
2. Centrifugar a 6.000 rcf por 1 minuto;
3. Desprezar o tubo coletor com sedimento, colocar a coluna de sílica em um novo tubo coletor e adicionar 500 µl de AW1;
4. Centrifugar a 6.000 rcf por 1 minuto;

5. Desprezar o tubo coletor com sedimento, colocar a coluna de sílica em um novo tubo coletor e adicionar 500 μ l de AW2;
6. Centrifugar a 20.000 rcf por 3 minutos;
7. Desprezar o tubo coletor com sedimento, colocar a coluna de sílica em um microtubo de 1,5 ml e adicionar 25 μ l de AE;
8. Incubar por 1 minuto em temperatura ambiente e centrifugar a 6.000 rcf por 1 minuto;
9. Adicionar 25 μ l de AE;
10. Incubar por 1 minuto em temperatura ambiente e centrifugar a 6.000 rcf por 1 minuto;
11. Armazenar o DNA no freezer a -20 °C;
12. Limpar a cabine de extração com álcool 70%, guardar os reagentes, ligar a luz UV por 15 minutos e realizar este mesmo procedimento ao reiniciar a extração.

6.9. Anexo J – Protocolo de Extração de DNA de Fungos Leveduriformes

Pré-Extração:

1. LEIA todo este protocolo por no mínimo duas vezes antes de iniciar os procedimentos;
2. Verificar se os seguintes materiais estão estéreis: microtubo de 1,5 ml, caixas de ponteiras de 1.000 μ l e 200 μ l;
3. Repicar os fungos em microtubo de 1,5 ml contendo meio de cultura SDA líquido com cloranfenicol e incubar a 35 °C por 48-72 horas;
4. Utilizar os EPI'S básicos (jaleco, máscara, touca e principalmente as luvas durante todos os procedimentos para evitar a ação de DNAses).

Primeira Etapa de Extração (Lise Celular):

1. Limpar a cabine de extração com álcool 70%, forrando a mesma com papel toalha. Separar e organizar todos os materiais (pipetas e caixas de ponteiras de 1.000 μ l e 200 μ l, microtubo de 1,5 ml, estante para microtubo, alça bacteriológica, lápis) e reagentes que serão utilizados e ligar a luz UV por 15 minutos;
2. Centrifugar a 8.000 rpm por 1 minuto;
3. Desprezar o sobrenadante;
4. Adicionar as miçangas e colocar no TissueLyser a 35 oscilações por 30 minutos;
5. Adicionar 180 μ l de ATL e 20 μ l de PK;
6. Incubar no termobloco a 56 °C por 18-24 horas.

Segunda Etapa de Extração (Purificação):

1. Centrifugar a 800 rpm por 2 minutos;
2. Adicionar 200 μ l de AL e homogeneizar no vórtex por 15 segundos;
3. Incubar no termobloco a 72 °C por 10 minutos;
4. Adicionar 200 μ l de etanol absoluto;
5. Homogeneizar no vórtex por 15 segundos e centrifugar a 5.000 rcf por 5 segundos;
6. Transferir todo o material para o tubo coletor com coluna de sílica e desprezar o microtubo utilizado inicialmente;
7. Centrifugar a 800 rpm por 1 minuto;
8. Desprezar o tubo coletor com sedimento, colocar a coluna de sílica em um novo tubo coletor e adicionar 500 μ l de AW1;

9. Centrifugar a 800 rpm por 1 minuto;
10. Desprezar o tubo coletor com sedimento, colocar a coluna de sílica em um novo tubo coletor e adicionar 500 μ l de AW2;
11. Centrifugar a 8.000 rpm por 6 minutos;
12. Desprezar o tubo coletor com sedimento, colocar a coluna de sílica em um microtubo de 1,5 ml e adicionar 25 μ l de AE;
13. Incubar por 1 minuto em temperatura ambiente e centrifugar a 800 rpm por 1 minuto;
14. Adicionar 25 μ l de AE;
15. Incubar por 1 minuto em temperatura ambiente e centrifugar a 800 rpm por 1 minuto;
16. Armazenar o DNA no freezer a -20 °C;
17. Limpar a cabine de extração com álcool 70%, guardar os reagentes, ligar a luz UV por 15 minutos e realizar este mesmo procedimento ao reiniciar a extração.

6.10. Anexo J – Protocolo de Purificação de DNA com enzima ExoSAP (Thermo Fisher Scientific)

Mix ExoSAP	
Reagentes	Volume para uma amostra
Exo I	0,25 μ l
SAP	0,50 μ l
Tampão 10 X	0,25 μ l
Água pura	1,5 μ l
Volume final:	2,5 μl

1. Acrescentar 5 μ l da PCR no microtubo de 1,5 ml;
2. Adicionar 2,5 μ l do Mix ExoSAP;
3. Centrifugar a 3.000 rpm por 30 segundos;
4. Incubar a 37 °C por 30 minutos;
5. Centrifugar a 3.000 rpm por 30 segundos;
6. Incubar a 80 °C por 15 minutos;
7. Centrifugar a 3.000 rpm por 30 segundos;
8. Adicionar 5,5 μ l de água pura;
9. Centrifugar a 3.000 rpm por 30 segundos;
10. Quantificar as amostras purificadas;
10. Selar com adesivo álcool resistente e armazenar no freezer a -20 °C.

6.11. Anexo K – Comprovante de Submissão de Artigo Científico

manuscripttrackingsystem **SCIENTIFIC REPORTS** | nature research

[tracking system home](#) | [author instructions](#) | [reviewer instructions](#) | [? help](#) | [tips](#) | [✕ logout](#) | [journal home](#)

Your manuscript has been successfully submitted to *Scientific Reports*. Your manuscript tracking number is: SREP-19-33427

All submissions are subject to a quality check after which you will receive either a confirmation that the manuscript has passed the quality check or an email detailing quality check feedback.

[Return Home](#) [Go to Manuscript](#)



[tracking system home](#) | [author instructions](#) | [reviewer instructions](#) | [help](#) | [tips](#) | [logout](#) | [journal home](#) | [terms of use](#)
[privacy policy](#) | [cookie policy](#) | [manage cookies](#)

6.12. Anexo L – Trabalho relacionado à Dissertação enviado à Evento Científico

6.12.1. Resumo 1

Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia e Terapia Celular, ano 2019

Dados demográficos e socioeconômicos de pacientes diagnosticados com micoses oportunistas

Lucyane Mendes Silva, William Antunes Ferreira, Cristina Motta Ferreira

As condições demográficas e socioeconômicas influenciam o estado de saúde da população. O acometimento por doenças ocorre em muitas vezes devido as circunstâncias em que as pessoas vivem. E a imunidade comprometida dos pacientes hematológicos associada ao baixo nível dessas condições são fatores de risco para micoses oportunistas. Nas últimas décadas, registros epidemiológicos comprovam a elevação da taxa de mortalidade neste grupo de pacientes, ocasionadas por essas infecções. Assim, este estudo teve como objetivo descrever os dados demográficos e socioeconômicos de pacientes diagnosticados com micoses oportunistas da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Trata-se de um estudo transversal, prospectivo e descritivo. O período de coleta de dados foi de um ano, entre novembro de 2017 a outubro de 2018. Com total de 34 pacientes, sendo que 97%(33) estavam internados e 3%(1) atendido pelo serviço de ambulatório; 53%(18) estado civil solteiro e 47%(16) casado; 68%(23) cor parda e 32%(11) branca; 53%(18) sexo masculino e 47%(16) feminino; faixa etária entre 2 a 72, com média de 29 anos. Todos de nacionalidade brasileira, sendo 50%(17) pacientes procedentes do município de Manaus, 38%(13) de outros municípios do Amazonas (Jutaí, Tefé, Manacapuru, Itacoatiara, Iranduba, Careiro, Manaquiri, Fonte Boa, Benjamin Constant, Barcelos, Nova Olinda do Norte) e 12%(4) de outros estados da federação (Ji-Paraná-RO, Oriximiná-PA, Pinheiro-MA, Tapera-RS). Considerando a zona de moradia, 71%(24) residem no município de Manaus, com predominância de 33%(8) na zona Sul e 33%(8) zona Centro-Sul. Dados quanto ao grau de escolaridade revelaram que 32%(11) não estudaram, 20%(7) possuem ensino médio incompleto, 18%(6) cursaram até 1^a-4^a série do ensino fundamental, 18%(6) cursaram até 5^a-8^a série do ensino fundamental, 6%(2) possuem superior incompleto e 6%(2) possuem superior completo. O rendimento salarial familiar foi de 74%(25) entre 0-1 salário mínimo e 26%(9) entre 2-3 salários mínimos, sendo alegado em 59%(20) dos casos não possuem profissão. Em relação à doença hematológica, 32%(11) apresentaram Leucemia Linfoblástica Aguda, 23%(8) Leucemia Mielóide Aguda, 9%(3) Linfoma Não-Hodgkin, 9%(3) Anemia Falciforme, 9%(3) Anemia Hemolítica Idiopática, 6%(2) Anemia não especificada, 3%(1) Leucemia não especificada, 3%(1) Trombocitemia Essencial, 3%(1) Mieloma Múltiplo e 3%(1) Síndrome Mielodisplásica não especificada. É possível observar a dificuldade de acesso aos sistemas de saúde para muitos pacientes e o desconhecimento de como essas baixas condições podem interferir em sua saúde. Contudo, as micoses oportunistas ocorrem de forma frequente na população de estudo, e as variáveis demográficas e socioeconômicas são de alta relevância para o conhecimento sobre as doenças micóticas na região.

6.12.2. Resumo 2

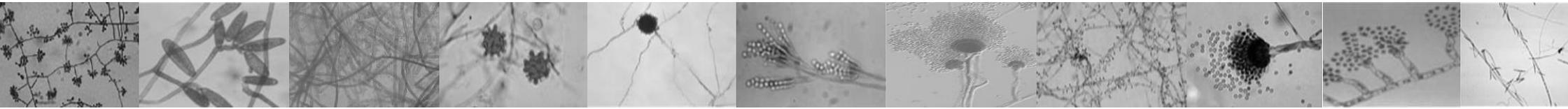
Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia e Terapia Celular, ano 2019

Dados clínicos, laboratoriais e terapêuticos de pacientes diagnosticados com micoses oportunistas

Lucyane Mendes Silva, William Antunes Ferreira, Cristina Motta Ferreira

Pacientes acometidos por doenças hematológicas realizam terapia quimioterápica intensa, o que ocasiona a depleção de seu sistema imune, deixando-os suscetíveis a desenvolver infecções como micoses oportunistas, neutropenia e outros fatores de risco. A incidência de infecções ocasionadas por fungos é considerada um grande problema de saúde pública, especialmente no ambiente hospitalar, representando uma das principais complicações infecciosas e contribuindo para uma elevada morbimortalidade. O presente estudo objetiva descrever dados clínicos, laboratoriais e terapêuticos de pacientes diagnosticados com micoses oportunistas da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Trata-se de um estudo transversal, prospectivo e descritivo. O período de registro das informações foi de um ano, entre novembro de 2017 a outubro de 2018. Com total de 34 pacientes, sendo que 97%(33) estavam internados e 3%(1) atendido pelo serviço de ambulatório; 53%(18) estado civil solteiro e 47%(16) casado; 68%(23) cor parda e 32%(11) branca; 53%(18) sexo masculino e 47%(16) feminino; faixa etária entre 2 a 72, com média de 29 anos. Em relação à doença hematológica, 32%(11) apresentaram Leucemia Linfoblástica Aguda, 23%(8) Leucemia Mielóide Aguda, 9%(3) Linfoma Não-Hodgkin, 9%(3) Anemia Falciforme, 9%(3) Anemia Hemolítica Idiopática, 6%(2) Anemia não especificada, 3%(1) Leucemia não especificada, 3%(1) Trombocitemia Essencial, 3%(1) Mieloma Múltiplo e 3%(1) Síndrome Mielodisplásica não especificada. 9%(3) dos pacientes possuem comorbidade, sendo que 67%(2) tem hipertensão arterial sistêmica e 33%(1) hepatite B. Cerca de 68%(23) apresentaram febre na submissão a internação, e 71%(24) casos neutropênicos. O hemograma demonstrou instabilidade em 100%(34) no hematócrito, 82%(28) no leucograma, 71%(24) no plaquetograma, 65%(22) no exame de creatinina, 50%(17) no exame de lactato e 38%(13) no exame de bilirrubina. A administração dos quimioterápicos foram realizadas de forma associada e não associada, de acordo com a doença do sangue, como a **LLA**- 64%(7) protocolo GBTLI 2009+MTX+6-MP, 18%(2) Hyper-CVAD, 18%(2) FLAG-IDA; **LMA**- 62%(5) Ara-C, 25%(2) FLAG e 13%(1) Ara-C+IDA; **LNH**- 67%(2) CHOP e 33%(1) R-FND; **AF**- 100%(3) HU; **AHI**- 100%(3) CSA+GAT; **ANE**- 100%(2) Cbl; **LNE**- 100%(1) Ara-C; **TE**- 100%(1) HU; **MM**- 100%(1) CTD e **SMNE**- 100%(1) AZA-CR. Durante o período de suspeita de infecção, a terapêutica foi realizada de modo empírico, e a escolha do antibiótico e/ou antifúngico foi 20%(7) associação de amoxicilina com clavulanato, 14%(5) meropenem com vancomicina, 12%(4) ciprofloxacina, 9%(3) meropenem, 9%(3) sulfametoxazol, 6%(2) oxacilina com ceftriaxona, 6%(2) ciprofloxacina com sulfametoxazol, 6%(2) cefepime com claritromicina, 6%(2) ceftriaxona, 3%(1) vancomicina, 3%(1) oxacilina, 3%(1) cefepime com anfotericina B e 3%(1) fluconazol. Evoluíram para óbito 50%(17) dos pacientes durante a infecção. Observa-se progressão rápida das micoses oportunistas durante o tratamento quimioterápico e a neutropenia prolongada torna mais difícil encontrar uma evidência micológica clara. Assim, é de extrema importância o conhecimento do perfil desta população para uma investigação microbiológica adequada e terapêutica eficaz.

6.12.3. Panfleto



Testando o conhecimento

Q	S	E	Õ	Ç	C	E	F	N	I
W	M	I	C	O	S	E	S	K	H
U	O	L	A	E	I	G	V	B	O
V	J	Q	R	U	T	E	I	V	K
A	S	P	A	G	I	V	A	S	L
F	L	U	C	O	N	A	Z	O	L
R	E	L	O	S	E	F	F	P	F
A	T	M	A	N	A	A	D	O	Q
Q	A	Ã	Y	Ç	F	V	Z	R	E
U	N	O	F	O	A	B	I	T	A
E	Y	D	X	Z	V	M	O	U	U
Z	F	U	N	G	O	Z	S	N	O
A	E	H	A	F	S	C	S	I	G
Ç	B	L	E	E	A	A	P	S	H
A	R	O	B	E	R	T	K	T	C
B	E	J	U	P	I	I	J	A	E

Gabário
 Vertical: fraqueza, febre, pulmão, tinea favosa, oportunista
 Horizontal: infecções, micoses, fluconazol, fungos, robert

A cartilha foi realizada a partir da necessidade vista pelos autores do conhecimento a respeito dessas doenças negligenciadas. Existe a preocupação mundial na monitorização dos agentes causadores de infecções em imunocompetentes e imunocomprometidos. Na região Norte do Brasil, pouco se sabe sobre a epidemiologia desses fungos em pacientes com doenças hematológicas, com isso o projeto “Caracterização molecular de espécies fúngicas isoladas de processos infecciosos de pacientes da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas” da aluna de mestrado Lucyane Mendes Silva, busca compreender um pouco mais sobre essas doenças que possuem grande relevância social.

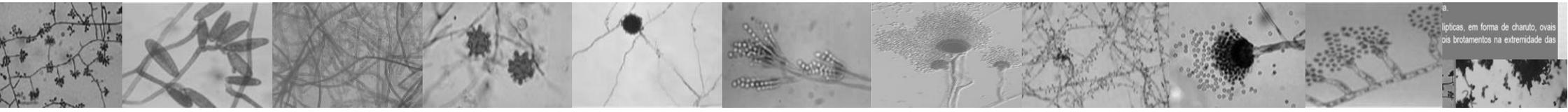
Agradecimentos:

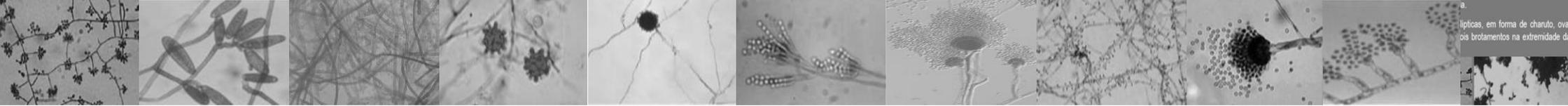


INFECCÕES FÚNGICAS

Lucyane Mendes Silva
 Cristina Motta Ferreira
 William Antunes Ferreira

Manaus-AM
 2019





Você sabia?

Micoses são condições nas quais os fungos ultrapassam as barreiras de resistência do corpo e estabelecem infecções.

Esses fungos estão dispersos no ambiente. A partir da pele podem ir para outros locais do corpo via corrente sanguínea, correndo sério risco de chegar ao sistema nervoso central.

Se não diagnosticadas e tratadas o doente pode vir a morrer. A maioria são de caráter oportunista e adoecem principalmente pessoas com comprometimento do sistema imune, como pacientes com doenças hematológicas.

Quem descobriu?

O primeiro caso de micose humana foi descrito em **1841**, pelo médico Polonês, **Robert Remak**, em indivíduos que apresentaram crostas no couro cabeludo. O microrganismo isolado dessa descamação foi cultivado para estudos e denominado **Tinea favosa**.



Onde pode ocorrer a doença?

Podem acometer as camadas mais superficiais quanto as profundas, como tecidos e órgãos.



Sinais e Sintomas

- ✓ Náusea
- ✓ Dor de cabeça
- ✓ Fraqueza
- ✓ Tosse
- ✓ Prurido
- ✓ Expectoração
- ✓ Febre
- ✓ Lesão na pele

O diagnóstico clínico varia de acordo com o tipo e infecção e grau de imunossupressão.

Tratamento

Para pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos, o médico poderá indicar os medicamentos antifúngicos **Anfotericina B** e **Fluconazol**.

O **Itraconazol** pode ser usado para o tratamento de infecções cutâneas.

