

## IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida* ISOLADAS DE HEMOCULTURAS DE PACIENTES ONCOLÓGICOS E PESQUISA DE BIOFILME

### IDENTIFICATION OF YEAST *Candida* SPECIES ISOLATED FROM BLOOD CULTURES OF CANCER PATIENTS AND BIOFILM DETECTION

Eduarda Sampaio **Lazzarotto**<sup>1,2\*</sup>, Jannaina Ferreira de Melo **Vasco**<sup>1</sup>, Caroline Martins **Lopes**<sup>2</sup>, Andrea **Krelling**<sup>3</sup>, Lavinia Nery Villa Stangler **Arend**<sup>4</sup>, Luiza Souza **Rodrigues**<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba-PR, Brasil.

<sup>2</sup> Centro Universitário Autônomo do Brasil (UniBrasil), Curitiba-PR, Brasil.

<sup>3</sup> Liga Paranaense de Combate ao Câncer (Hospital Erasto Gaertner), Curitiba-PR, Brasil.

<sup>4</sup>Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN), Curitiba-PR, Brasil.

\* Rua Konrad Adenauer, n.º 442 - Tarumã, Curitiba - PR, CEP 82.820-540, Contato: (41) 3515-1484, e-mail: eduarda.lazzarotto11@gmail.com

Submetido em: 20/03/2020; Aceito em: 12/08/2020

## RESUMO

Pacientes com câncer são suscetíveis a infecções fúngicas devido aos efeitos citotóxicos da quimioterapia, eventual necessidade de procedimento cirúrgico e internações hospitalares e ao uso de dispositivos médicos invasivos. Dentre as infecções fúngicas, destacam-se as causadas pelo gênero *Candida*, sendo *C. albicans* a mais prevalente. Entretanto, a emergência de espécies não-*albicans* vem sendo descrita em diferentes regiões geográficas. Espécies de *Candida* não *albicans* podem apresentar susceptibilidades variáveis aos agentes antifúngicos, o que torna importante identificá-las corretamente. Nosso objetivo foi identificar as espécies do gênero *Candida* isoladas de hemoculturas de pacientes oncológicos e avaliar sua capacidade de formação de biofilme. Foi realizado um estudo experimental prospectivo durante dois anos (2015 a 2017) com leveduras isoladas de hemocultura de pacientes internados em um hospital de referência em oncologia na cidade de Curitiba, Paraná, Brasil. Os microrganismos foram identificados por *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight* e a formação de biofilme foi identificada pela técnica fenotípica em tubo. Ao todo foram identificados 42 isolados, distribuídos em 16 *C.krusei*, nove *C. albicans*, seis *C. parapsilosis*, cinco *C. glabrata*, três *C. guilliermondii*, dois *C. tropicalis* e um *C. novyensis*. Desses isolados, 25 foram positivos para a formação de biofilme, que foi mais frequente para *Candida* não *albicans* (23). Demonstrou-se, portanto, a importância da identificação rápida e fidedigna das espécies de leveduras e de sua capacidade de formação de biofilme para garantir o tratamento direcionado e o conhecimento sobre a epidemiologia.

**Palavras-chave:** Biofilme. *Candida*. Candidemia. Hemocultura. MALDI-TOF.



## ABSTRACT

Cancer patients are susceptible to fungal infections due to the cytotoxic effects of chemotherapy, possible need for surgical procedures and hospital admissions, and the use of invasive medical devices. Among fungal infections, the ones caused by the genus *Candida* stand out, with *C. albicans* being the most prevalent. However, the emergence of non-*albicans* species has been described in different geographic regions. Non-*albicans* *Candida* species may present variable susceptibilities to antifungal agents, which makes it important to identify them correctly. Our objective was to identify the species of the genus *Candida* isolated from blood cultures of cancer patients and evaluate their capacity of biofilm formation. A prospective experimental study was conducted for two years (2015 to 2017) with yeasts isolated from blood culture of patients admitted to a reference cancer hospital in the city of Curitiba, state of Paraná, Brazil. The microorganisms were identified by Matrix Associated Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight and biofilm formation was identified by the phenotypic technique in a tube. A total of 42 isolates were identified in the study, distributed in 16 *C. krusei*, nine *C. albicans*, six *C. parapsilosis*, five *C. glabrata*, three *C. guilliermondii*, two *C. tropicalis* and one *C. novergensis*. Out of these isolates, 25 were positive for biofilm formation, which was more frequent for *C. non-albicans* (23). Therefore, this study has demonstrated the importance of the rapid and reliable identification of yeast species and their capacity to form biofilm to ensure targeted treatment and knowledge about epidemiology.

**Keywords:** Biofilm. *Candida*. Candidemia. Blood culture. MALDI-TOF.

## INTRODUÇÃO

Com as mudanças no perfil demográfico brasileiro o câncer tem se evidenciado como um problema de saúde pública, estando em destaque junto às doenças cardiovasculares e o diabetes. A estimativa para o biênio 2018-2019 apontava para cerca de 600 mil novos casos de câncer no Brasil (FREIRE *et al.*, 2018; INCA, 2018; LEITE; RIBEIRO, 2018; SANTOS, 2018). Neste contexto, infecções fúngicas oportunistas são um fator de risco para a mortalidade prematura desses pacientes, em especial a infecção de corrente sanguínea, também conhecida como candidemia (SABINO *et al.* 2010; SOUZA *et al.* 2015; RAZA *et al.*, 2016; TADEC *et al.*, 2016). A predisposição para a ocorrência de candidemia depende tanto das doenças subjacentes (AIDS, doenças hemato-oncológicas e doenças auto-imunes quanto de outros fatores, tais como: neutropenia, cirurgia abdominal, terapia imunossupressora, antibióticos de amplo espectro e dispositivos médicos invasivos (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; GIRI; KINDO, 2012; LI *et al.*, 2017).

Leveduras do gênero *Candida* são comensais e podem fazer parte da microbiota de seres humanos, tendo a capacidade de tornar-se patogênicas em situações de desequilíbrio dos mecanismos de defesa do hospedeiro (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; GIRI; KINDO, 2012). Além disso, seus fatores de virulência são parte determinante para sua patogenicidade, destacando-se a capacidade de formação de biofilme. Biofilme é uma comunidade de micro-organismos

envoltos em densa matriz extracelular polimérica composta principalmente por carboidratos, glicose, proteínas, hexosaminas, fósforo, entre outras, capaz de contribuir para a adesão ao hospedeiro e conferir resistência aos antifúngicos (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; GIRI; KINDO, 2012; SARDI *et al.*, 2013 LI *et al.*, 2017).

A formação do biofilme inicia-se com a adesão da levedura à superfície, sendo esta a célula do hospedeiro ou até mesmo a superfície de dispositivos médicos. As leveduras fazem sua adesão por meio de fatores inespecíficos, tais como a interação de fatores eletrostáticos entre a célula e as superfícies, e de específicos como adesinas na superfície da célula fúngica, responsáveis por reconhecer ligantes como proteínas, fibrinogênio e fibronectinas das células humanas. Após a adesão, as células formam microcolônias, ocorrendo em seguida, a formação de pseudo-hifas, e secreção de substâncias poliméricas extracelulares. Os biofilmes maduros apresentam colônias de células leveduriformes e pseudo-hifas, envoltas por uma matriz extracelular. Por fim, acontece a dispersão das células causando a persistência da doença (SARDI *et al.*, 2013; AKBARI; KJELLERUP, 2015; GU; XU; SUN, 2015).

Dentre as principais espécies descritas em infecção de corrente sanguínea e capazes de formar biofilme, *C. albicans* aparece como a principal, seguida por *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, a emergência de espécies não-albicans sendo cada vez mais reportada. O biofilme facilita a aderência dos microrganismos aos dispositivos médicos como cateteres, válvulas cardíacas artificiais e diferentes tecidos, aumentando a virulência dos microrganismos e dificultando o tratamento; contribuindo assim na falha terapêutica (RAJENDRAN *et al.*, 2016; CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018).

A micologia clássica utiliza métodos fenotípicos na identificação de espécies fúngicas. Para o gênero *Candida* a técnica de indução do tubo germinativo é amplamente difundida, sendo de grande importância na identificação de *C. albicans*, entretanto *C. dubliniensis* também apresenta a capacidade de formar tubo germinativo tornando necessário o uso de técnicas complementares (LACROIX *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2015).

A microfilamentação em ágar fubá tween 80 é utilizada para auxiliar na identificação e diferenciação das espécies. As cepas de *C. albicans* apresentam a formação de clamidósporos, diferente das demais espécies. Além dessa, as técnicas de assimilação de carboidratos e nitrogênio, nas quais testa-se a capacidade da levedura crescer em aerobiose frente a fontes de carbonos e nitrogênio, constituem mais uma etapa na identificação. O resultado indica de qual espécie se trata. É também amplamente recomendada a fermentação de carboidratos, auxiliando no fechamento diagnóstico. Nesta técnica o micro-organismo é semeado em meio líquido contendo açúcares e a fermentação é verificada após aproximadamente quinze dias de incubação (BRASIL, ANVISA, 2013).

Atualmente a utilização de ágar cromogênico tem elevada aceitação devido à simplicidade da metodologia e a capacidade de discriminar três das principais espécies envolvidas em infecções por *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*) por meio da análise das colônias e sua coloração (LACROIX *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2015). No entanto, frente ao recente surto de *C.*

*auris* na América Latina foi evidenciada a limitação da rápida identificação de espécies emergentes tanto por meio de provas bioquímicas e morfológicas da micologia clássica, quanto por ágar cromogênico e até mesmo da automação fenotípica (BRASIL, ANVISA, 2017).

Considerando as dificuldades na rápida e correta identificação fúngica, novos métodos de diagnóstico tem surgido, a exemplo dos testes de genotipagem molecular. Contudo, apesar de demonstrarem resultados mais rápidos que os métodos tradicionais, demandam um elevado custo de implantação e mão de obra qualificada (LACROIX *et al.*, 2014; PASTERNAK, 2012). Como alternativa, surgiu o *MALDI-TOF*, sigla para *Matrix Associated Laser Desorption Ionization Time of Flight*, técnica baseada no estudo proteômico dos microrganismos, especialmente de proteínas ribossomais (RAJENDRAN *et al.*, 2016; BIER *et al.*, 2017).

O objetivo deste trabalho foi identificar espécies de *Candida* spp por meio do *MALDI-TOF* e verificar a capacidade de formação de biofilme, por técnica fenotípica, de leveduras isoladas de hemocultura de pacientes oncológicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Esta é uma pesquisa experimental prospectiva, aprovada pelo comitê de ética e pesquisa em seres humanos sob o parecer de número 1.181.747 que incluiu todas as leveduras isoladas de hemocultura de pacientes oncológicos, durante o período de dois anos, a partir de setembro de 2015. O isolamento dos micro-organismos foi realizado após incubação das amostras de sangue em frasco de hemocultura do equipamento BD BACTEC™ 9120 *Blood Culture System* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

No laboratório do hospital, todas as hemoculturas positivas foram repicadas em meio de cultura ágar chocolate e incubadas à 35°C ± 2°C em estufa bacteriológica, sob tensão de CO<sub>2</sub>, por até 48 horas. Após isolamento, os microrganismos foram armazenados em microtubos contendo 1,0 mL de *skym-milk* e congelados à -20°C. Os isolados foram identificados em estudo anterior conforme Sorendino *et al.* (2017), pela indução do tubo germinativo e ágar cromogênico (Probac of Brasil®, São Paulo).

Para a identificação dos isolados pelo *MALDI-TOF*, todos foram semeados em ágar sangue e, após 24 horas de incubação a 35 ± 2°C em estufa bacteriológica, uma colônia foi transferida para *spots* específicos do *slide* do equipamento, onde após secagem, foi adicionado 0,5 µL ácido fórmico e após nova secagem, 1 µL de matriz polimérica CHCA (ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico). Ao término do procedimento, a lâmina foi processada pelo equipamento de *MALDI-TOF*, Vitek MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) para identificação dos isolados, sendo utilizado como cepa controle a *Escherichia coli* 8739 ATCC® (*American Type Culture Collection*) (conforme orientações do fabricante). Dentro do equipamento, as células fúngicas foram rompidas, suas proteínas ionizadas, formando assim partículas que foram aceleradas em tubo à vácuo e separadas por diferenças de tempo, de acordo com suas relações massa/carga. Ao término, foi gerado um resultado do espectro de massa das

proteínas ribossomais de cada micro-organismo (PASTERNAK, 2012; GOULART *et al.*, 2013; BIER *et al.*, 2017). A identificação foi obtida ao confrontar esses espectros com o banco de dados do *software* (versão 4) integrado ao equipamento.

Para a pesquisa fenotípica da capacidade de formação de biofilme, os micro-organismos foram repicados em ágar sabouraud e incubados em estufa bacteriológica a  $35\pm 2$  °C durante 24 horas. Após incubação, 10 uL de cada microrganismo foi transferido para um tubo tipo *falcon* contendo 10 mL de caldo *Brain-Heart Infusion* (BHI) enriquecido com 8% de glicose, sendo novamente incubados a  $35\pm 2$  °C por mais 24 horas. Os tubos foram então lavados com tampão fosfato-salino (PBS), corados com cristal violeta 0,1% e, posteriormente, lavados com água destilada, para visualização da formação do biofilme na parede do tubo, conforme descrito por Hassan *et al.* (2011). Este experimento foi realizado uma vez para cada amostra. Foram utilizadas cepas domésticas como controles positivo e negativo para formação de biofilme. Todos os resultados foram então transferidos para planilha eletrônica do *Excel*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

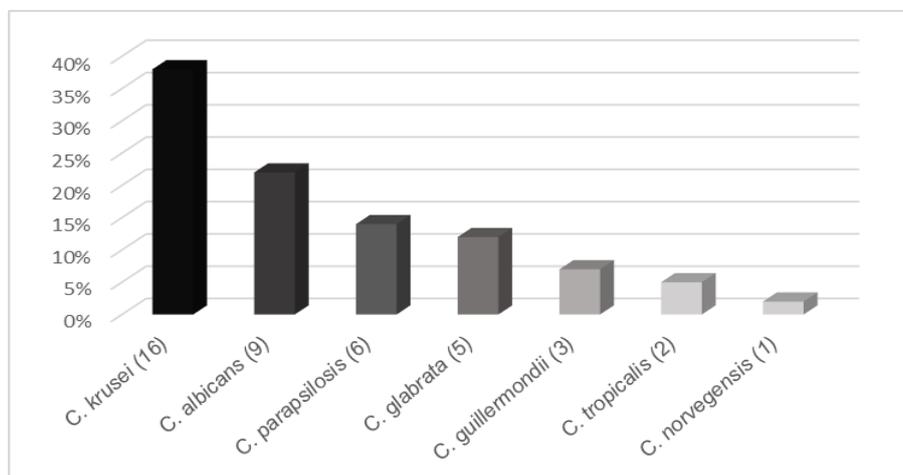
Durante dois anos foram armazenadas 48 leveduras do gênero *Candida*. Entretanto, após congelamento, 42 mantiveram-se viáveis e foram incluídas neste estudo. Todos os microrganismos foram previamente identificados por meio da prova de indução do tubo germinativo e ágar cromogênico. Os resultados obtidos por meio da identificação pelo MALDI-TOF demonstraram alta correlação com os resultados obtidos na identificação inicial, na qual foram encontradas 18 (43%) cepas de *C. krusei*, nove (21%) de *C. albicans*, dois (5%) de *C. tropicalis* e 13 (31%) micro-organismos de outras espécies que não puderam ser determinadas (não-*albicans*) (SORENDINO *et al.*, 2017).

Por meio da espectrometria de massa, foram identificadas 16 (38%) *C. krusei*, nove (22%) *C. albicans*, dois (5%) *C. tropicalis*, seis (14%) *C. parapsilosis*, cinco (12%) *C. glabrata*, três (7%) *C. guilliermondii* e um (2%) *C. norvegensis*, duas (5%) amostras identificadas como *C. krusei* durante análise por meio de técnicas bioquímicas e fenotípicas diferiram no resultado da técnica de espectrometria, sendo identificadas como *C. glabrata*. Realizou-se então uma segunda identificação em ágar cromogênico, confirmando tratar-se da espécie identificada por meio do MALDI-TOF, o que ocorreu possivelmente devido à troca de amostras durante o armazenamento, conforme Figura 1.

Sariguzel *et al.* (2015) realizaram um estudo no qual 54 amostras de hemocultura positivas foram analisadas, sendo identificadas através de diferentes métodos, entre eles o MALDI-TOF. Os resultados apontaram para acurácia de 100% na identificação pelo MALDI-TOF Vitek MS. Os resultados encontrados foram *C. parapsilosis* (n=32), *C. albicans* (n=19), *C. tropicalis* (n=2) e *C. glabrata* (n=2), assemelhando-se aos resultados do presente estudo, onde o número de *C. albicans* é menor, demonstrando a emergência das espécies não-*albicans* (SARIGUZEL *et al.*, 2015). No presente estudo, esta emergência ocorre, possivelmente, devido ao fato de que diferentes amostras

(n=26) foram obtidas dos mesmos pacientes, sendo apenas de locais e, ou, tempo de coleta diferentes.

**Figura 1** - Distribuição das espécies encontradas por meio do método *MALDI-TOF*.



**Fonte:** os autores

Do total de micro-organismos identificados, 69% (n=29) demonstraram resultados iguais aos obtidos em testes bioquímicos e fenotípicos. Dentre as 31% (n=13) restantes, os resultados diferiram daqueles obtidos a partir de técnicas convencionais, no entanto, repetiu-se tanto a técnica de espectrometria quanto os métodos convencionais, confirmando-se os resultados.

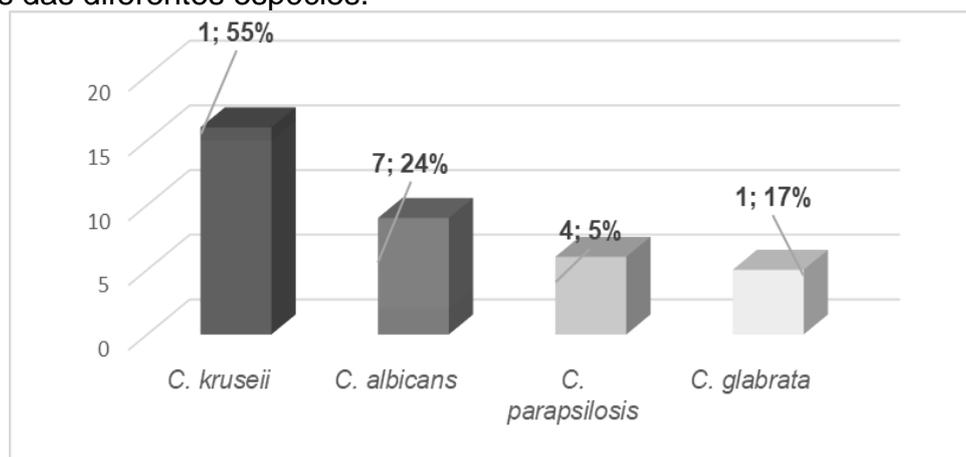
O estudo de um hospital universitário francês, realizado por Sendid *et al.* (2013), por sua vez, demonstrou uma acurácia entre os métodos convencionais e o *MALDI-TOF* menor, sendo esta de 91,5% (n=1105), um número bastante satisfatório, mesmo sendo menor. Analisando os resultados, estudiosos notaram maior excelência de identificação para espécies clinicamente relevantes, enquanto os microrganismos não usuais, apresentaram menor acurácia, fato que pode ocorrer, pois em alguns casos os bancos de dados são mais restritos.

No entanto, os autores realizaram métodos de sequenciamento de DNA, confirmando assim os resultados obtidos pela utilização do *MALDI-TOF* e sua confiabilidade (SENDID *et al.*, 2013). O estudo de Angeletti *et al.* (2015) fez a análise da identificação utilizando diferentes métodos, relacionando-os, obtendo-se assim uma concordância de 100% entre as técnicas. Neste, os pesquisadores relatam que, apesar do *MALDI-TOF* ser uma técnica relativamente nova, sua importância para o diagnóstico laboratorial é extremamente alta (ANGELETTI *et al.*, 2015).

A técnica fenotípica utilizada no intuito de identificar as espécies do gênero *Candida* spp. capazes de formar biofilme resultou em 60% (n=25) das amostras positivas para a formação da estrutura, e 40% (n=17) negativas, demonstrando a importância desta estrutura na infecção, visto que amostras de tempo e locais diferente de um mesmo paciente indicaram a persistência do microrganismo mesmo após intervenção terapêutica.

*C. krusei* foi a espécie mais frequente, com 15 cepas apresentando resultado positivo, e apenas 1 negativo, demonstrando alto potencial de formação de biofilme. As demais apresentaram: *C. albicans* 2 positivas, *C. parapsilosis* 2 positivas, *C. glabrata* 4 positivas, *C. guilliermondii* apenas 3 amostras negativas, *C. tropicalis* 2 positivas e *C. norvegensis* negativa. A maior porcentagem de cepas positivas para formação de biofilme está entre as espécies não-*albicans*, como demonstrado na Figura 2.

**Figura 2** - Avaliação fenotípica da capacidade de formação de biofilme nos isolados das diferentes espécies.



**Fonte:** Os autores.

A capacidade de formação de biofilme do fungo está associada à patogenicidade do mesmo, causando a desregulação do sistema imune do hospedeiro de diferentes formas. Na atual análise foi observado que a predisposição para formação do biofilme prevaleceu nos isolados de *Candida* não-*albicans*. Achados semelhantes foram encontrados nas pesquisas de (MUNUSAMY; VADIVELU; TAY, 2018) que encontraram espécies de *C. parapsilosis* (66,7%) produtoras de biofilme em sua maioria, e SIDA *et al.* (2016) na qual *C. krusei* (80,77%) foi a espécie mais frequente com positividade para formação da estrutura (MUNUSAMY; VADIVELU; TAY, 2018); SIDA *et al.*, (2016) indicando o aumento das infecções causada por espécies não-*albicans*, demonstrando o impacto clínico destes microrganismos para o prognóstico do paciente.

Como consequência da presença desta estrutura a virulência e patogenicidade do microrganismo são aumentadas, causando assim a resistência ao tratamento antifúngico, resistência a pressão competitiva de outros organismos e aos mecanismos imunes do hospedeiro, de modo que infecções relacionadas ao biofilme tornam-se muito mais difíceis de tratar (TUMBARELLO *et al.*, 2012; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

## CONCLUSÃO

No presente estudo, o *MALDI-TOF* permitiu a identificação de microrganismos do gênero *Candida* spp. isolados a partir de hemocultura, confirmando assim os resultados dos testes fenotípicos realizados previamente

e discriminando espécies que não haviam sido determinadas. A rapidez na obtenção dos resultados foi a principal vantagem observada, sendo de grande importância no diagnóstico de infecções fúngicas, tendo impacto na morbimortalidade dos pacientes, porém de alto custo para ser implantada na rotina laboratorial.

A produção de biofilme demonstrou maior incidência em espécies não-*albicans*, dado importante, uma vez que a produção de biofilme é um fator de virulência que contribui para a persistência da infecção e um facilitador da colonização e disseminação do processo infeccioso pelo uso de dispositivos médicos, como por exemplo, cateter venoso, devido ao aumento da adesão do microrganismo às superfícies. Além disso, o crescimento do microrganismo em biofilme pode conferir resistência a antifúngicos, prejudicando assim o tratamento.

## REFERÊNCIAS

AKBARI, F.; KJELLERUP, B. V. Elimination of bloodstream infections associated with candida albicans biofilm in intravascular catheters. **Pathogens**, v. 4, n. 3, p. 457-469, 2015.

ANGELETTI, S. *et al.* Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and Bayesian phylogenetic analysis to characterize Candida clinical isolates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 119, p. 214-222, 2015.

BIER, D. *et al.* Identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isolados de carcaças bovinas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 12, p. 1373-1379, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Comunicado de Risco Nº 01/2017 GVIMS/GGTES/ANVISA - Relatos de surtos de Candida auris em serviços de saúde da América Latina**. Brasília: ANVISA, 2017. Disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/alertas/item/comunicado-de-risco-01-2017-candida-auris>

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Microbiologia Clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde**. Brasília: ANVISA, 2013. Disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/deteccao-e-identificacao-de-fungos-de-importancia-medica>

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil** – Rio de Janeiro: INCA, 2017. [citado 2018 set 18]. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/revista/index.php/revista/article/view/115/55>

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. *Candida* Biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. **Frontiers in Medicine**, v. 5, n. FEB, p. 1-15, 2018.

FREIRE, M. E. M. *et al.* QUALIDADE DE VIDA RELACIONADA À SAÚDE DE PACIENTES COM CÂNCER EM CUIDADOS PALIATIVOS. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 27, n. 2, e5420016, 2018.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GIRI, S.; KINDO, A. J. A. review of *Candida* species causing blood stream infection. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 270-278, 2012.

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

GU, W.; XU, D.; SUN, S. *In Vitro* Models to Study *Candida albicans* Biofilms. **Journal of Pharmaceutics and Drug Development**, v. 3, n. 3, p. 1-11, 2015.

HASSAN, A. *et al.* Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 305-311, 2011.

LACROIX, C. *et al.* Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 2, p. 153-158, 2014.

LEITE, A. K. F.; RIBEIRO, K. B. Older adults with cancer in the city of São Paulo: what factors determine the place of death? **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 52, n. 66, p. 1-10, 2018.

LI, D. *et al.* Evaluation of candidemia in epidemiology and risk factors among cancer patients in a cancer center of China: An 8-year case-control study. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2017.

MUNUSAMY, K.; VADIVELU, J.; TAY, S. T. A study on *Candida* biofilm growth characteristics and its susceptibility to aureobasidin A. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 35, n. 2, p. 68-72, 2018.

PASTERNAK, J. New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. **Einstein (São Paulo, Brazil)**, v. 10, n. 1, p. 118-119, 2012.

RAJENDRAN, R. *et al.* Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection-Scotland, 2012-2013. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 1, p. 87-93, 2016.

RAZA, A. *et al.* Clinical features and outcomes of candidaemia in cancer patients: Results from Pakistan. **Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 66, n. 5, p. 584-589, 2016.

SABINO, R. *et al.* Epidemiology of candidemia in oncology patients: A 6-year survey in a Portuguese central hospital. **Medical Mycology**, v. 48, n. 2, p. 346-354, 2010.

SANTANA, D. P. *et al.* Ação de chalconas contra a formação de biofilme de *Candida albicans*. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 36, n. 1, p. 83-90, 2015.

SANTOS, M. O. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 64, n. 1, p. 119-120, 2018.

SARDI, J. C. O. *et al.* *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10-24, 2013.

SARIGUZEL F. M, *et al.* Evaluation of Chromagar *Candida*, VITEK2 YST and vitek® ms for identification of *Candida* strains isolated from blood cultures. **Le Infezioni in Medicina**, v. 23, n. 4, p. 318-322, 2015.

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

SIDA, H. *et al.* Study of biofilm formation as a virulence marker in *Candida* species isolated from various clinical specimens. **International Journal of Medical Science and Public Health**, v. 5, n. 5, p. 842-846, 2016.

SORENDINO G. *et al.* Pacientes atendidos em hospital oncológico no sul do Brasil. **Evinci - UniBrasil**, v. 37, n. 2, p. 16-25, 2017.

SOUZA, M. N. *et al.* Comparison between four usual methods of identification of *Candida* SPECIES. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 4, p. 281-287, 2015.

TADEC, L. *et al.* Epidemiology, risk factor, species distribution, antifungal resistance and outcome of Candidemia at a single French hospital: A 7-year study. **Mycoses**, v. 59, n. 5, p. 296-303, 2016.

TUMBARELLO M. *et al.* Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. **PLoS One**. v. 7, n. 3, p. 1-9, 2012.