

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Pós-Graduação em Biologia de Fungos

ANA EMÍLIA DE MEDEIROS ROBERTO

**DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA AS EQUINOCANDINAS DE ISOLADOS CLÍNICOS
DE *Candida parapsilosis stricto sensu*, *Candida orthopsilosis* e *Candida
metapsilosis* ATRAVÉS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

RECIFE
2016

ANA EMÍLIA DE MEDEIROS ROBERTO

**DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA AS EQUINOCANDINAS DE ISOLADOS CLÍNICOS
DE *Candida parapsilosis stricto sensu*, *Candida orthopsilosis* e *Candida
metapsilosis* ATRAVÉS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves Lima Neto.

Co-orientadora: Profa. Dra. Rejane Pereira Neves.

RECIFE
2016

Catálogo na fonte

Rafaela Mello

CRB 1537

Roberto, Ana Emília de Medeiros

Detecção de resistência as Equinocandinas de Isolados Clínicos de *Candida parapsilosis stricto sensu*, *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis* através de Espectrometria de massas / Ana Emília de Medeiros Roberto - Recife: O Autor, 2017.

98 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Reginaldo Gonçalves Lima Neto.

Coorientadora: Rejane Pereira Neves.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Biologia de Fungos, 2017.

Inclui referências e anexos.

1. Micologia médica 2. Antimicóticos 3. Equinocandinas

I. Reginaldo Gonçalves Lima Neto (orientador) II. Rejane Pereira Neves (coorientadora). III. Título

616.96901

CDD (22.ED.)

UFPE/CB-2017-234

ANA EMÍLIA DE MEDEIROS ROBERTO

**DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA AS EQUINOCANDINAS DE ISOLADOS CLÍNICOS
DE *Candida parapsilosis stricto sensu*, *Candida orthopsilosis* e *Candida
metapsilosis* ATRAVÉS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 01/03/2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Professor Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto/UFPE

Professora Dra. Sylvia Maria de Lemos Hinrichsen/UFPE

Professora Dra. Oliane Maria Correa Magalhães/UFPE

A minha avó Francisca, pela força, apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento especial,

A Deus, pela fé que me mantém viva e fiel á vida honesta de trabalho e estudo.

A minha família, pais, avós, irmãos, sobrinhos, tios e primos que souberam entender a minha ausência nos muitos momentos desde que ingressei no mestrado até a conclusão da dissertação.

A Ewerton, pela paciência, serenidade, compreensão, companheirismo, amizade e carinho em todos os momentos.

A Universidade Federal do Pernambuco pela oportunidade e aprendizado.

A Capes e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

Aos professores do Departamento de Micologia pelos ensinamentos, por meu crescimento científico e intelectual.

Aos professores da Micologia Médica, professor Armando, professora Rejane pelos ensinamentos e aprendizagens.

A Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital das Clínicas do Pernambuco, em especial a Dra. Cláudia Vidal pelo apoio, incentivo a pesquisa e confiança em meu trabalho.

Em especial a professora Oliane por auxiliar-me tantas e incontáveis vezes com palavras, pelos vários ensinamentos, por sempre encontrar possibilidades de melhorar meus trabalhos e de mostrar meu desempenho.

Aos amigos e colegas do CETENE, Joana, Ramon, Kelvin, Aldenise, Esteban, Isac, Dayanne, Catarina, Lígia, aos funcionários, em especial Dra. Júlia Furtado pelos ensinamentos e confiança em meu trabalho, pela dedicação e pela amizade.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves, pela oportunidade de ter me conduzido desde a graduação, com dedicação, paciência, esperança e humildade. Pela confiança em meu trabalho, pelos ensinamentos que foram valiosos para meu crescimento científico e intelectual.

Aos colegas e amigos da Micologia Michel, Melyna, Franz, Ana Paula, Cícero, Carlos Tiburcio, Ertênia, Crisdiano, Daniela Buonafina, Pamela, Carlos Fragoso, Renan, Ana Carla, Isabela, Hugo, Diogo, Adriana, Marina, Marcela, pelas boas conversas, amizade, pelos momentos de distração e pelos ensinamentos que foram tão valiosos.

A Isabelle Tanaka, pela amizade, carinho e paciência, sou grata por ajudar a conduzir essa pesquisa com bastante empenho.

Aos pacientes, discentes e funcionários que gentilmente aceitaram colaborar com a pesquisa.

A professora Danielle Mâcedo, por ter me conduzido no estágio a docência e por dividir comigo sua experiência profissional.

Aos Pós-Doutorandos Ana Maria, Carolina Silva, André, Fabíola e Humberto, pelo carinho e por compartilhar experiências científicas vivenciadas.

“A humildade é o princípio da sabedoria”

Provérbios 22:4

RESUMO

Observa-se um contínuo aumento na resistência de espécies de *Candida* aos antifúngicos disponíveis. Faz-se necessário que o diagnóstico seja oportuno e verossímil, associado à indicação terapêutica que é corretamente direcionada a partir de testes de sensibilidade antifúngica *in vitro*. A utilização da espectrometria de massas através da técnica de *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) que reduz o tempo de diagnóstico em comparação com métodos de rotina já é uma realidade, contudo estudos apontam a capacidade dessa metodologia em identificar cepas resistentes pela detecção de mudanças mínimas no perfil proteico da cepa após exposição ao fármaco. Assim, objetivou-se diagnosticar, em pacientes internados em UTI, isolados clínicos do complexo *Candida parapsilosis lato sensu* (*Candida parapsilosis stricto sensu*, *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis*) através da técnica proteômica *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) e correlacionar sua sensibilidade/resistência às equinocandinas com mudanças no espectro proteico. Trata-se de uma pesquisa experimental analítica com abordagem qualitativa. Amostras sanguíneas venosas foram coletadas entre agosto de 2014 e julho de 2015, a partir de pacientes internados em UTI, foram observadas ao exame direto e colhidas em frascos de hemocultura. As leveduras isoladas foram identificadas por MALDI-TOF MS e testes de sensibilidade antifúngica foram realizados através do CLSI frente a anidulafungina, caspofungina e micafungina. A detecção na resistência através da mudança mínima do plano espectral proteico obtida no MALDI-TOF MS, foi possível após o cruzamento de cada concentração do espectro com uma das duas concentrações extremas, máxima ou nula, onde formou-se uma matriz a partir do Índice de Correlação do Composto (ICC) utilizado para gerar mapas de calor. Foram diagnosticados 44 casos de candidemia, sendo 26 por *Candida parapsilosis*, dez *C. albicans*, dois casos por *C. metapsilosis*, dois *C. orthopsilosis*, dois por *C. tropicalis*, um *C. haemulonii* e um *Candida* sp. Vinte e oito (93,2%) isolados do complexo *Candida parapsilosis* foram sensíveis as equinocandinas de acordo com CLSI e 24 (79,9%) foram sensíveis de acordo com MALDI-TOF. A Concentração Inibitória Mínima e a Mudança Mínima no Perfil Proteico obtidos através do CLSI e MALDI-TOF, apresentaram concordância de 91,6%, 96,6% e 98,3% para anidulafungina, caspofungina e micafungina, respectivamente, frente os isolados de *Candida parapsilosis*. MALDI-TOF MS é capaz de determinar o *breakpoint* de uma levedura clínica após 15 horas de exposição ao antifúngico e permite predizer a melhor escolha antifúngica para pacientes críticos com candidemia.

Palavras-chave: Complexo *Candida parapsilosis*. MALDI-TOF MS. Equinocandinas.

ABSTRACT

Recently, there is an increase in resistance of *Candida* species to antifungal drugs available. It is necessary that the diagnosis is timely and credible associated with therapeutic indication that is directed from *in vitro* antifungal susceptibility testing. The use of mass spectrometry through the technique of *Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS), which reduces the time of diagnosis as compared to routine methods is already a reality, however pointed studies this methodology can identify resistant strains by detecting minimal changes in protein profile of strain after exposure. Thus, the objective was to diagnose in ICU patients, clinical isolates of complex *Candida parapsilosis lato sensu* (*Candida parapsilosis stricto sensu*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*) through proteomic technique *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) and correlate their sensitivity/resistance to echinocandins with changes in the protein spectrum. It is an analytical experimental research with qualitative approach. Venous blood samples were collected between August 2014 and July 2015, from ICU patients were observed in the direct examination and harvested in blood culture bottles. The yeasts were identified by MALDI-TOF MS and sensitivity tests were performed using CLSI antifungal and MALDI-TOF MS, compared to anidulafungin, caspofungin and micafungin. After crossing every spectrum concentration with one of the two extreme concentrations, maximum or zero, formed the matrix of Compound Correlation Index (ICC) used to generate heat maps. 44 cases of candidemia were diagnosed, 26 by *Candida parapsilosis* ten *C. albicans*, two cases of *C. metapsilosis* two *C. orthopsilosis* two by *C. tropicalis*, a *C. haemulonii* and one case of *Candida* sp. Twenty-eight (93.2%) isolates of *Candida parapsilosis* complex echinocandins according to CLSI and 24 were sensitive (79.9%) were sensitive according to MALDI-TOF. The Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Change in Protein Profile obtained by CLSI and MALDI-TOF showed concordance of 91.6%, 96.6% and 98.3% for anidulafungin, caspofungin and micafungin, respectively, compared isolates *Candida parapsilosis*. MALDI-TOF MS is able to determine the breakpoint of a clinical yeast after 15 hours of exposure to antifungal and allows predicting the best antifungal choice for critically ill patients with candidemia

Key-words: Complex *Candida parapsilosis*. MALDI-TOF MS. Echinocandin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Exame direto a fresco a partir do sangue evidenciando a presença de leveduras globosas, hialinas e brotantes (seta). Ampliação: 400x.....	43
Figura 2. Colônias de isolado clínico de <i>Candida parapsilosis</i> com dois dias de desenvolvimento em meio ASD, incubado a 37° C, apresentando coloração branca a creme, com superfície lisa e textura glabrosa.	44
Figura 3. Resultados das leveduras identificadas pelo MALDI Biotyper. Fonte: Software MALDI Biotyper versão 3.1.	45
Figura 4. Plano espectral proteico de leveduras do Complexo <i>Candida parapsilosis</i> *	46
Figura 5. Espectros de Massas da levedura <i>Candida parapsilosis</i> 5551 frente a Anidulafungina*	53
Figura 6. Matriz ICC da <i>Candida parapsilosis</i> 5551 frente a Anidulafungina*	54
Figura 7. Espectros de Massas da <i>Candida parapsilosis</i> 5551 frente a Caspofungina*	55
Figura 8. Matriz ICC da <i>Candida parapsilosis</i> 5551 frente a Caspofungina*	56
Figura 9. Espectros de Massas da <i>Candida parapsilosis</i> 5551 frente a Micafungina*	57
Figura 10. Matriz ICC da <i>Candida parapsilosis</i> 5551 frente a Micafungina*	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.Comparação entre o diagnóstico pelo VitekII e o MALDI-TOF MS	47
Tabela 2.Teste de susceptibilidade antifúngica <i>in vitro</i> das 44 cepas de <i>Candida</i> isoladas a partir do sangue de pacientes internados nas UTIs dos hospitais HAM, HC, HGV, entre agosto de 2014 a julho de 2015.	48
Tabela 3. Comparação entre o TSA* pelo CLSI** e o TSA pelo MALDI TOF MS [†] ...	50
Tabela 4. Número absoluto e porcentagem de isolados sensíveis frente as três equinocandinas através das metodologias que determinam o CIM (CLSI) e o MPCC (MALDI-TOF).....	51
Tabela 5. Reprodutibilidade em Porcentagem das duas metodologias para o TSA .	51
Tabela 6.Valores de correlação e auto-correlações para anidulafungina.....	54
Tabela 7.Valores de correlação e auto-correlações para Caspofungina	56
Tabela 8. Valores de correlação e auto-correlações para Micafungina	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD-	Ágar Sabouraud Dextrose
CCS-	Centro de Ciências da Saúde
CCB-	Centro de Ciências Biológicas
CIM-	Concentração Inibitória Mínima
CLSI-	Clinical Laboratory Standards Institute
Da-	Daltons
DMSO-	Dimetil Sulfóxido
EUCAST-	European Committee on Antimicrobial Susceptibility
FAB-	Fast Atom Bombardment
FDA-	Food and Drug Administration
FD-	Field Desorption
HAM-	Hospital Agamenon Magalhães
HCPE-	Hospital das Clínicas do Pernambuco
HCCA-	α - ciano-Ácido 4-hidroxi-cinâmico
HGV-	Hospital Getúlio Vargas
I-	Intermediário
ICC-	Índice de Correlação do Composto
IFI-	Infecção Fúngica Invasiva
LAMMA-	Laser Microprobe Mass Analyser
m-	Massa
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight
MS-	Mass Spectrometry
MLST-	Multilocus Sequence Typing
MMPC-	Concentração Mínima que Muda o Perfil
MOPS-	Ácido Morfolino Propano Sulfônico
MPCC-	Minimal Profile Change Concentration
Nd:YAG-	Neodymium-doped yttrium aluminium garnet
PD-	Plasma Desorption
R-	Resistente
S-	Sensível
SIDA-	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SIMS-	Secondary Ion Mass Spectrometry

SES/PE-	Secretária Estadual de Saúde do Pernambuco
TCTH-	Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas
TSA-	Teste de Sensibilidade Antifúngica
UFPE-	Universidade Federal do Pernambuco
UV-	Ultravioleta
UTI-	Unidade de Terapia Intensiva
YEPD-	Dextrose Peptona Extrato de Levedura
z-	Carga

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1. PROBLEMATIZAÇÃO	19
1.2.2. OBJETIVO GERAL.....	20
1.2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
1.3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	21
1.3.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS	21
1.3.2. DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO	21
1.3.3. ANÁLISE PROTEÔMICA	21
1.3.4. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i>	22
1.3.5. DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA PELO MALDI-TOF MS (TSA-MS).....	23
2. REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1.INFEÇÕES NOSOCOMIAIS POR LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i>	25
2.2. COMPLEXO <i>Candida parapsilosis</i>	26
2.3. DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO	29
2.4.IDENTIFICAÇÃO POR MALDI-TOF MS	30
2.5.SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA	34
2.6.EQUINOCANDINAS.....	36
2.7.DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA POR MALDI-TOF MS	39
3.ANÁLISE DOS RESULTADOS	43
3.1. OBTENÇÃO E DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO.....	43
3.2. ANÁLISE PROTEÔMICA	45
3.3. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i>	48
3.4. DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA PELO MALDI-TOF MS.....	49
3.5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	59
4.CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
REFERÊNCIAS.....	63
APÊNDICE A- TERMO DE COMPROMISSO E CONFIDENCIALIDADE	73
APÊNDICE B– MANUSCRITO SUBMETIDO A MEDICAL MYCOLOGY	74
ANEXO A – NORMAS DA SUBMISSÃO DO MANUSCRITO	91
ANEXO B – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA	95

1 INTRODUÇÃO

Infecções fúngicas nosocomiais que acometem pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) tem aumentado e se tornam mais frequentes. Graus variados de imunossupressão no organismo predispoem à instalação de uma infecção, a partir da adesão do fungo e da utilização de nutrientes necessários para o seu crescimento e disseminação, além de fatores predisponentes intrínsecos para a progressão da doença. Dentre os agentes etiológicos causadores de infecções fúngicas, destacam-se as leveduras do gênero *Candida* (PFALLER; DIEKEMA, 2007; VIJAYAKUMAR et al., 2012), agentes de micoses genericamente conhecidas como candidíases.

A candidíase, pode ser considerada uma infecção primária ou secundária a outras condições de base em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), diabetes mellitus e outras doenças submetidos a quimioterapia, antibioticoterapia de amplo espectro e corticoidoterapia prolongada, ou até mesmo a fatores extrínsecos, como uso prolongado de dispositivos médico-invasivos, como cateteres, sondas, próteses e válvulas. As manifestações clínicas podem ser aguda, subaguda ou crônica, podendo se estabelecer tanto nas superfícies de mucosas, como disseminar-se por via hematogênica para outros órgãos e tecidos (PFALLER; DIEKEMA, 2007; VIJAYAKUMAR et al., 2012). Além disso, a internação prolongada do paciente em uma UTI pode ocasionar o surgimento de infecções fúngicas consideradas oportunistas, podendo ser fatais ao hospedeiro (DE ROSSI et al., 2011; SHIBATA et al., 2012; MUELLER-LOEBNITZ et al., 2013; MULU et al., 2013).

Dentre as infecções nosocomiais de etiologia fúngica, destaca-se a candidemia, infecção na corrente sanguínea por leveduras do gênero *Candida*, a qual representa um alto risco de morbidade e mortalidade (PFALLER; DIEKEMA, 2007; VIJAYAKUMAR et al., 2012). Dentre as espécies isoladas em infecções fúngicas a mais incidente aos seres humanos é a *Candida albicans*; no entanto, vem sendo relatado aumento na incidência de candidemia por espécies de *Candida* não-*albicans*, tendo como principal isolado clínico a *C. parapsilosis*. As infecções por *C. parapsilosis* estão relacionadas ao uso de dispositivos médico-hospitalares, como cateteres, próteses e sondas uma vez que os isolados desta espécie possuem grande capacidade de aderir a essas superfícies e em conjunto com outros microrganismos se agrupam e formam o biofilme (LANTERNIER; LORTHOLARY,

2010; ROMEO et al., 2013). Demais espécies como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, entre outras, estão relacionadas a candidemia (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado a partir da amostra de sangue para verificar a presença de leveduras através de microscopia direta e realizar seu isolamento em cultura. Entretanto, esses procedimentos estão sendo complementados por métodos proteômicos, como estratégia de diagnóstico rápido através da técnica de *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) (PULCRANO, et al., 2013; VELLA, et al., 2013).

Um tratamento eficaz requer o diagnóstico precoce e uma terapêutica imediata para a infecção. Sendo assim, a determinação de um fármaco eficaz para o tratamento de infecções fúngicas é dado a partir da realização de testes de sensibilidade antifúngica *in vitro*, que pode mapear o perfil de sensibilidade/resistência do fungo aos fármacos (DEMITTO et al., 2012). Dentre as moléculas com ação fungicida para o tratamento de infecções nosocomiais, destacam-se as equinocandinas, como caspofungina, micafungina e anidulafungina, as quais têm como alvo molecular a parede celular fúngica, atuando na inibição da enzima β -1,3 D-glucano sintetase, componente estrutural da célula (BRANCO et al., 2012).

No entanto, tem sido observada a resistência de algumas espécies a esse grupo de antifúngicos. Segundo Walker et al. (2013), a *Candida parapsilosis* é resistente a caspofungina devido a espessa parede celular de quitina. Além disso, outro mecanismo de resistência seria mutações no gene FKS1 responsável por sintetizar a subunidade catalítica do complexo β -1,3-glucano sintetase (WILKE, 2011; BRANCO et al., 2012; ROMEO et al., 2013). A micafungina é indicada apenas para o tratamento de infecções fúngicas que acometem recém-nascidos e neonatos prematuros e a administração da anidulafungina é indicada no tratamento de pacientes internados em UTI, por apresentar raros efeitos colaterais em humanos (WILKE, 2011; BRANCO et al., 2012; ROMEO et al., 2013).

A obtenção de espectros proteicos pelo MALDI-TOF MS podem evidenciar mudanças mínimas no perfil proteômico associada com os *breakpoints* de sensibilidade ou resistência antifúngica correlacionados ao isolado clínico. Assim, essa técnica poderá, em um futuro próximo, auxiliar na escolha da administração

terapêutica em tempo oportuno e exclui a necessidade de realização de testes que exigem um tempo específico, considerado longo para a resposta (VELLA et al., 2013; WALKER et al., 2013).

1.1. PROBLEMATIZAÇÃO

O diagnóstico laboratorial para Infecções Fúngicas Invasivas é *time-consuming*, compromete o início do tratamento de pacientes internados em UTIs, levando em muitos casos ao diagnóstico pós-morte. Além disso, as leveduras advindas dos pacientes internados em UTIs se apresentam cada vez mais resistentes aos antifúngicos, levando então há uma resistência medicamentosa. Através de um diagnóstico rápido e seguro, pode ser realizada a instituição terapêutica eficaz, sendo necessário realizar testes de sensibilidade que permitam prever qual fármaco terá uma boa resposta terapêutica, de forma rápida e segura.

1.2. OBJETIVOS

1.2.2. Objetivos Gerais

Diagnosticar infecções fúngicas da corrente sanguínea, em pacientes internados em UTI, identificar os isolados do complexo *Candida parapsilosis lato sensu* (*Candida parapsilosis stricto sensu*, *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis*) através da técnica proteômica *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) e correlacionar a sensibilidade/resistência às equinocandinas com mudanças no espectro protéico.

1.2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter amostras sanguíneas de pacientes internados na UTI através de punção venosa;
- Realizar diagnóstico de candidemia a partir das amostras clínicas, através da cultura micológica;
- Proceder a taxonomia dos isolados clínicos de *Candida* pela técnica de *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) dos isolados clínicos;
- Determinar a concentração inibitória mínima dos isolados frente a equinocandinas através dos documentos M27-A3 e M27-S4 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI);
- Caracterizar espectralmente a mudança mínima do perfil protéico dos isolados identificados como *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* através de MALDI-TOF MS;
- Correlacionar a concentração inibitória mínima com a mudança no perfil protéico de cada isolado;
- Correlacionar os resultados obtidos nos testes de microdiluição em caldo (CLSI) com os obtidos pelo MALDI-TOF MS.

1.3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

1.3.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

As coletas foram realizadas em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva por profissionais de saúde dos setores, de acordo com solicitação médica, do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE), Hospital Agamenon Magalhães da Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco (HAM/SES/PE) e do Hospital Getúlio Vargas da Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco (HGV/SES/PE). Foram incluídos pacientes com suspeita de candidemia, sem limitação de idade, sexo e doenças preexistentes. Três amostras de sangue venoso foram coletadas assepticamente em dias consecutivos, por punção venosa em tubos Vacutainer® com EDTA e posteriormente, incubados em tubos contendo meio Brain Heart Infusion-BHI a 37° C para o isolamento do agente etiológico.

1.3.2. DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO

Concomitantemente, as amostras clínicas foram semeadas em duplicata na superfície do meio ágar Sabouraud (DIFCO) adicionado de 50 mg/L de clorafenicol contido em placas de Petri, mantidas em temperaturas de 30° C e 37° C por até 15 dias (LACAZ et al., 2002). Após o surgimento das colônias, foram purificadas e identificadas por proteômica através de Espectrometria de Massas pela técnica de MALDI-TOF MS (PULCRANO et al., 2013).

1.3.3. ANÁLISE PROTEÔMICA

Para identificação foram utilizadas suspensões dos isolados clínicos de *Candida* cultivadas e mantidas em meio Dextrose Peptona Extrato de Levedura (YEPD) a 35° C por 24 horas. Os isolados foram submetidos à análise através da extração proteica por espectrometria de massas (MALDI-TOF Autoflex III Bruker Laser nd:yag smartbeam, Bruker Daltonick Inc., USA/Germany). Sumariamente, aproximadamente três a cinco colônias fúngicas foram transferidas para tubos Eppendorf de 1,5 mL misturadas completamente em 300 µL de água destilada e

esterilizada e agitadas ao vórtex. Em seguida adicionado 900 µL etanol absoluto, o conteúdo foi cuidadosamente homogeneizado e então centrifugado a 12.000 g durante 2 min; o sobrenadante foi descartado e o sedimento seco a temperatura ambiente. O pellet foi misturado com 50 µL de ácido fórmico (70%), levado ao vórtex, em seguida foi adicionado 50 µL de acetonitrila e homogeneizado sobre o vórtex. A solução foi então centrifugada a 12.000g durante 2 min, e 1 µL do sobrenadante foi colocado em duplicata sobre uma placa de aço, seco a temperatura ambiente a 25° C. Posteriormente, cada amostra foi revestida com 1 µL de solução de matriz, o qual consisti de uma solução saturada de α -ciano- Ácido 4 hidroxi-cinâmico (HCCA) em 50% de acetonitrila e 2,5% ácido trifluoroacético (concentração final: 10 mg HCCA/mL) e seca a temperatura ambiente a 25°C. A placa alvo em aço polido de MALDI-TOF MS foi subsequentemente introduzida no espectrómetro de massas para obtenção dos espectros proteicos.

Os espectros para determinação dos isolados a partir de cada perfil protéico foram obtidos através de um laser Nd:YAG (neodymium-doped yttrium aluminium garnet; Nd:Y₃Al₅O₁₂) de 1064nm, onde a intensidade do laser foi ajustada ligeiramente acima do limiar para a produção de íons. Um kit protéico (protein calibration standart I, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) com conhecidos valores de massa das proteínas, foram usadas para calibração. A variação de massa entre 2.000 a 20.000 Da foi registrado usando modo linear com pulso de 104 ns em uma voltagem de +20 kV. Espectros finais foram gerados através da soma de 300 tiros de laser acumulados por perfil e oito perfis produzidos por amostra, levando a um total de 2.400 disparos de laser somados por espectro. A lista de picos obtidos foi exportada ao software Biotyper™ (Biotyper system, versão 3.0) onde as identificações finais foram determinadas. Identificação através do software Biotyper™ foi baseada apenas na presença ou ausência de cada pico no espectro. Os resultados da identificação proteômica foram comparados com a identificação automatizada Vitek 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) realizada no Laboratório das referidas Unidades de Saúde (JÚNIOR et al., 2014).

1.3.4. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

A técnica utilizada seguiu o protocolo M27-A3 (CLSI, 2008). O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com L-glutamina e sem bicarbonato

de sódio, pH $7,0 \pm 0,1$, com ácido morfolino propano sulfônico (MOPS; $0,165 \text{ mol.L}^{-1}$; Sigma-Aldrich). O meio de cultura foi esterilizado em membranas de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ (Millipore, Darmstadt, Alemanha). Os agentes antifúngicos comerciais utilizados foram da classe das equinocandinas (Pfizer, Nova York, EUA), preparado em Dimetil sulfóxido (DMSO) e fluconazol (Pfizer, Nova York, EUA) preparado em água deionizada. Concentrações da caspofungina, anidulafungina e micafungina foram preparadas e usadas nos intervalos de $0,03$ a $16 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, e do fluconazol nos intervalos de $0,125$ a $64 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os isolados clínicos de *Candida* obtidos a partir das hemoculturas foram mantidos em meio Agar Sabouraud Dextrose (SDA) e incubados a 35°C por 24 horas. As suspensões dos isolados foram preparadas em solução salina, e sua densidade ajustada de acordo com a escala 0,5 de MacFarland em 90% da transmitância utilizando um espectrofotômetro a 530nm . O volume do inóculo foi ajustado para $5,0 \text{ mL}$ de solução salina esterilizada e, posteriormente, diluído em RPMI 1640 para uma concentração de $2\text{-}5 \times 10^3 \text{ céls.mL}^{-1}$.

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

1.3.5. DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA PELO MALDI-TOF MS (TSA-MS)

O TSA-MS foi realizado de acordo com Marinach et al. (2009) com modificações, sendo essas o inóculo e dez diferentes concentrações avaliadas. Extratos proteicos dos isolados do complexo *C. parapsilosis* foram obtidos a partir de uma suspensão de 10^7 células/mL, cultivadas em meio RPMI contendo diluições seriadas de caspofungina, anidulafungina e micafungina ($16\text{-}0,03125\mu\text{g/mL}$) em placas de microtitulação e mantidas a 37°C sob agitação por 15h. Suspensão em RPMI sem adição de antifúngico foi utilizada como controle negativo. As células foram lavadas duas vezes em água destilada esterilizada e ressuspensa em ácido fórmico a 10%. Um microlitro de cada suspensão fúngica foi alicotada e dispensada diretamente, em duplicata, sobre o spot da placa em aço polido (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), e em seguida, foi adicionado $1 \text{ }\mu\text{L}$ de etanol absoluto e $1 \text{ }\mu\text{L}$ de

solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em acetonitrila a 50% - ácido trifluoracético a 2,5%, deixando secar a temperatura ambiente a 25° C.

Aferições espectrais foram realizadas com o equipamento (Bruker Daltonics) dentro de uma variação de massa de 3.000 a 8.000 Da e registrados em modo linear positivo (CAROLIS et al., 2012). Para cada experimento, espectros foram obtidos do total de 10 concentrações de cada um dos três antifúngicos e do controle livre de droga, e foram importados e analisados ao software MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics; CAROLIS et al., 2012). A ferramenta do MALDI Biotyper nomeada Índice de Correlação de Composto (ICC) foi utilizada como método estatístico para analisar a relação entre os espectros (DEGAND et al., 2008).

Os espectros brutos foram divididos em 12 intervalos do mesmo tamanho (417 Da cada) e a composição de correlações cruzadas e auto correlações de todos os intervalos, em termos de médias geométricas, foi utilizado como parâmetro de distância entre os espectros (VELLA et al., 2013). Valores de ICC próximo a um representa elevada conformidade de espectros, enquanto que valores ao redor de zero indica uma clara diversidade entre os espectros (VELLA et al., 2013).

Os resultados foram visualizados em uma matriz de correlação e traduzidos em “mapa calor”, onde espectros proximamente relacionados foram identificados em cores “quentes” e espectros não relacionados em cores “frias”, baseados em seus valores de ICC alto e baixo, respectivamente. Então, a sensibilidade do pico espectral de cada concentração foi comparada contra a concentração máxima e livre de droga. Finalmente, foi possível determinar a concentração mínima a alterar o perfil para o antifúngico avaliado; Um valor definido como a concentração da droga mais baixa ao qual um pico espectral é similar a aquele observado à concentração máxima do que o pico espectral observado à ausência de droga (CAROLIS et al., 2012).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.2. INFECÇÕES NOSOCOMIAIS POR LEVEDURAS DO GENÊRO *Candida*

Nos últimos anos é observado um aumento elevado no número de casos de infecções fúngicas, acometendo pacientes imunocomprometidos internados em Unidades de Terapia Intensiva. Esse aumento está diretamente relacionado com alguns fatores extrínsecos ou intrínsecos, sejam esses invasivos ou também relacionados a estratégias de tratamento para doenças de base. Pacientes imunologicamente comprometidos é o grande alvo para infecções nosocomiais, muitos destes, fazem uso de uma antibioticoterapia prolongada e/ou de amplo espectro, tratamentos oncológicos, ou são pacientes transplantados, os quais requerem uma atenção especial (IDELEVICH et al., 2014; PANDA et al., 2015).

Das infecções fúngicas nosocomiais, destaca-se a candidemia causada por *Candida* spp., agente endógeno ou exógeno oportunista, sendo o quarto isolado mais comum em infecções invasivas em adultos. As leveduras do gênero *Candida* se destacam como um dos principais agentes patogênicos que colonizam e infectam o hospedeiro humano e representa cerca de 80% das infecções fúngicas sistêmicas. Essa infecção da corrente sanguínea é uma enfermidade de gravidade elevada, que prolonga o tempo de internação hospitalar e eleva os custos de hospitalização, além de apresentar alta taxa de morbimortalidade em pacientes críticos (GHANNOUM et al., 2009; IDELEVICH et al., 2014; LIMA-NETO et al., 2014; WANG et al., 2014). É notória a preocupação de médicos e profissionais da saúde com o quadro clínico dos pacientes com Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde (IRAS) por alguma espécie do gênero *Candida*, já que são agentes comensais, causadores de infecções oportunistas principalmente em recém-nascidos, como também adultos internados em UTI. Segundo Silva et al. (2015), espécies de *Candida* tem sido o terceiro microrganismo isolado de sangue responsável por causar sepse em neonatos.

As leveduras do gênero *Candida* se apresentam como comensais em humanos colonizando a pele e as superfícies de mucosas, como as do trato gastrointestinal e trato urogenital. Além da limitação dos nutrientes, essas leveduras estabelecem uma relação de competição com as bactérias da microbiota, desta forma, exercem uma pressão seletiva, o que resulta na eliminação dos microrganismos menos adaptados,

tendo então um equilíbrio entre as populações microbianas nos tecidos colonizados (PAM et al., 2012).

Com o sistema imunológico debilitado, ocorre um desequilíbrio entre os microrganismos que vivem comensalmente na microbiota, e torna o meio propício para instalação da infecção. Sendo essa levedura oportunista e não patógena, para iniciar um processo patológico, será necessário atravessar barreiras biológicas como pele, trato respiratório, trato gastrointestinal e trato geniturinário. Essas leveduras tem a capacidade de expressar alguns fatores de virulência que são expressos geneticamente ou quando as mesmas são submetidas a determinadas condições. Dentre esse fatores de virulência destacam-se: adesão, formação de biofilme, alterações fenotípicas e morfológicas como a filamentação e secreção de enzimas que resultam no início do processo patológico (CORTÉS e RUSSI, 2011; SEGUIR et al., 2014).

Embora a espécie *C. albicans* seja o agente etiológico mais comum e mais patogênico aos seres humanos outras espécies de interesse clínico vem sendo isoladas. Dentre as espécies envolvidas as mais prevalentes são *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; SILVA et al., 2015). Segundo XIAO et al. (2014), o isolamento das espécies fúngicas varia de acordo com a região, onde na América do Norte a espécie mais isolada é a *C. albicans* seguida de *C. glabrata*. Na Europa, Austrália, América Latina e Ásia as espécies mais isoladas são *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Na Índia, a maior prevalência de candidemia é por espécies de *C. tropicalis* (XIAO et al., 2014). O aumento de espécies do gênero *Candida*, está relacionado às condições do parto, prematuridade e suas consequências, presença de equipamentos invasivos e uso de antibióticos de amplo espectro; porém, o maior e principal fator é a colonização prévia por *Candida* spp. em pacientes com risco elevado de desenvolver candidemia (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; MIRANDA et al., 2012)

2.3. COMPLEXO *Candida parapsilosis*

C. parapsilosis foi isolada pela primeira vez por Ashford como uma espécie de *Monilia* que era incapaz de fermentar maltose a partir das fezes de um paciente com diarreia em Porto Rico em 1928 (ASHFORD et al., 1928). A espécie foi nomeada *Monilia parapsilosis* para distingui-lo do isolado mais comum, *Monilia psilosis*,

conhecido na atualidade como *C. albicans*. Inicialmente *C. parapsilosis* foi identificada como o agente de um caso fatal de endocardite em um usuário de drogas intravenosas em 1940 (JOACHIM; POLAYES, 1940).

Estudos baseados no *Multilocus Sequence Typing* (MLST) sugeriram que os grupos II e III de *C. parapsilosis* constituíssem novas espécies, sendo nomeadas como complexo *C. parapsilosis*. O mesmo foi redefinido com três espécies distintas sendo *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, respectivamente, mantendo o grupo I como *C. parapsilosis stricto sensu*. Assim, o complexo *C. parapsilosis* passou a ser formado por *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Com isso, a distinção entre as três espécies só é possível por meio de análises genômicas (TAVANTI et al., 2005) e proteômicas (YAMAN et al., 2012).

Infecções por espécies de *Candida* não-*Candida albicans* vem emergindo como uma grande ameaça para pacientes hospitalizados. É observado que a candidemia tem se tornado mais frequente e a espécie mais envolvida nessas Infecções Fúngicas Invasivas (IFIs) é o complexo *C. parapsilosis*. A transmissão desse agente fúngico invasivo dá-se principalmente de forma horizontal através de fontes contaminadas como dispositivos médicos ou fluidos, cateteres intravenosos, nutrição parenteral e das mãos de profissionais de saúde (BLANCO-BLANCO et al., 2014). É um patógeno que apresenta considerável capacidade de formar biofilme e, com isso, alta afinidade com cateteres e dispositivos intravasculares. Dessa forma, dentre os fatores contribuem para a disseminação e a permanência da levedura no ambiente hospitalar, destaca-se aderência às células epiteliais e endoteliais do hospedeiro, formação de biofilme e secreção de enzimas hidrolíticas, tais como peptidases e lipases (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; MCDOUGALD et al., 2012; BLANCO-BLANCO et al., 2014; SILVA et al., 2015).

As espécies do complexo *C. parapsilosis* demonstram semelhanças fenotípicas, no entanto, possuem diferenças em relação à virulência, sendo correlacionada com características epidemiológicas. Dessa maneira, o complexo *C. parapsilosis* tem sido uma das principais espécies em estudos epidemiológicos e análises baseadas em DNA, os quais mostram que 1-10 % das infecções e colonizações são causadas por *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*. Dentre os estudos que avaliam a virulência do complexo *C. parapsilosis*, observa-se que a *C. metapsilosis* tem sido a espécie que possui menor invasão e a menor prevalência em infecções humanas, enquanto que *C. orthopsilosis* e a *C. parapsilosis strictu*

sensu são capazes de invadir, colonizar e de infectar de forma mais grave o hospedeiro. Das três espécies, a *C. parapsilosis* é o patógeno mais frequente em infecções invasivas. É importante ressaltar que o complexo *C. parapsilosis* é considerado o segundo agente de candidemia mais importante na América Latina (GONÇALVES et al., 2010; BERTINI et al., 2013; CORDEIRO et al., 2014).

A literatura atual contém poucos dados relativos às distribuições e susceptibilidades aos antifúngicos destas espécies de *Candida*. O surgimento de cepas de *C. parapsilosis* com sensibilidade reduzida aos azólicos e que podem ser transmitidas por todo o ambiente hospitalar pode estar relacionada com a utilização extensiva de fluconazol em combinação com a higiene das mãos inadequadas e cuidados com o cateter venoso central em uma população de pacientes internados em UTIs. Além disso, sabe-se que a formação do biofilme apresenta níveis elevados de resistência aos antifúngicos mais comumente utilizados. Cerca de 60% das infecções hospitalares estão associadas a microrganismos oportunistas que possuem capacidade de adesão e formação de biofilme em dispositivos médicos e implantes cirúrgicos (PIRES et al., 2011; SILVA et al., 2013; XIAO et al., 2014).

De maneira geral, a versatilidade em se adaptar a diferentes habitats e a capacidade de formar biofilme são os principais fatores atribuídos à virulência da espécie. Através interação entre os microrganismos distintos que vivem em associação ocorre a formação do biofilme, com isso os mesmos, agrupam-se em uma matriz extracelular composta por substâncias poliméricas produzidas pelas próprias células, a qual possibilita a aderência irreversível a superfícies bióticas ou abióticas (GIOLO e SVIDZINSKI, 2010; SILVA et al., 2013; XIAO et al., 2014). A formação de biofilmes é um sistema fortemente regulado e depende da sinergia da expressão de uma variedade de genes e das condições ambientais durante o curso da infecção. O biofilme é regulado por um sistema de comunicação denominado *quorum sensing*, o qual depende da sinergia de expressão que é utilizado para controlar algumas características, como sobrevivência e determinantes de patogenicidade. (MCDOUGALD et al., 2012).

Portanto, a formação do biofilme por isolados de *C. parapsilosis* na corrente sanguínea se constitui um importante fator de virulência e mortalidade. Para algumas espécies confere maior resistência a terapia antifúngica, por limitar a penetração dos agentes antifúngicos através da matriz extracelular e por proteger as células fúngicas da resposta imune do hospedeiro. (TUMBARELLO et al., 2012).

2.4. DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO

O diagnóstico clínico e laboratorial deve ser rápido e confiável, tendo em vista a gravidade de uma candidemia, para que o tratamento possa ser iniciado oportunamente na tentativa de minimizar as elevadas taxas de mortalidade. Os métodos de diagnósticos para as espécies de *Candida* variam de acordo com a quantidade de solicitações requeridas e com as condições do laboratório, já que existem vários testes disponíveis no mercado possibilitando uma avaliação adequada (HINRICHSSEN et al., 2008; MIKULSKA et al., 2010; DANNAOUI, 2013; HAZEN, 2013).

A identificação convencional se baseia em características morfológicas. Os meios de cultivo utilizados são ágar Sabouraud dextrose (ASD) para isolamento. As amostras clínicas são semeadas em duplicata na superfície do meio ágar Sabouraud suplementada de 20 mg/L (a 2%) de cloranfenicol contido em placas de *Petri*, mantidas à temperatura de 25° C e 37° C por até 15 dias, para posterior identificação, taxonômica, as leveduras produzem colônias glabras, de coloração branca ou bege, com textura cremosa e superfície lisa (SIDRIM; ROCHA, 2004; BOFF et al., 2008; SOARES et al., 2011).

O diagnóstico através do exame direto e cultura se torna fundamental e auxilia na escolha terapêutica para o paciente, sendo o isolamento do agente a partir da hemocultura o padrão ouro. Os métodos utilizados para a identificação e diferenciação das leveduras são: 1) observações morfológicas; 2) testes bioquímicos como auxonograma que averigua a assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e zimograma que observa a fermentação de carboidratos; 3) desenvolvimento em meios cromogênicos e 4) análises moleculares. As análises moleculares são consideradas padrão ouro devido à alta sensibilidade e especificidade para a resposta. No entanto, são necessários profissionais especializados e a aquisição de equipamentos onerosos. A identificação através de meios cromogênicos é bastante eficiente, principalmente quando se tem mais de uma espécie envolvida na amostra, no entanto a interpretação é subjetiva, o que pode comprometer a qualidade do resultado (BOFF et al., 2008; SOARES et al., 2011; ANDRADE et al., 2012).

A completa identificação taxonômica e fenotípica é *time-consuming*, podem levar vários dias para que o laudo laboratorial seja liberado, e devido a essa morosidade nos últimos anos se incorporou a espectrometria de massas para

identificação de isolados clínicos, possibilitando um resultado rápido e confiável (YAMAN et al., 2012).

2.5. IDENTIFICAÇÃO POR MALDI-TOF MS

Nos últimos 15 anos, o MALDI-TOF MS vem evoluindo cada vez mais se tornando uma ferramenta indispensável para microbiologistas e pesquisadores, mostrando ser um avanço para a tecnologia. Tornou-se um método que analisa uma variedade de macromoléculas de origem biológica a partir de células e tecidos. Sua alta precisão e sensibilidade, o tornou um método físico-químico promissor para os laboratórios clínicos a fim de facilitar a identificação de biomoléculas em amostras complexas, incluindo peptídeos, proteínas, oligossacarídeos e oligonucleotídeos. Frequentemente, observa-se um enorme aumento da proteômica, utilizando a técnica do MALDI-TOF MS para identificação proteica, podendo ser utilizada também como biomarcadores de doença (NOMURA, 2015; SUAREZ et al., 2015).

O princípio do MALDI-TOF MS era que moléculas de massas com cerca de 500-1000 Da não pudessem ser isoladas fora dos ambientes naturais, nem utilizar análises a vácuo em um espectrômetro de massas, sem excessiva fragmentação. Durante o final da década de 1960, Beckey introduziu a primeira técnica a *Field Desorption* (FD) abrindo o início da *Mass Spectrometry* (MS) ou espectrometria de massas de moléculas biorgânicas. Vastola e Pirone em 1966, já tinham demonstrado espectros de compostos orgânicos, através do *Time of Flight* (TOF) espectrômetro de massa de tempo de voo. Assim, no ano de 1974 R. Marfalande publicou o princípio da dessorção, através de um bombardeamento de moléculas orgânicas com fissão de produtos do *Plasma Desorption* (PD). Surgiram assim, as primeiras tentativas de utilizar radiação a laser a fim de gerar íons para a espectrometria de massa, essas análises foram publicadas apenas alguns anos após a invenção do laser. Posteriormente, A. Benninghoven em 1975 propôs o *Secondary Ion Mass Spectrometry* (SIMS). A tentativa mais antiga de identificação foi relatada por Anhalt e Fenselau no ano de 1975, eles fizeram uma combinação de pirólise e espectrometria de massas, a fim de identificar bactérias Gram-negativas, sendo analisadas apenas moléculas de baixo peso. Em 1981, M. Barber introduziu o SIMS de compostos orgânicos dissolvidos em glicerol, através do *Fast Atom Bombardment* (FAB). Com as primeiras tentativas de dessorver amostras orgânicas

através da irradiação a laser foi que surgiu o conceito de uma matriz, a fim de facilitar a dessorção e o nascimento do íon (MARVIN et al., 2003; HILLENKAMP e PETER-KATALINIC, 2007).

Em 1980, foi possível analisar moléculas grandes como proteínas intactas utilizando espectrometria de massas. Paralelo a esses pesquisadores, Hillenkamp e Kaufman desenvolveram o *Laser Microprobe Mass Analyser* (LAMMA), sendo composta por um laser de rubi de dupla frequência com um comprimento de onda de 344nm no ultravioleta próximo (UV) (MARVIN et al., 2003; HILLENKAMP e PETER-KATALINIC, 2007). As primeiras publicações sobre o MALDI-TOF MS se deram por volta dos anos 80 por Tanaka e colaboradores.

Os espectros gerados pelo LAMMA apresentaram ruídos os quais desencadearam a descoberta do MALDI em 1984. O maior marco para o desenvolvimento da tecnologia foi dado em 1987 por Tanaka et al., (2002), que conseguiram ionizar grandes moléculas por laser através de uma matriz composta por partículas de cobalto e glicerol. Antes sem utilização de uma matriz, a ionização de moléculas não voláteis ou de grande peso molecular não era possível. Em 1996, Claydon et al. mostraram que o *fingerprints* de células bacterianas intactas, podiam ser obtidas de uma forma simples e rápida (CLAYDON et al., 1996; MARVIN et al., 2003; HILLENKAMP e PETER-KATALINIC, 2007; NOMURA et al., 2015). Por volta de 1998, foram realizadas outras publicações sobre o MALDI-TOF MS pelos pesquisadores Karas e Hillenkamp (MARVIN et al., 2003; HILLENKAMP e PETER-KATALINIC, 2007).

A demonstração da ionização de proteínas através da combinação de feixes de laser de determinado comprimento de onda e de uma matriz conferiu prêmio Nobel de química para Koichi Tanaka em 2002. A matriz foi o componente principal para o avanço do MALDI-TOF MS, já que por ser de natureza ácida, ajuda a romper as células e extrair proteínas, separar as moléculas de proteínas que são aderidas, além de absorver a energia do laser a provocando a dessorção das moléculas (TANAKA, 2002; HILLENKAMP e PETER-KATALINIC, 2007).

Os fundamentos da técnica de MALDI-TOF MS são a desabsorção/ionização de moléculas orgânicas intermediadas por uma matriz química. A matriz é um composto orgânico capaz de absorver radiação na região do espectro onde o laser opera. Após a cristalização da matriz junto a amostra, a placa é introduzida no espectrômetro de massas, onde é bombardeada com breves pulsos de laser, forma

íons na fase gasosa com a fragmentação mínima e uma ionização suave, seguido de aceleração de partículas em um vácuo através de um campo eletromagnético. Os íons são separados de acordo com o "peso", onde a quantidade de tempo que cada partícula demora a atingir o detector "voando" através de um tubo, depende da razão entre a massa e a carga, ou o chamado "*Time of Flight*", e os resultados são exibidos como uma série de linhas (espectro), que correspondem a diferentes fragmentos que se fragmentam da molécula original (TANAKA, 2002; NOMURA, 2015; SUAREZ et al., 2015).

A análise dos microrganismos consiste de três etapas: primeiro ocorrerá à ionização e dessorção de amostra onde a amostra e a matriz são depositadas sobre um suporte de metal (alvo), havendo a cristalização após evaporação dos solventes. Por conseguinte é submetido a um disparo de Feixe de laser de UV. A matriz tem como função absorver energia do laser, o que provoca a vaporização (dessorção) da amostra e ionização permitindo a formação de íons de diferentes massas. A segunda etapa, o voo, onde as moléculas ionizadas são, então, aceleradas e separadas em uma coluna ou tubo de voo. A aceleração é proporcional às moléculas dependente da carga (z) e inversamente proporcional à sua massa (m). O que permite individualizar moléculas de amostra de acordo com a razão de m/z . A terceira etapa, a detecção, onde a informação produzida é convertida em uma corrente elétrica e então, o sinal é amplificado e digitalizado de acordo com o tempo de voo (TOF). O resultado é gerado é um espectro de massas que é interpretado em forma de um gráfico. Assim, o eixo das abscissas corresponde à massa-carga (m/z) e o eixo y à intensidade no sinal (MARVIN et al., 2003; BOUGNOUX et al., 2013)

Ao analisar o padrão de fragmentos é possível de deduzir a estrutura da molécula. Após a análise das proteínas constituintes das cepas, o espectro de massa é gerado e interpretado como um *fingerprint* celular ou impressão digital de peptídeos e proteínas, os quais são únicos para o organismo a ser analisado e também pode ser denominado como mapeamento de massa dos peptídeos. Esta abordagem se tornou bastante eficaz na identificação de proteínas, e se baseia na medição precisa da massa de um grupo peptídico derivado de uma proteína específica seguida por proteólise. O espectro de massas de peptídeos identificados é exclusivo para cada tipo de microrganismo.

Esta técnica vem sendo empregada para identificação de leveduras onde, quantifica em segundos com precisão proteínas em abundância com massa entre

2.000 a 20.000 Da presente na amostra. As proteínas detectadas correspondem às proteínas celulares fúngicas, nomeadamente as proteínas ribossomais, embora outras proteínas citosólicas altamente abundantes também podem ser detectadas (MARVIN et al., 2003; MARTÍNES-LAMAS et al., 2011; ALANIO, 2013; NOMURA, 2015; SUAREZ et al., 2015).

Com sistemas comercialmente disponíveis a identificação é então determinada usando o software pré-fabricado que compara o perfil espectral do microrganismo com uma base de dados de referência. Atualmente existem três sistemas de MALDI-TOF MS comercialmente disponíveis para a identificação microbiana: Bruker MALDI Biotyper (Bruker Daltonics), bioMérieux VITEK MS (bioMérieux), Ettan MALDI-TOF (Amersham Biosciences). Uma vez que o espectro obtido por MALDI-TOF MS geralmente não são completamente idênticos aos da base de dados, um "valor score" (Bruker) ou "valor confiança" é atribuído com base nas semelhanças do organismo de testado com os espectros de referência.

O MALDI-TOF MS foi recentemente descrito como uma revolução por permitir uma identificação rápida e precisa de bactérias e fungos, e está se tornando uma importante ferramenta cada vez mais disponível em laboratórios de microbiologia clínica. Pode ser utilizado para a identificação de bactérias, tais como vários microrganismos Gram-positivos e Enterobacterias, bem como para a identificação de bactérias não fermentadoras e micobactérias. Além disso, muitos gêneros de diferentes fungos filamentosos incluindo a maioria dos dermatófitos (*Epidermophyton*, *Trichophyton* e *Microsporum*) e zigomicetos (*Rhizopus*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Cunninghamella* e *Lichtheimia*), além de leveduras de interesse clínico (*Candida* spp., e *Cryptococcus* spp.) são identificados com sucesso por MALDI-TOF MS. Outros gêneros de fungos como *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* também têm sido identificadas com sucesso por essa técnica (YAMAN et al., 2012; HRABÁČEK et al., 2013; PANDA et al., 2015).

2.6. SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA

Concomitante ao aumento no número de infecções de etiologia fúngica observa-se que o aumento no uso de antifúngicos. Diante disso, é observado a importância de realizar testes de susceptibilidade antifúngica *in vitro* para diagnosticar isolados clínicos que possuem mecanismos de resistência à antifúngicos de diferentes formulações (POSTERARO e SANGUINETTI, 2014). O controle do foco da doença é um pré-requisito para uma melhora clínica do hospedeiro, já que alguns fatores de risco e complicações da infecção tornam a terapêutica de difícil acesso. Adicionalmente, dependendo do *status* imunológico e da idade do paciente, seja ele idoso, adulto ou neonato, a instituição terapêutica será diferenciada (WANG et al., 2014).

Sabe-se que a profilaxia antifúngica é de grande importância para pacientes com alto risco de infecções oportunistas, principalmente em pacientes imunocomprometidos ou com doenças de base. Essa terapia precoce se torna uma estratégia importante devido o diagnóstico ser difícil e habitualmente obtido tardiamente, além disso, em alguns casos há falta de infraestrutura laboratorial. Estudos mostram que a escolha inadequada do esquema antimicótico leva ao aumento da taxa de morbimortalidade em pacientes sépticos, portanto, o tratamento deve ser iniciado logo após a identificação do microrganismo. Fatores como agentes microbianos que são encontrados na natureza em forma de vida livre, em reservatórios animais ou fazendo parte da microbiota do hospedeiro, além do tratamento prolongado, dificultam a escolha do fármaco adequado (FLEMING et al., 2014; SEGHIR et al., 2014).

A partir do conhecimento sobre a patogenicidade da levedura, novas terapêuticas têm sido estudadas para auxiliar o tratamento das infecções. Os antifúngicos de escolha para o tratamento das candidíases podem ser administrados na forma oral e intravenosa, dependendo do fármaco escolhido para a terapêutica. Sendo assim, a escolha de um fármaco para o tratamento é instituída pelo clínico, que avaliará a resposta imunológica do paciente frente à infecção (PFALLER et al., 2008; RAMESH et al., 2011; FU et al., 2012; SHIBATA et al., 2012).

Portanto, o diagnóstico rápido e preciso indica o melhor antifúngico a ser utilizado no tratamento dessas infecções oportunistas. A determinação da melhor terapêutica é dada a partir da realização de testes de sensibilidade antifúngica *in*

vitro, o que irá determinar a resistência ou sensibilidade do fungo frente a um painel de moléculas bioativas, que propiciará uma terapia antifúngica eficaz (SEGHIR et al., 2014). O desenvolvimento de um agente antifúngico é um desafio porque há poucos alvos potenciais de ação que não sejam compartilhados entre os fungos e a espécie humana. O antifúngico ideal deve ter um amplo espectro de atividade, ter ação fungicida ao invés de fungistática, estar disponível em formulações oral e parenteral, causar poucas interações medicamentosas, ser seguro em doses eficazes, ter baixo custo-efetivo e ser estável à resistência microbiana. Além disso, as terapias antifúngicas atualmente disponíveis dependem da melhora da deficiência imunológica, o que em muitos pacientes não acontece (SEGHIR et al., 2014; SHIBATA et al., 2012).

Outros fatores para as limitações da terapêutica incluem características físico-química dos fármacos, que precisam ser altamente lipossolúveis para penetrar a parede do fungo, além das propriedades farmacocinéticas, especialmente relacionadas ao metabolismo e toxicidade e das propriedades farmacodinâmicas, uma vez que as diferenças entre as células eucarióticas do fungo e a do hospedeiro são pequenas, o que contribuem para existência de reações adversas (EL-MASHALD, MAHMOUD, 2011; RODRIGUES et al., 2011; WILKE 2011).

Dentre os antifúngicos utilizados para o tratamento de infecções sistêmicas se destacam os poliênicos (anfotericina B e anfotericina B com formulações lipídicas), derivados azólicos (itraconazol, fluconazol, posaconazol e voriconazol), flucitocina e as equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina; POSTERARO e SANGUINETTI, 2014).

Durante muitos anos o fármaco de escolha para tratamentos de infecções fúngicas sistêmicas foi a anfotericina B, que por apresentar baixa absorção oral é utilizada unicamente pela via intravenosa, sendo a maior desvantagem. Apresenta ainda elevada nefrotoxicidade aos pacientes, devido esse motivo atualmente vem sendo cada vez mais substituído pelos azólicos e equinocandinas para o tratamento dessas infecções (CORTÉS e RUSSI, 2011; WILKE, 2011).

Devido o elevado número IFIs, e o aumento da resistência antifúngica, a realização de testes de susceptibilidade *in vitro* têm se tornado um teste preditivo de grande valor terapêutico, já que tais testes possibilitam à seleção de agentes eficazes a fim de combater os fungos causadores de IFIs. Os testes de susceptibilidade antifúngica são padronizados internacionalmente pelo *Clinical*

Laboratory Standards Institute (CLSI) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e são baseados na medição do crescimento fúngico em diferentes concentrações do fármaco, de modo a determinar faixas de referências para a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de um determinado isolado clínico. Dessa maneira, o valor *in vitro* é determinado a fim de prever a eficácia terapêutica. Esses valores *in vitro* foram definidos a partir de correlações *in vivo*, os quais determinam os pontos de corte (*breakpoints*) para a interpretação dos resultados dos isolados clínicos, fornecendo um indicador útil a fim de orientar uma escolha terapêutica adequada (CLSI, 2008; MARINACH et al., 2009; PFALLER e DIEKEMA, 2012).

De acordo com o documento M27-A3, a CIM é definida como a menor concentração do antifúngico capaz de promover aproximadamente 50% de inibição do crescimento para as equinocandinas. O documento M27-A3 recomenda que a leitura do teste para espécies de *Candida* seja realizada após 24 horas frente as equinocandinas, porém após 48 horas frente aos azólicos, devido ao crescimento indefinido (denominado *trailing*) que seria uma inibição parcial promovida pelo fármaco ao decorrer das primeiras horas do teste em todas as concentrações estabelecidas. Esse tipo de ocorrência pode ser observado em alguns isolados clínicos, que com 24 horas parecem sensíveis e com 48 horas apresentam-se como resistentes. Portanto, pesquisas apontaram que isolados com esse tipo de comportamento devem ser classificados como sensíveis ao invés de resistentes devido ao crescimento indefinido dos mesmos. No ano de 2012 foi determinado através do quarto suplemento do documento M27-A3, denominado M27-S4, que os valores dos resultados para leitura dos testes com as equinocandinas serão categorizados como sensível (S), resistente (R) ou intermediário (I). Além dessa mudança, o suplemento M27-S4 estabeleceu *breakpoints* espécie-específicos para cada espécie de *Candida* (ESCHENAUER et al., 2007; CLSI, 2008; CLSI, 2012; PFALLER e DIEKEMA 2012; PFALLER et al., 2013).

2.7. EQUINOCANDINAS

O surgimento das equinocandinas veio a propor um mecanismo de ação único, tendo uma grande eficácia *in vivo*. A identificação dessa classe de antifúngicos deu-se no ano de 1974 com a anidulafungina. Investigações posteriores levaram em

1979 a descoberta da caspofungina, e a última molécula a ser sintetizada foi a micafungina em 1990, a partir do composto FK463. Esses fármacos só foram aprovados no ano de 2001 pelo *Food and Drug Administration* (FDA), sendo a caspofungina o primeiro comercialmente disponível, seguido em 2005 pela micafungina e em 2006 a anidulafungina (ESCHENAUER et al., 2007; CORTÉS e RUSSI, 2011; WILKE, 2011).

As equinocandinas são hexapeptídeos cíclicos *N*-acil ligados com cadeia lateral lipídica sinteticamente modificada, com peso molecular de aproximadamente 1200 Daltons (ESCHENAUER et al., 2007). Essa classe de fármacos é pertencente há um grupo de lipopetídeos semissintéticos obtidos a partir da fermentação de vários fungos e derivam das seguintes espécies: caspofungina pneumocandina B0 de *Glarea lozoyensis*, a micafungina do hexapeptídeo de FR901370 *Coleophoma empedri* e a anidulafungina B0 de *Aspergillus nidulans* (ESCHENAUER et al., 2007; CORTÉS e RUSSI, 2011).

Sendo inicialmente conhecida como pneumocandinas, devido à sua atividade contra *Pneumocystis carinii*, essa classe de fármacos ficou conhecida como os primeiros membros do grupo lipopéptidico que possuem ação na inibição da enzima β -1-3-*D*-glucano-síntetase, sendo essa responsável pela síntese da parede celular dos fúngica. O β -1-3-*D*-glucano é um complexo enzimático composto por duas subunidades codificadas pelos genes FKS1 e FKS2. Com isso, o β -1-3-*D*-glucano apresenta-se como um constituinte estrutural da célula do fungo, sendo capaz de manter a integridade e rigidez da parede celular. O bloqueio de sua síntese resulta em desequilíbrio osmótico, prejudicando a viabilidade do microrganismo (DENNING, 2003; ESCHENAUER et al., 2007). As equinocandinas têm efeitos fungicidas nas leveduras e fungistáticos nos fungos filamentosos e a resistência a estes antifúngicos é baixa. A administração é apenas endovenosa, o seu espectro de ação é limitado para o uso em infecções mais graves. Seu alvo terapêutico é diferente dos agentes antifúngicos mais utilizados, os quais têm como alvo celular o ergosterol sendo esse, um esterol predominante dentro das membranas das células dos fungos (ADERIYE e OLUWOLE, 2015; MONTAGNA et al., 2015).

A caspofungina foi à primeira equinocandina licenciada, sendo indicada para candidíase esofágica, candidemia, candidíase invasiva e terapia empírica em pacientes com neutropenia febril, a resposta terapêutica geralmente é comparada com a anfotericina B e fluconazol. A micafungina foi aprovada para o uso em

candidíase esofágica, candidíase invasiva incluindo candidemia e para profilaxia de infecções por *Candida* em pacientes submetidos a Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH). Atualmente as indicações para o uso da anidulafungina são candidíase esofágica, candidemia e candidíase invasiva (PERLIN, 2007; CORTÉS e RUSSI, 2011; WILKE, 2011; CAROLIS et al., 2012).

A maioria dos fungos possui o β -1-3-D-glucano como constituinte da parede celular, no entanto, isso varia entre diferentes espécies, sendo mais predominante nas espécies de *Candida* e *Aspergillus*, do que em formas de levedura dos fungos dimórficos. É observado que as paredes celulares das formas filamentosas de *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* e *Paracoccidioides brasiliensis* também contém quantidades significativas de 1,3- β -D-glucano, enquanto nos zigomicetos existe uma ausência desse componente estrutural. Em contrapartida é observado que nem sempre a presença desse composto garante atividade das equinocandinas contra isolados clínicos. Um exemplo é parede celular de *Cryptococcus neoformans*, a qual contém β -1,3-D-glucano componente essencial para o seu crescimento, no entanto, as equinocandinas não demonstram uma atividade antifúngica eficaz frente a esse patógeno. Outro fator importante é que as equinocandinas são altamente eficazes frente a leveduras tais como *C. glabrata* e *C. krusei* resistentes a derivados azólicos, além de ter uma boa resposta para alguns biofilmes de espécies de *Candida* (MALIGIE e SELITRENNIKOFF, 2005; ESCHENAUER et al., 2007; PERLIN, 2015).

Atividade das equinocandinas frente *Candida* spp. mostra que as CIMs são bem mais baixas que anfotericina B e fluconazol, com exceção de *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*, contra o qual eles são semelhantes. O CLSI (2012) estabeleceu no suplemento M27-S4 orientações para a interpretação da CIM para cada espécie de *Candida*. Portanto, os testes de susceptibilidade antifúngica *in vitro* de *Candida parapsilosis* frente às equinocandinas é dita como sensível com o valor ≤ 2 μ g/mL, intermediária com o valor de 4 μ g/mL e resistente com o valor ≥ 8 μ g/mL, estabelecendo então *breakpoints* para diferenciar mutantes resistentes de isolados sensíveis (PFALLER et al., 2008; CLSI, 2012; CORDEIRO et al., 2014; IDELEVICH et al., 2014).

2.8. DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA POR MALDI-TOF MS

A aplicação da espectrometria de massas pela técnica de *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Time-of-Flight* (MALDI-TOF) vem se desenvolvendo cada vez mais, sendo inicialmente aplicada em identificação de bactérias e fungos em muitos laboratórios clínicos. Outras aplicações têm sido abordadas, incluindo a identificação da resistência aos antibióticos. A pesquisa nesse contexto tem direções principais, incluindo a detecção de antibiótico por modificações nas enzimas degradantes, a detecção de mecanismo de resistência determinantes por meio de estudos de proteômica de bactérias multirresistentes, e a análise das modificações de locais (alvo), tais como metilação do ribossomo. Além disso, a quantificação de antibióticos é sugerida como uma nova abordagem para estudar influxo e efluxo em células bacterianas (GRIFFIN et al., 2012; HRABÁK et al., 2013).

Griffin et al. (2012), mostra alterações nos espectros de massa de cepas de *Staphylococcus aureus* no teste de susceptibilidade a meticilina. Além disso, MALDI-TOF MS foi capaz de detectar a resistência a teicoplanina glicopéptido (MAJCHERCZYH et al., 2006). No ano seguinte, a técnica também foi usada para a análise genética determinando resistência *Streptococcus pneumoniae* a fluoroquinolonas, através da detecção de mutações nas estruturas alvo, antes isso só era capaz de ser detectado fenotipicamente (MELAKHOVA et al., 2007). Em 2013, Hrabák et al., utiliza o MALDI-TOF MS para monitorizar a atividade *in vitro* de carbapenemases, isto é, o produto de degradação do carbapenem hidrolisado e descarboxilado.

Pesquisas atuais mostram a possibilidade de utilizar sistemas de espectrometria de massa (MS), especificamente MALDI-TOF a fim de identificar certos mecanismos de resistência enfatizando as vantagens na utilização. Com isso deve ser destacado que o custo de cada determinação é claramente menor do que as técnicas moleculares clássicas para a detecção de genes envolvidos na resistência. Além disso, a detecção de resistência por MALDI-TOF reduz o tempo de obtenção de resultados em comparação com métodos de rotina utilizados com mais frequência (HRABÁK et al., 2013; ZBOROMYRSKA et al., 2014).

Em contraponto ao uso do MALDI-TOF, estudos evidenciam uma falta de correlação dos testes de sensibilidade antifúngica *in vitro* e a clínica *in vivo*, contudo sabe-se que para uma terapêutica eficaz em pacientes com infecções fúngicas é

necessária a realização de testes laboratoriais *in vitro*, a fim de determinar a concentração do antifúngico a ser utilizado no tratamento. Dentro desse contexto, existe a discordância dos testes de susceptibilidade, que pode conter um erro de classificação de uma cepa resistente categorizada como sensível ou vice-versa. A partir disso, emerge a ideia do desenvolvimento de um teste preciso e confiável possibilitando benefícios econômicos significativos, bem como melhoria na qualidade da assistência ao paciente (MARINACH et al., 2009; CAROLIS et al., 2012; SARACLI et al., 2015).

Embora a detecção de mecanismos de resistência antibacteriana através da espectrometria de massas se encontre relativamente avançada com dezenas de publicações, o uso dessa metodologia para detecção de resistência antifúngica deu o primeiro passo em 2009 com uma publicação de Marinach e colaboradores. A partir desse ano, mais três pesquisas foram publicadas totalizando apenas quatro até o presente momento (CAROLIS et al., 2012; VELLA et al., 2013; SARACLI et al., 2015).

Marinach et al. (2009) descreveram uma mudança mínima no perfil proteico detectado por MALDI-TOF, para cepas de *C. albicans* frente fluconazol, ou seja, a concentração mais baixa de droga em que uma alteração na massa no perfil espectral pode ser detectada após exposição por 15 hs, das cepas ao antifúngico. Houve uma concordância 94% entre a categorização das cepas a partir dos resultados de CIM em relação ao MALDI-TOF. Através de observações, os pesquisadores criaram o *Minimal Profile Change Concentration* (MPCC). Para isso uma análise estatística é utilizada a fim de calcular o valor baseado na massa e intensidade de cada pico gerado (MARINACH et al., 2009).

No ano de 2012, Carolis e colaboradores avaliaram 44 isolados fúngicos com e sem resistência associada a mutações FKS1. No teste foram incluídas 34 espécies do gênero *Candida* incluindo, 14 espécies de *Candida albicans*, quatro *Candida parapsilosis*, quatro *C. krusei* e dez isolados de *Aspergillus* incluindo, seis *Aspergillus fumigatus* e quatro *Aspergillus flavus*, para o teste também foram incluídas cepas controle *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258. As leveduras foram expostas em concentrações de 64-0.008 µg/mL frente a caspofungina e incubadas por 37°C sob agitação por 15 horas. Em seguida foi observada a Mudança mínima no Perfil Proteico e a partir desse, foi criada uma Matriz através dos Índices de Correlação dos Compostos (ICC). Com isso, eles

confirmaram as descobertas anteriores, que mostram que o TSA pelo MALDI-TOF MS é uma ferramenta reprodutível e confiável para teste de susceptibilidade antifúngica.

Em 2013, Vella *et alli* avaliaram através do Teste de Susceptibilidade Antifúngica (TSA) pelo MALDI-TOF MS, 65 espécies de *C. albicans* frente a caspofungina, incluindo 13 cepas com mutações FKS 1, com o período de três horas de incubação, onde foram avaliadas as concentrações 0 (Nula), 0,03 µg/mL (Intermediária) e 32 µg/mL (Máxima). Após a exposição das leveduras nas diferentes concentrações do fármaco com o período de 3 horas, foi possível observar a Mudança Mínima no Perfil Proteico e em seguida criar a Matriz ICC. Deste modo, a resistência de *C. albicans* a caspofungina pode ser rapidamente avaliada. Além disso, o TSA baseada no MALDI-TOF MS (TSA-MS) foram consistentes com as cepas com mutações em genes Fks1 e a metodologia de referência CLSI. A abordagem TSA-MS pode proporcionar uma metodologia rápida e confiável para detecção da resistência antifúngica e acelerar o início do tratamento com um fármaco adequado.

Recentemente, em 2015, Saracli e colaboradores avaliaram através da tecnologia do MALDI-TOF MS, a detecção de resistência antimicótica dos triazóis em 35 espécies de *C. albicans*, 35 espécies de *C. glabrata* e 37 espécies de *C. tropicalis*. As cepas foram expostas ao fluconazol, voriconazol ou posaconazol em duas concentrações diferentes além de um controle livre de droga, foi avaliada uma concentração média e uma concentração elevada para cada fármaco fluconazol 64 µg/mL, voriconazol e posaconazol 16 µg/mL.

No geral, concordância essencial entre MALDI-TOF MS e CLSI variou entre 54% e 97%, e foi maior para posaconazol contra *C. glabrata*. A reprodutibilidade de o ensaio de MALDI-TOF MS variou entre 54,3 e 82,9% e foi melhor para o fluconazol contra *C. albicans* e posaconazol contra *C. glabrata*. A reprodutibilidade também foi mais elevada para isolados de *C. glabrata* em comparação com *C. albicans* e *C. tropicalis*. Estes resultados demonstram que a MALDI-TOF MS ser usado para determinar simultaneamente as espécies de *Candida* e classificação como sensíveis ou resistentes aos antifúngicos triazólicos. Os espectros obtidos pelo MALDI-TOF MS foram utilizados para criar a Matriz ICC de cada isolado. Os resultados foram comparados com as classificações sensível ou resistente, medindo as CIMs de acordo com o CLSI. O ensaio pelo MALDI-TOF MS foi capaz de classificar

susceptibilidade aos triazóis de todas as espécies. Assim, eles concluíram que os resultados demonstram que o Teste de Susceptibilidade Antifúngica pelo MALDI-TOF MS pode ser usado para determinar a classificação de sensibilidade ou resistência frente as espécies de *Candida*. No entanto, mais estudos são necessários para refinar a metodologia e melhorar a reprodutibilidade deste ensaio.

3. ANÁLISE DOS RESULTADOS

3.1. OBTENÇÃO E DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO

As coletas das amostras clínicas ocorreram após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde (CCS) identificado pelo nº CAAE 35762214.2.0000.5208, e foram obtidas a partir do mês de agosto de 2014 até julho de 2015. As amostras sanguíneas positivas para *Candida* sp. foram enviadas ao Laboratório de Micologia Médica, onde realizou-se o exame direto da hemocultura para confirmar a presença de leveduras (Figura 1), em seguida, retirou-se 1 mL do sangue e semeou no meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose adicionado de clorafenicol em placa, a fim de obter apenas o crescimento fúngico sendo incubado em estufa a 37° C. Após 48 horas, observou-se o crescimento fúngico, onde foi retirado um fragmento da colônia e semeado em tubo para posterior identificação (Figura 2).

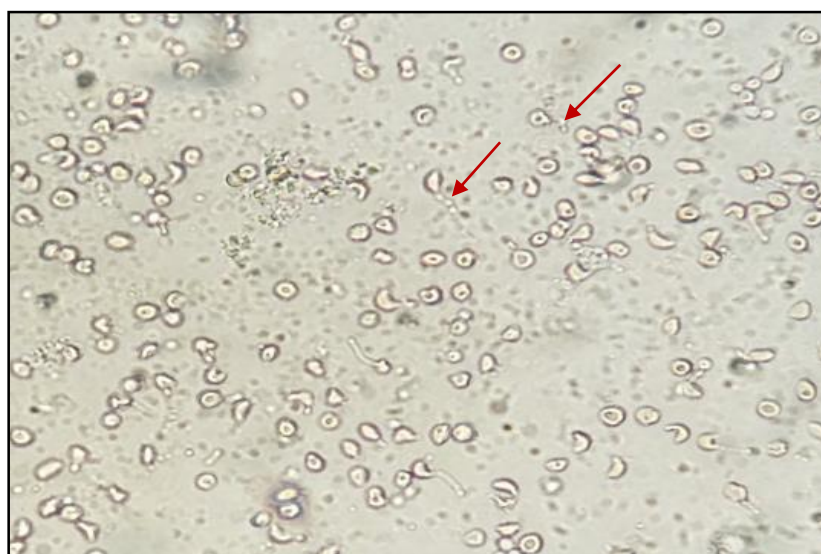


Figura 1. Exame direto a fresco a partir do sangue crescido em BHI evidenciando a presença de leveduras globosas, hialinas e brotantes (seta). Ampliação: 400x.

Durante o período de coleta, ocorreram 213 admissões na UTI do Hospital das Clínicas de Pernambuco (HCPE) e 20 casos confirmados de candidemia, acometendo treze pacientes do sexo masculino e sete feminino, com idades que variam de 0 a 68 anos e totalizando uma incidência de 93,89 casos a cada 1.000 admissões. A partir do levantamento dos dados, observou-se que os fatores de risco

correlacionados com essa infecção nosocomial, são as doenças de base, como o *Diabetes Mellitus*, o uso de dispositivos invasivos e uso prolongado de antibioticoterapia.

Adicionalmente, foram incluídas na pesquisa dez leveduras do complexo *Candida parapsilosis* isoladas de hemoculturas de pacientes internados na UTI do Hospital Getúlio Vargas (HGV) e 14 do Hospital Agamenon Magalhães (HAM), as quais totalizaram 30 leveduras do referido complexo quando adicionadas as seis leveduras obtidas no HCPE. As amostras do complexo *C. parapsilosis* advindas do Hospital Getúlio Vargas e do Hospital Agamenon Magalhães foram adicionadas a pesquisa a fim de totalizar 30 leveduras do complexo *Candida parapsilosis*.

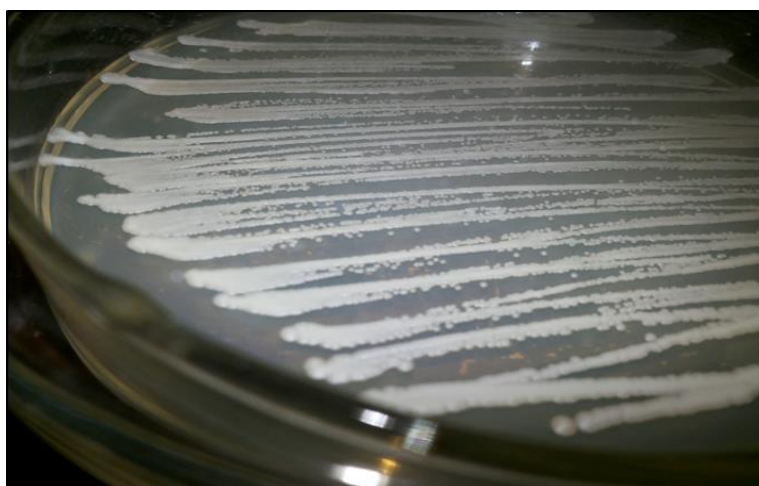


Figura 2. Colônias de isolado clínico de *Candida parapsilosis* com dois dias de desenvolvimento em meio ASD, incubado a 37° C, apresentando coloração branca a creme, com superfície lisa e textura glabrosa.

Durante o estudo foram isoladas 44 leveduras advindas de pacientes internados em UTIs das três Unidades de Saúde, onde os isolados mais frequentes foram 30 (68,1%) leveduras do complexo *C. parapsilosis*, sendo 26 (59%) *C. parapsilosis stricto sensu*, duas (4,5%) *C. orthopsilosis* e duas (4,5%) de *C. metapsilosis*. As demais leveduras isoladas foram dez (22,7%) de *C. albicans*, duas (4,5%) de *C. tropicalis*, uma de (2,2%) *C. haemulonii* e um isolado identificado apenas como *Candida* sp, pois o mesmo não se desenvolveu no meio sintético Ágar Sabouraud Dextrose, todas as leveduras foram identificadas através da espectrometria de massas pela técnica MALDI-TOF MS.

3.2. ANÁLISE PROTEÔMICA

A identificação por MALDI-TOF MS ocorreu através dos espectros obtidos que foram analisados por um algoritmo, o qual comparou os espectros brutos com os espectros da base de dados Biotyper™ versão 3.1, (Bruker Daltonics, Germany/USA), que identificou em nível de espécie as 43 leveduras com valores de registro (score) ≥ 2.0 . Quando a identificação apresentava um score abaixo de 2.0, foi realizada nova extração protéica do isolado para confirmação do resultado. Um exemplo do relatório de identificação dos isolados com seus respectivos scores estão exemplificados na Figura 3.

Bruker Daltonik MALDI Biotyper
Classification Results



Project Info:

Project Name:

Project Description:

Project Owner:

Project Creation Date/Time:

Project Analyte Count:

Project Type:

Validation:

Validation Position:

Regisalida_07/05/14

Bruker Project Description

Administrator

5/5/2014 9:37:42 AM

51

Development

not present

Result Overview

Analyte Name	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
122.2 (++) (A)	Candida parapsilosis	2.946	Candida parapsilosis	1.897
14495.1 (+) (B)	Candida orthopsilosis	1.697	not reliable identification	1.697
5551.2 (++) (A)	Candida parapsilosis	2.175	Candida parapsilosis	2.077
7199.2 (++) (A)	Candida metapsilosis	2.029	Candida metapsilosis	1.812
7491.1 (++) (A)	Candida parapsilosis	2.109	Candida parapsilosis	2.109
7755.2 (+) (B)	Candida metapsilosis	1.699	not reliable identification	1.699

Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	red

Figura 3. Resultados das leveduras identificadas pelo MALDI Biotyper. Fonte: Software MALDI Biotyper versão 3.1.

Os picos espectrais das leveduras do complexo *C. parapsilosis* possuem padrão espectral semelhante, com algumas diferenças no *fingerprint* celular, o que diferencia espectralmente uma das outras, conforme observado na Figura 4. Após análise proteômica, os isolados identificados em nível de espécie foram comparados

com o diagnóstico dos Laboratórios de Microbiologia dos referidos hospitais públicos, emitido através da automação Vitek II, conforme sumarizado na Tabela 1.

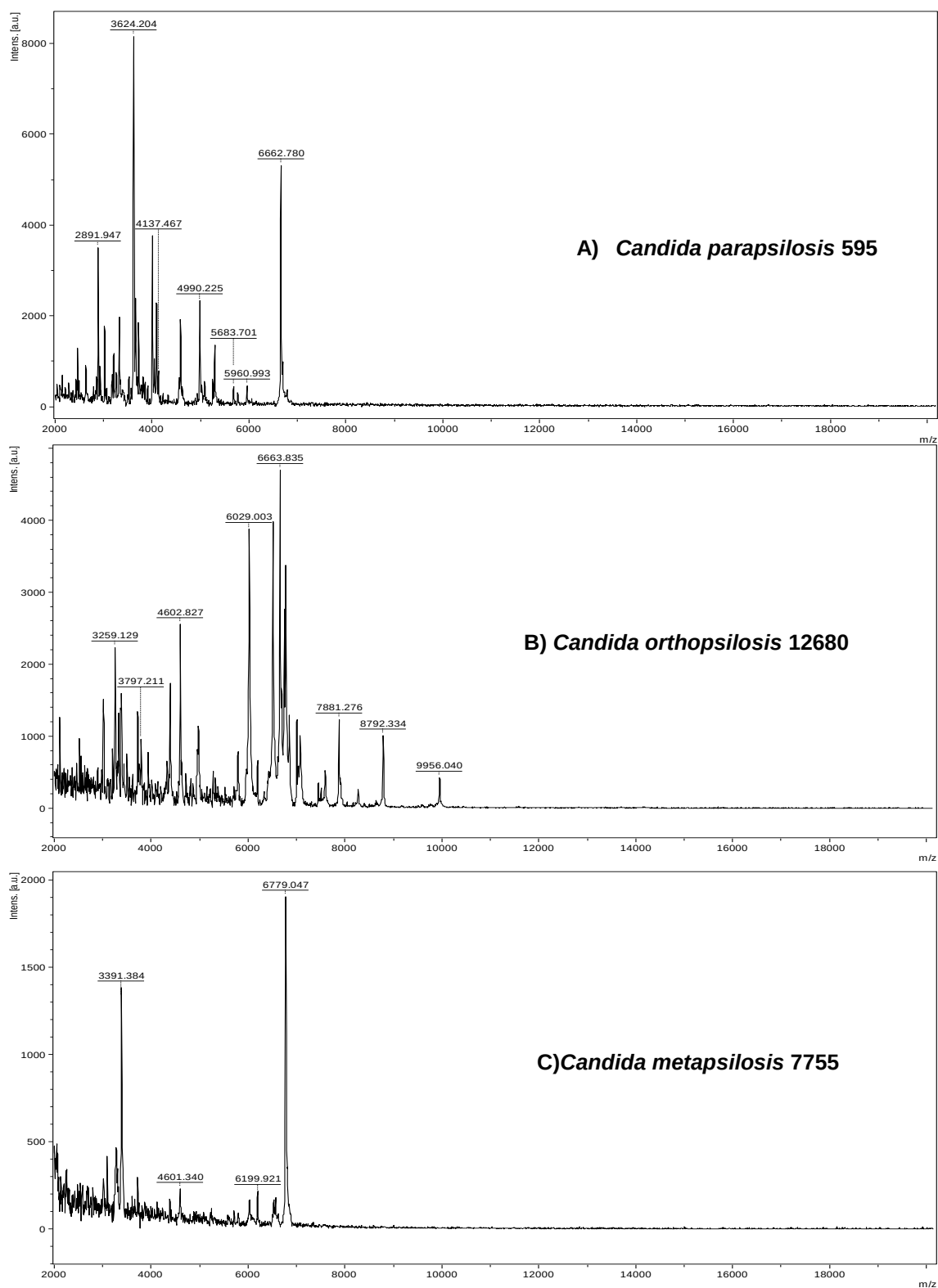


Figura 4. Plano espectral proteico de leveduras do Complexo *Candida parapsilosis**

*Obtido em Smartbean Autoflex III Bruker Daltonics. A) Espectro de massas do isolado *Candida parapsilosis stricto sensu* 595. B) Espectro de massas do isolado *Candida orthopsilosis* 12680. C)

Espectro de massas do isolados *Candida metapsilosis* 7755. Fonte: Software MALDI Biotyper™ versão 3.1.

Tabela 1.Comparação entre o diagnóstico pelo VitekII e o MALDI-TOF MS

Nº Isolado	Origem	Identificação Vitek II	Identificação MALDI-TOF MS
02/09	HGV	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
04/09	HGV	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
05/09	HGV	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
0701	HC	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida albicans</i>
121	HGV	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
122	HGV	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
251	HGV	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
344	HC	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida tropicalis</i>
345	HC	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida tropicalis</i>
346 A	HC	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
346 B	HC	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
347	HC	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida haemulonii</i>
445	HGV	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
451	HGV	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
459	HC	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida albicans</i>
460	HC	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida albicans</i>
473	HC	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida albicans</i>
474	HC	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
595	HC	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
596 A	HC	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
596 B	HC	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
630	HGV	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
653	HGV	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
658 A	HC	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida albicans</i>
658 B	HC	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida albicans</i>
2102	HC	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida albicans</i>
2402	HC	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida albicans</i>
2995	HAM	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
3990	HC	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida albicans</i>
5283	HAM	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
5551	HAM	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
5902	HC	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida albicans</i>
6085	HAM	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
7398	HAM	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida metapsilosis</i>
7491	HAM	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
7736	HAM	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
7755	HAM	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida metapsilosis</i>
9390*	HC	<i>Candida sp.</i>	-
9968	HAM	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
12680	HAM	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida orthopsilosis</i>
13531	HAM	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
14495	HAM	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida orthopsilosis</i>
13650	HAM	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
14659	HAM	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>

1.2 * NÃO HOUVE DESENVOLVIMENTO FÚNGICO EM MEIO SINTÉTICO ÁGAR SABOURAUD, IMPOSSIBILITANDO A IDENTIFICAÇÃO POR MALDI-TOF MS.

3.3. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

O teste de susceptibilidade antifúngica *in vitro* foi realizado com quatro antimicóticos, anidulafungina, caspofungina, micafungina e fluconazol, utilizando o protocolo M27-A3 e o suplemento M24-S4 do CLSI, frente as 43 leveduras que se desenvolveram em meio sintético.

Todas as leveduras (100%) foram sensíveis frente a anidulafungina; quarenta e duas (97,67%) foram sensíveis e apenas uma (4,6 %) foi resistente a caspofungina. Para micafungina, quarenta e duas (97,67%) foram sensíveis, e apenas uma (4,6%) foi intermediária. Em relação ao fluconazol trinta e seis (83,7%) das leveduras foram sensíveis, quatro (9,3%) foram susceptíveis dose-dependente e três (6,9%) isolados apresentaram resistência. O *breakpoint* com sua respectiva CIM de cada levedura se encontra sumarizado na Tabela 2. Todos os testes de sensibilidade foram realizados em duplicata para cada levedura.

Tabela 2. Teste de susceptibilidade antifúngica *in vitro* das 43 cepas de *Candida* isoladas a partir do sangue de pacientes internados nas UTIs dos hospitais HAM, HC, HGV, entre agosto de 2014 a julho de 2015.

Nº Isolado	Origem	Espécies isoladas	CIMs (µg/mL)			
			Anidula.	Caspo.	Mica.	Fluco.
02/09	HGV	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.25)	S (0.0625)	S (0.25)	S (1)
04/09	HGV	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.25)	S (0.25)	S (0.25)	S (0.5)
05/09	HGV	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.25)	S (0.25)	S (0.25)	S (1)
0701	HC	<i>Candida albicans</i>	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.125)
121	HGV	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.25)	S (0.125)	S (0.125)	S (0.5)
122	HGV	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.125)	S (0.25)	S (0.125)	SDD (4)
251	HGV	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.0625)	S (0.03125)	S (0.03125)	R (64)
344	HC	<i>Candida tropicalis</i>	S (0.03125)	S (0.25)	S (0.03125)	S (0.25)
345	HC	<i>Candida tropicalis</i>	S (0.03125)	S (0.25)	S (0.0625)	S (0.5)
346 A	HC	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.25)	S (0.25)	S (2)	S (0.25)
346 B	HC	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.25)	S (0.25)	S (2)	S(0.25)
347	HC	<i>Candida haemulonii</i>	S (<0.03125)	S(<0.03125)	S(<0.03125)	S(<0.125)
445	HGV	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.125)	S (0.25)	S (0.25)	S (0.5)
451	HGV	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.5)	R (8)	S (0.03125)	S (1)
459	HC	<i>Candida albicans</i>	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.0625)	S (0.25)
460	HC	<i>Candida albicans</i>	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.03125)	S(0.0125)
473	HC	<i>Candida albicans</i>	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.25)
474	HC	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.5)	S (0.5)	I (4)	S (1)
595	HC	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.25)	S (0.25)	S (1)	S (1)
596 A	HC	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.25)	S (0.25)	S (0.5)	S (1)
596 B	HC	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.25)	S (0.25)	S (0.5)	S (0.5)
630	HGV	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.0625)	S (0.0625)	S (0.0125)	S (2)

Continuação Tabela 2. Teste de susceptibilidade antifúngica in vitro das 43 cepas de *Candida* isoladas a partir do sangue de pacientes internados nas UTIs dos hospitais HAM, HC, HGV, entre agosto de 2014 a julho de 2015.

Nº Isolado	Origem	Espécies isoladas	MICs (µg/mL)			
			Anidula.	Caspo.	Mica.	Fluco.
653	HGV	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.125)	S (1)	S (0.25)	S (1)
658 A	HC	<i>Candida albicans</i>	S(<0.03125)	S (0.03125)	S(<0.03125)	S(<0.125)
658 B	HC	<i>Candida albicans</i>	S(<0.03125)	S (0.03125)	S(<0.03125)	S(<0.125)
2102	HC	<i>Candida albicans</i>	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.03125)	R (16)
2402	HC	<i>Candida albicans</i>	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.03125)	SDD (4)
2995	HAM	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.5)
3990	HC	<i>Candida albicans</i>	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.03125)	SDD (4)
5283	HAM	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.125)	S (0.0625)	S (0.25)	S (0.25)
5551	HAM	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.5)	S (0.125)	S (0.125)	S (0.5)
5902	HC	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.03125)	R (8)
6085	HAM	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.25)	S (0.5)	S (1)	S (0.5)
7398	HAM	<i>Candida metapsilosis</i>	S (0.03125)	S(<0.03125)	S(<0.03125)	S (2)
7491	HAM	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.5)
7736	HAM	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.25)	S (0.0625)	S (0.25)	S (2)
7755	HAM	<i>Candida metapsilosis</i>	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.03125)	S (2)
9390*	HC	-	-	-	-	-
9968	HAM	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.25)	S (1)	S (0.5)	S (2)
12680	HAM	<i>Candida orthopsilosis</i>	S (0.0625)	S (0.5)	S (0.0625)	SDD (4)
13531	HAM	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.03125)	S (2)
14495	HAM	<i>Candida orthopsilosis</i>	S (0.0625)	S (0.03125)	S (0.25)	S (2)
13650	HAM	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.25)	S (0.25)	S (2)	S (2)
14659	HAM	<i>Candida parapsilosis</i>	S(<0.03125)	S(<0.03125)	S(<0.03125)	S (2)
22019	ATCC	<i>Candida parapsilosis</i>	S (0.125)	S (1)	S (0.25)	S (2)

O valor da CIM foi definida como a menor concentração do agente antifúngico capaz de inibir o crescimento fúngico. I, Intermediário; CIM, Concentração Inibitória Mínima; R, Resistente; S, sensível; SDD, Susceptível Dose Dependente. 9390* levedura não cresceu em meio sintético Ágar Sabouraud Dextrose.

3.4. DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA PELO MALDI-TOF MS

Todas as 30 leveduras do complexo *Candida parapsilosis* foram testadas frente a 11 diferentes concentrações de cada uma das três equinocandinas (Anidulafungina, Caspofungina e Micafungina), totalizando 33 condições experimentais distintas por levedura e 990 análises em toda população avaliada. As análises foram realizadas em duplicata. A detecção foi realizada através da

combinação do Teste de Susceptibilidade Antifúngica padronizada pelo CLSI e o Teste de susceptibilidade Antifúngica por Espectrometria de Massas.

Para as 30 leveduras avaliadas foram utilizadas condições semelhantes de preparo do inóculo e temperatura de incubação como descrito pelo CLSI a fim de permitir uma melhor comparação entre ambas metodologias. Os resultados estão expressos na Tabela 3, e os isolados que apresentaram discrepância em seu ponto de corte de acordo com cada metodologia, encontram-se destacados em negrito.

Tabela 3. Comparação entre o TSA* pelo CLSI** e o TSA pelo MALDI-TOF MS†

Nº Isolado	CIM" (µg/mL)			MPCC• (µg/mL)		
	Anidula.	Caspo.	Mica.	Anidula.	Caspo.	Mica.
02/09	S' (0.25)	S (0.0625)	S (0.25)	I (4)	S (0.03125)	S (0.125)
04/09	S (0.25)	S (0.25)	S (0.25)	S (0.25)	S (0.0625)	S (0.25)
05/09	S (0.25)	S (0.25)	S (0.25)	S (0.0625)	S (2)	S(0.03125)
121	S (0.25)	S (0.125)	S (0.125)	S (2)	S (0.125)	S (0.125)
122	S (0.125)	S (0.25)	S (0.125)	S (0.0625)	S (0.25)	S (0.0625)
251	S (0.0625)	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.125)	S(0.03125)
346 A	S (0.25)	S (0.25)	S (2)	S (0.25)	S (0.0625)	S (1)
346 B	S (0.25)	S (0.25)	S (2)	S (0.25)	S (0.0625)	S (1)
445	S (0.125)	S (0.25)	S (0.25)	S (0.5)	R (8)	S (0.5)
451	S (0.5)	R" (8)	S (0.03125)	S (0.125)	S (2)	S (0.125)
474	S (0.5)	S (0.5)	I+ (4)	I (4)	S (0.25)	S (0.125)
595	S (0.25)	S (0.25)	S (1)	I (4)	S (0.25)	S (0.25)
596 A	S (0.25)	S (0.25)	S (0.5)	S (0.0625)	S (0.0625)	S (0.5)
596 B	S (0.25)	S (0.25)	S (0.5)	S (0.125)	S (0.03125)	S (2)
630	S (0.0625)	S (0.0625)	S (0.0125)	S (0.03125)	S (0.125)	S (0.0625)
653	S (0.125)	S (1)	S (0.25)	S (0.03125)	S (0.03125)	S(0.03125)
2995	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.0625)	S (0.25)	S (0.25)
5283	S (0.125)	S (0.0625)	S (0.25)	S (0.5)	S (0.03125)	S (0.0625)
5551	S (0.5)	S (0.125)	S (0.125)	R (8)	S (0.5)	S (0.5)
6085	S (0.25)	S (0.5)	S (1)	S (1)	S (0.25)	S (0.125)
7398	S (0.03125)	S(<0.03125)	S(<0.03125)	S (0.125)	S (0.125)	S (0.25)
7491	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.125)	S (0.125)	S (0.25)
7736	S (0.25)	S (0.0625)	S (0.25)	S (0.5)	S (0.25)	S (0.5)
7755	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.0625)	S (0.03125)	S(0.03125)
9968	S (0.25)	S (1)	S (0.5)	R (8)	S (0.03125)	S (2)
12680	S (0.0625)	S (0.5)	S (0.0625)	S (0.25)	S (0.5)	S (1)
13531	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.125)	S (0.25)
14495	S (0.0625)	S (0.03125)	S (0.25)	S (1)	S (0.125)	S(0.03125)
13650	S (0.25)	S (0.25)	S (2)	S (1)	S (0.5)	S (0.5)
14659	S (<0.03125)	S (<0.03125)	S (<0.03125)	S (0.0625)	S (0.25)	S (0.25)
ATCC 22019	S (0.125)	S (1)	S (0.25)	S (0.125)	S (0.25)	S (0.125)

*TSA- Teste de Susceptibilidade Antifúngica

**CLSI-Clinical Laboratorial

†MALDI-TOF MS-Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass

Spectrometry. "CIM- Concentração Inibitória Mínima. •MPCC- Minimal Profile Change Concentration
'S- Sensível. "R- Resistente. *I- Intermediário. Fonte: própria

O número de isolados e sua respectiva porcentagem, sensíveis de acordo com as duas metodologias (CLSI e MALDI-TOF) frente a anidulafungina, caspofungina e micafungina para o complexo *Candida parapsilosis* podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4. Número absoluto e porcentagem de isolados sensíveis frente as três equinocandinas através das metodologias que determinam o CIM (CLSI) e o MPCC (MALDI-TOF).

Espécies	CLSI*			MALDI-TOF**		
	Anidula.	Caspo.	Mica.	Anidula.	Caspo.	Mica.
Complexo <i>Candida parapsilosis</i>	30 (100%)	29 (96,6%)	29 (96,6%)	25 (83,3%)	29 (96,6%)	30 (100%)

*CLSI- Clinical Laboratory Standarts Institute

**MALDI-TOF-Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight

O cálculo da reprodutibilidade, fazendo comparação em percentual das duas metodologias, a fim de observar a eficácia e concordância dos dois testes, está sumarizado na Tabela 5, onde a reprodutibilidade em comparação entre os dois testes variou de 91,6% a 98, 3%, dependendo do antimicótico avaliado.

Tabela 5. Reprodutibilidade em Porcentagem das duas metodologias para o TSA

Espécies	Anidulafungina	Caspofungina	Micafungina
Complexo <i>Candida parapsilosis</i> (30)	91,6%	96,6%	98,3%

Valores de reprodutibilidade de cada espécie do Complexo *Candida parapsilosis* em combinação com cada equinocandina.

Ao comparar as duas metodologias, têm-se os resultados: 1) o MALDI-TOF para anidulafungina evidenciou 25 leveduras sensíveis (83,3%), duas leveduras resistentes (6,6%) e três leveduras obtiveram concentrações intermediárias, enquanto que pelo CLSI, 30 leveduras foram sensíveis (100%). O MALDI-TOF para caspofungina evidenciou 29 leveduras sensíveis (96,6%) e uma resistente (3,3%), senso semelhante para o CLSI. O MALDI-TOF para micafungina foi sumarizado com 30 leveduras sensíveis (100%), enquanto que para o CLSI foi obtido 29 leveduras sensíveis (96,6%) e uma intermediária (3,3%). Entre as discrepâncias, está o isolado *Candida parapsilosis* 5551 que obteve frente andulafungina a CIM de 0.5 µg/mL pelo

CLSI sendo categorizada como sensível e o MMPC de 8µg/mL por espectrometria de massas sendo resistente.

A Figura 5 evidencia os espectros de massas da *Candida parapsilosis* 5551 e a Mudança Mínima no Perfil Proteico após exposição a anidulafungina. Observa-se que os picos espectrais se mantiveram sem alteração até a concentração de 8µg/mL, caracterizando resistência. Todos os espectros da levedura foram correlacionados e auto-correlacionados gerando uma matriz traduzida em mapa de calor (Figura 6) através de índices de correlação de composto (ICC). A Tabela 6 apresenta os valores de ICC máximo e ICC nulo, para cada concentração, que foram utilizados para gerar a matriz de correlação.

A Figura 7 evidencia os espectros de massas da *Candida parapsilosis* 5551 e a Mudança Mínima no Perfil Proteico após exposição a caspofungina. Observa-se que os picos espectrais se mantiveram sem alteração até a concentração de 0,5µg/mL, caracterizando sensibilidade. Todos os espectros da levedura foram correlacionados e auto-correlacionados gerando uma matriz traduzida em mapa de calor (Figura 8) através de índices de correlação de composto (ICC). A Tabela 7 apresenta os valores de ICC máximo e ICC nulo, para cada concentração, que foram utilizados para gerar a matriz de correlação.

A Figura 9 evidencia os espectros de massas da *Candida parapsilosis* 5551 e a Mudança Mínima no Perfil Proteico após exposição a micafungina. Observa-se que os picos espectrais se mantiveram sem alteração até a concentração de 0,5µg/mL, caracterizando sensibilidade. Todos os espectros da levedura foram correlacionados e auto-correlacionados gerando uma matriz traduzida em mapa de calor (Figura 10) através de índices de correlação de composto (ICC). A Tabela 8 apresenta os valores de ICC máximo e ICC nulo, para cada concentração, que foram utilizados para gerar a matriz de correlação.

Após o cruzamento de cada concentração do espectro com uma das duas concentrações extremas, máxima ou nula, formou então a matriz ICC onde, ao lado direito do mapa de calor esta a concentração máxima e na parte inferior do mesmo a concentração mínima ou nula, esses resultados foram expressos em uma tabela para cada fármaco avaliado.

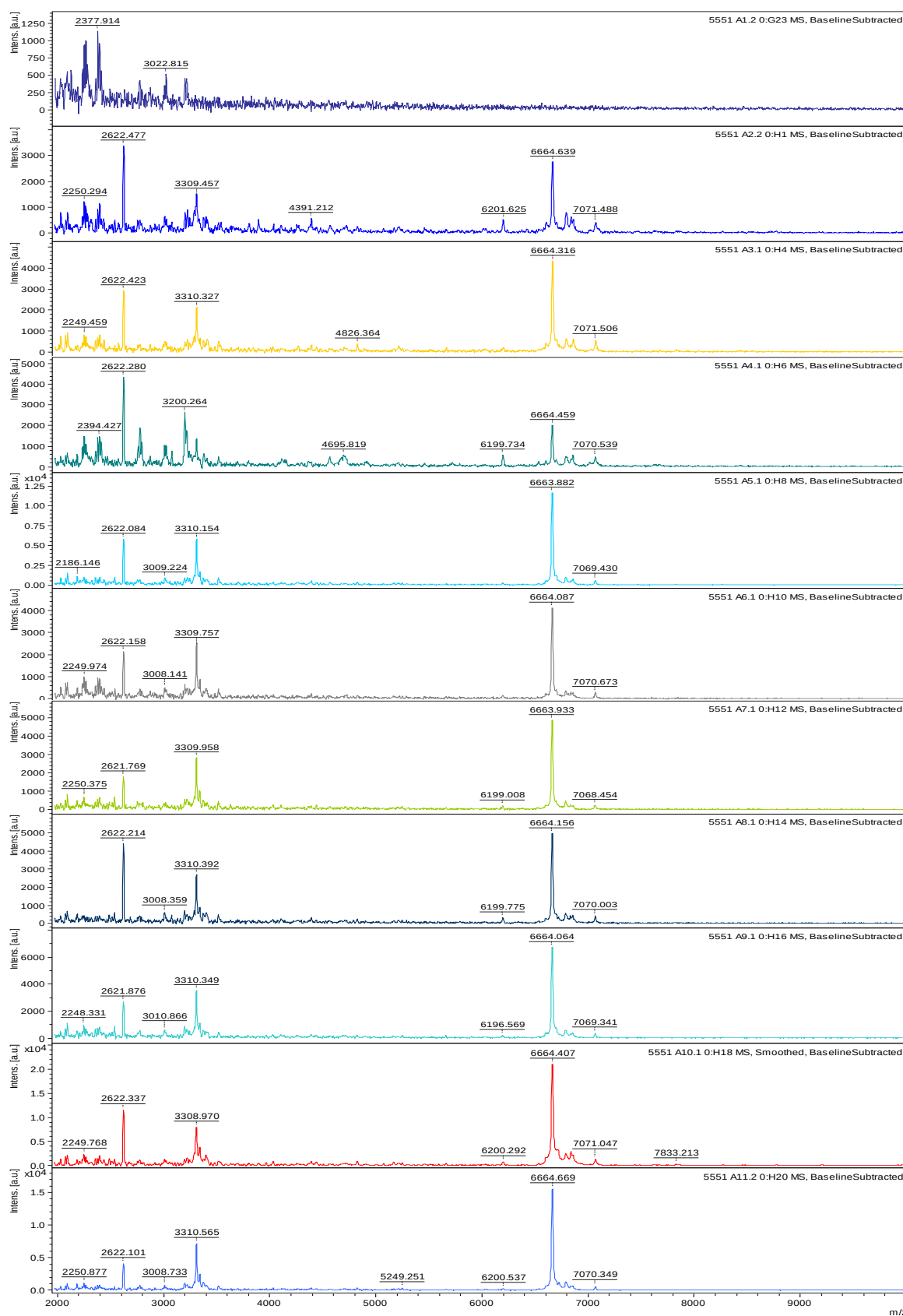


Figura 5. Espectros de Massas da levedura *Candida parapsilosis* 5551 frente a Anidulafungina*
 *Levedura 5551 frente a Anidulafungina 16 - 0,03125 µg/mL com exposição de 15 horas a 37 °C.
 Fonte: MALDI Biotyper versão 3.0.

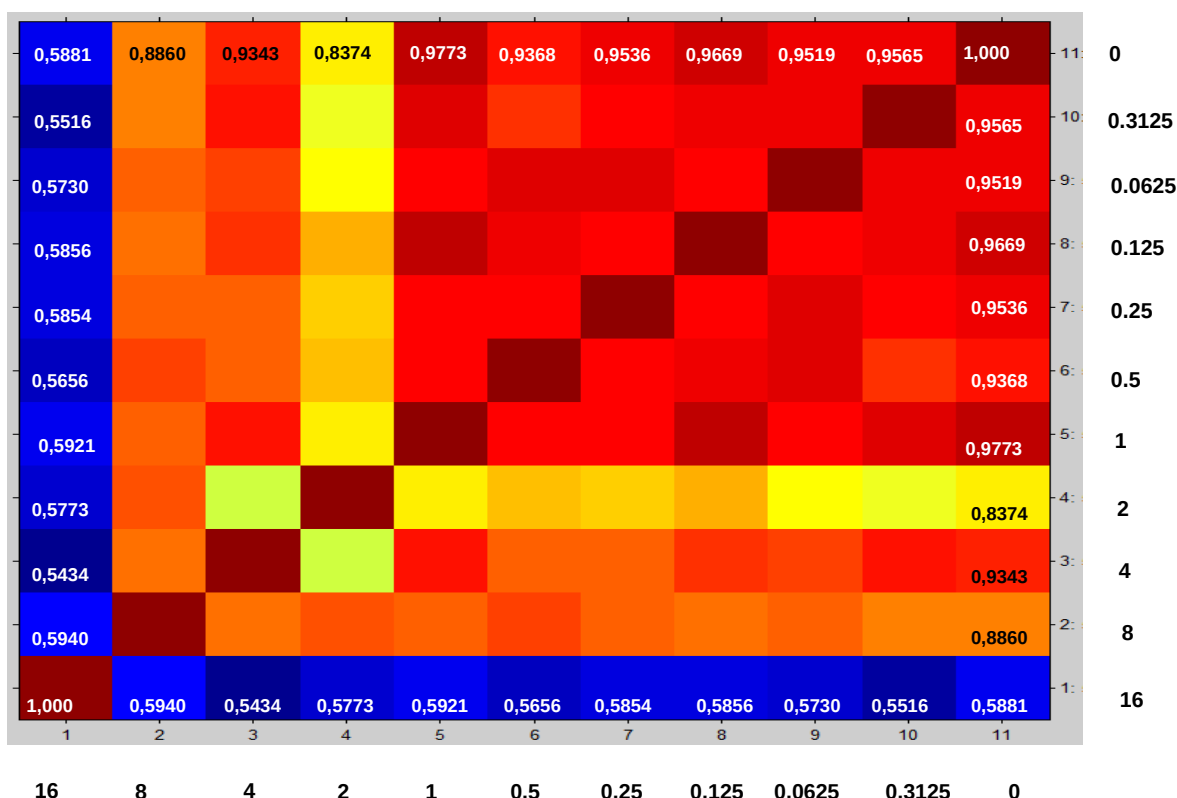


Figura 6. Matriz ICC da *Candida parapsilosis* 5551 frente a Anidulafungina*

*Representação do Índice de Correlação do Composto (ICC) onde a matriz é derivada da seleção dos espectros de massas para *Candida parapsilosis* 5551 exposta por 15 horas a 37°C (CIM 8µg/mL) para Anidulafungina (incluindo o valor nulo) de 16 - 0,03125 µg/mL. A correlação dos espectros e auto-correlações foram traduzidos em um mapa de calor onde os espectros relacionados são mostrados em cores quentes e os espectros não relacionados em cores frias. Fonte: MALDI Biotyper versão 3.0.

Tabela 6. Valores de correlação e auto-correlações para anidulafungina

MPCC (µg/mL)	ICC Nulo	ICC Máximo
0	0,5881	1,000
0,03125	0,5516	0,9565
0,0625	0,5730	0,9519
0,125	0,5856	0,9669
0,25	0,5854	0,9536
0,5	0,5656	0,9368
1	0,5921	0,9773
2	0,5773	0,8374
4	0,5434	0,9343
8	0,5940	0,8860
16	1,000	0,5881

Valores de ICC nulo e ICC máximo para Anidulafungina (8µg/mL) frente *Candida parapsilosis* 5551.

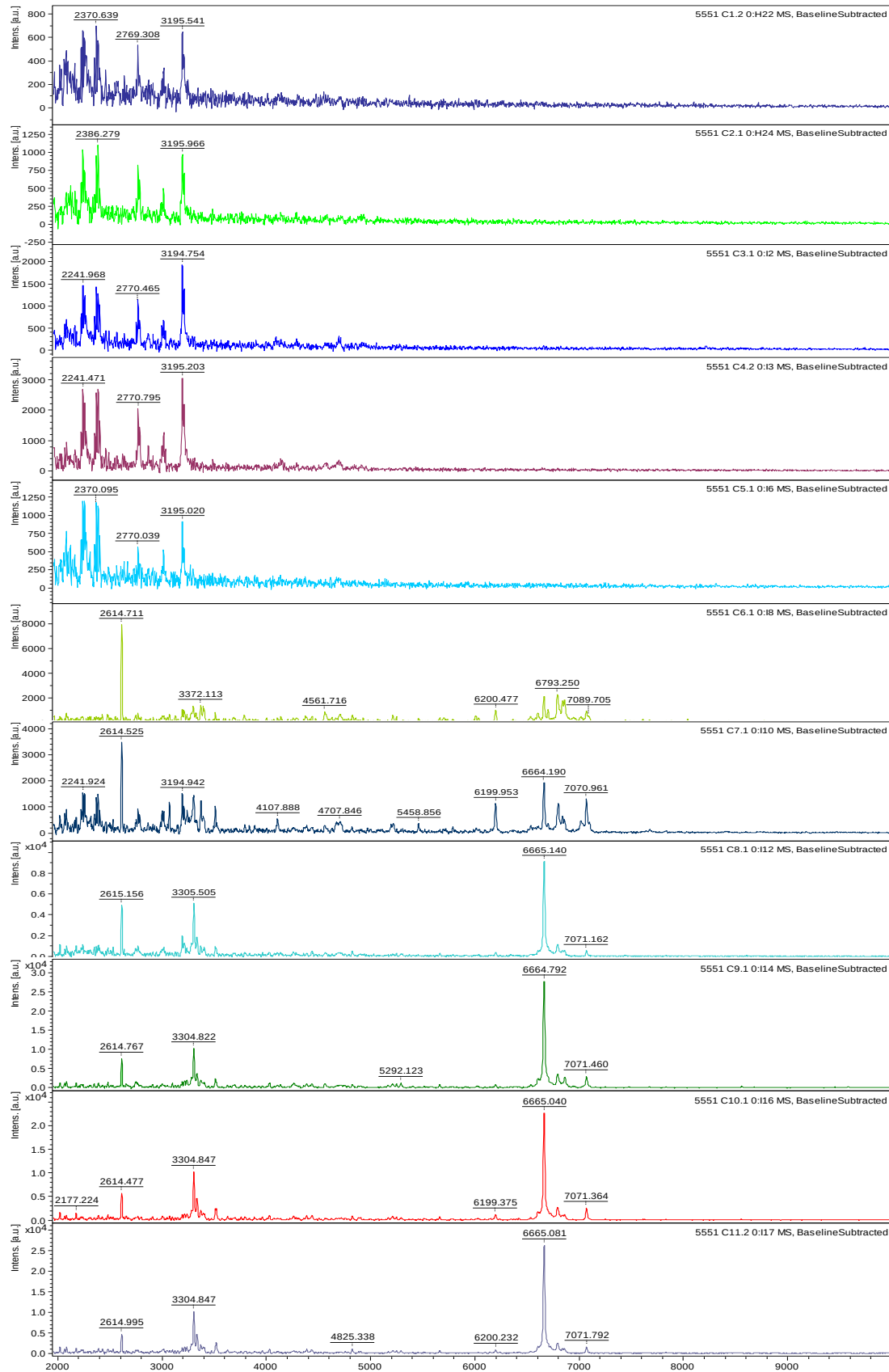


Figura 7. Espectros de Massas da *Candida parapsilosis* 5551 frente a Caspofungina*

*Levedura 5551 frente a Caspofungina 16 - 0,03125 µg/mL com exposição de 15 horas por 37 °C . Fonte: MALDI Biotyper versão 3.0

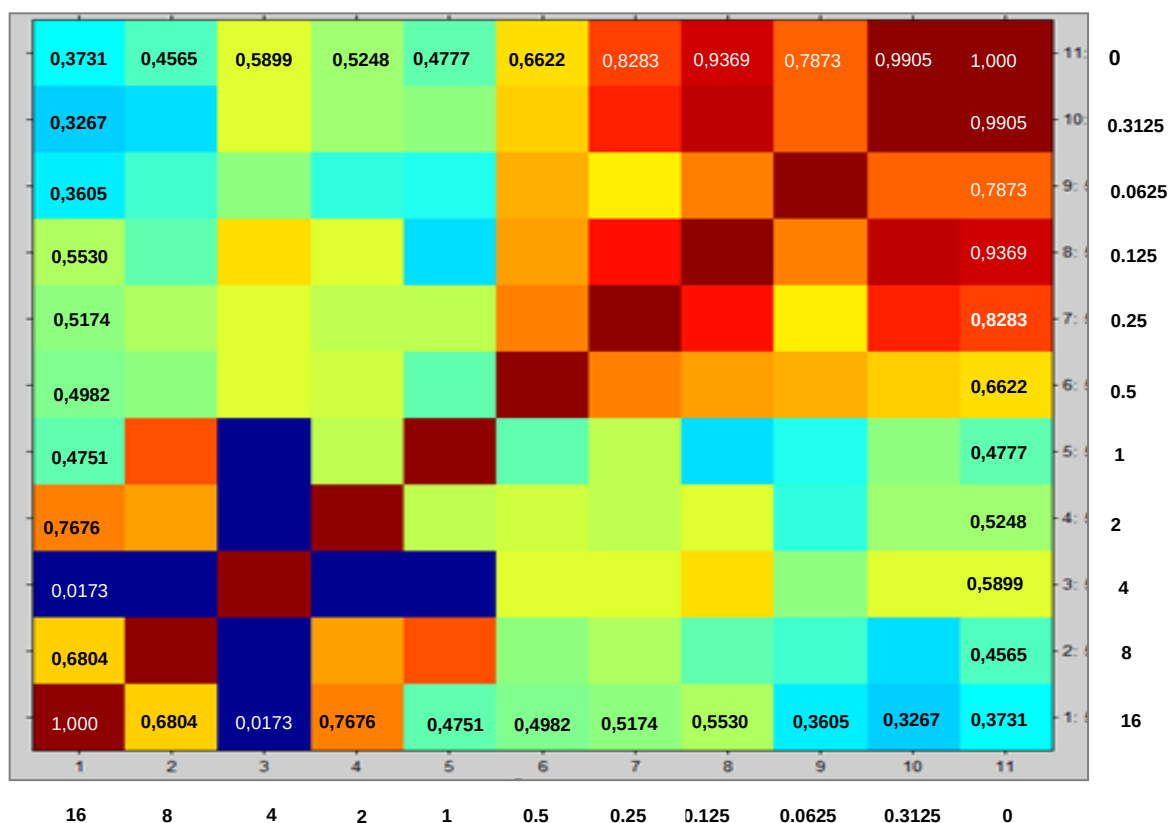


Figura 8. Matriz ICC da *Candida parapsilosis* 5551 frente a Caspofungina*

*Representação do Índice de Correlação do Composto (ICC) onde a matriz é derivada da seleção dos espectros de massas para *Candida parapsilosis* 5551 exposta por 15 horas a 37°C (CIM 0.5µg/mL) para Caspofungina (incluindo o valor nulo) de 16 - 0,03125 µg/mL. A correlação dos espectros e auto-correlações foram traduzidos em um mapa de calor onde os espectros relacionados são mostrados em cores quentes e os espectros não relacionados em cores frias. Fonte: MALDI Biotyper versão 3.0.

Tabela 7. Valores de correlação e auto-correlações para Caspofungina

MPCC (µg/mL)	ICC Nulo	ICC Máximo
0	0,3731	1,000
0,03125	0,3267	0,9905
0,0625	0,3605	0,7873
0,125	0,5530	0,9369
0,25	0,5174	0,8283
0,5	0,4982	0,6622
1	0,4751	0,4777
2	0,7676	0,5248
4	0,0173	0,5899
8	0,6804	0,4565
16	1,000	0,3731

Valores de ICC nulo e ICC máximo para Caspofungina (0.5µg/mL) frente *Candida parapsilosis* 5551.

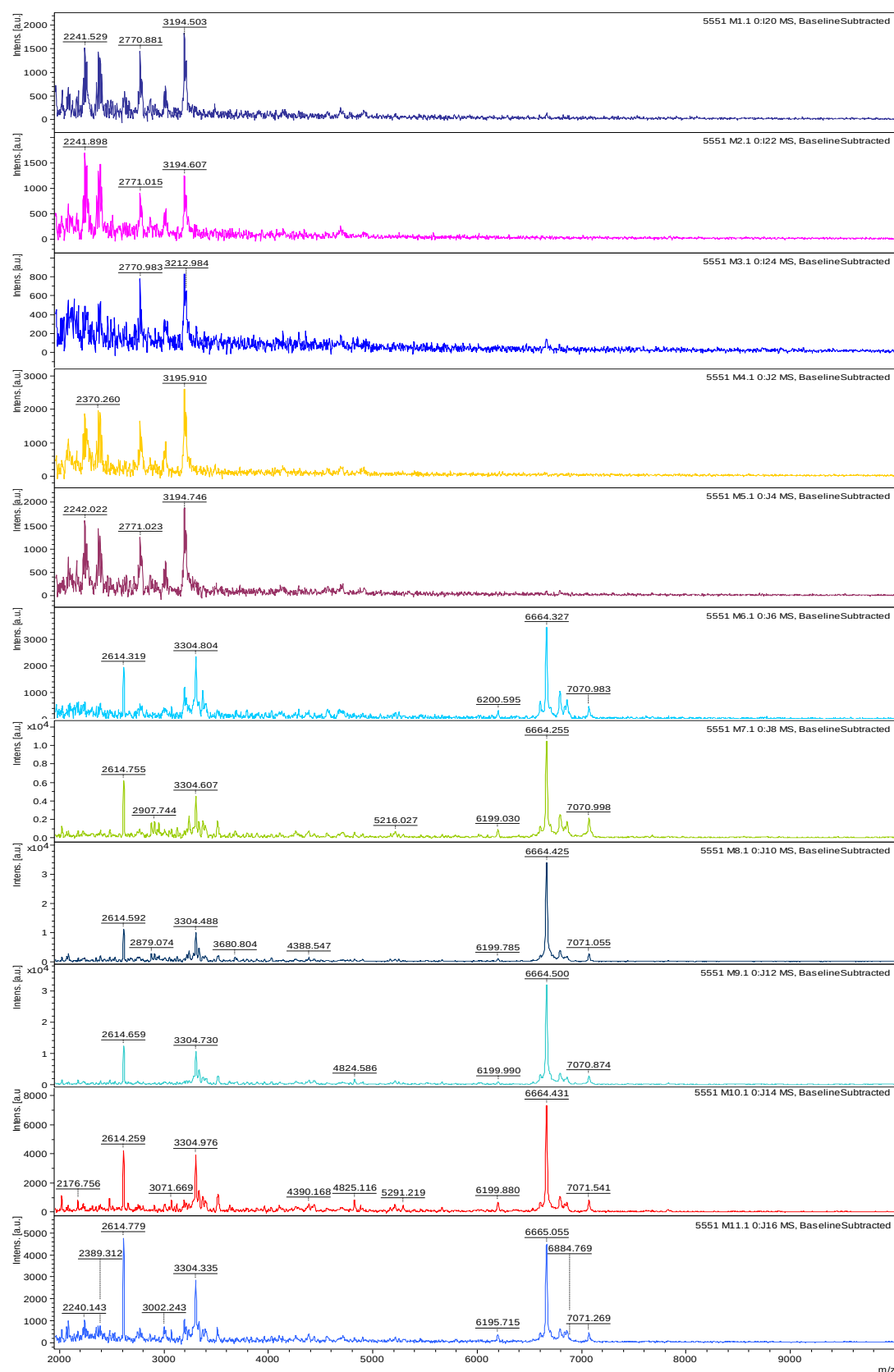


Figura 9. Espectros de Massas da *Candida parapsilosis* 5551 frente a Micafungina*

*Levedura 5551 frente a Micafungina 16 – 0,03125 $\mu\text{g/mL}$ com exposição de 15 horas por 37 °C. Fonte MALDI Biotyper versão 3.0

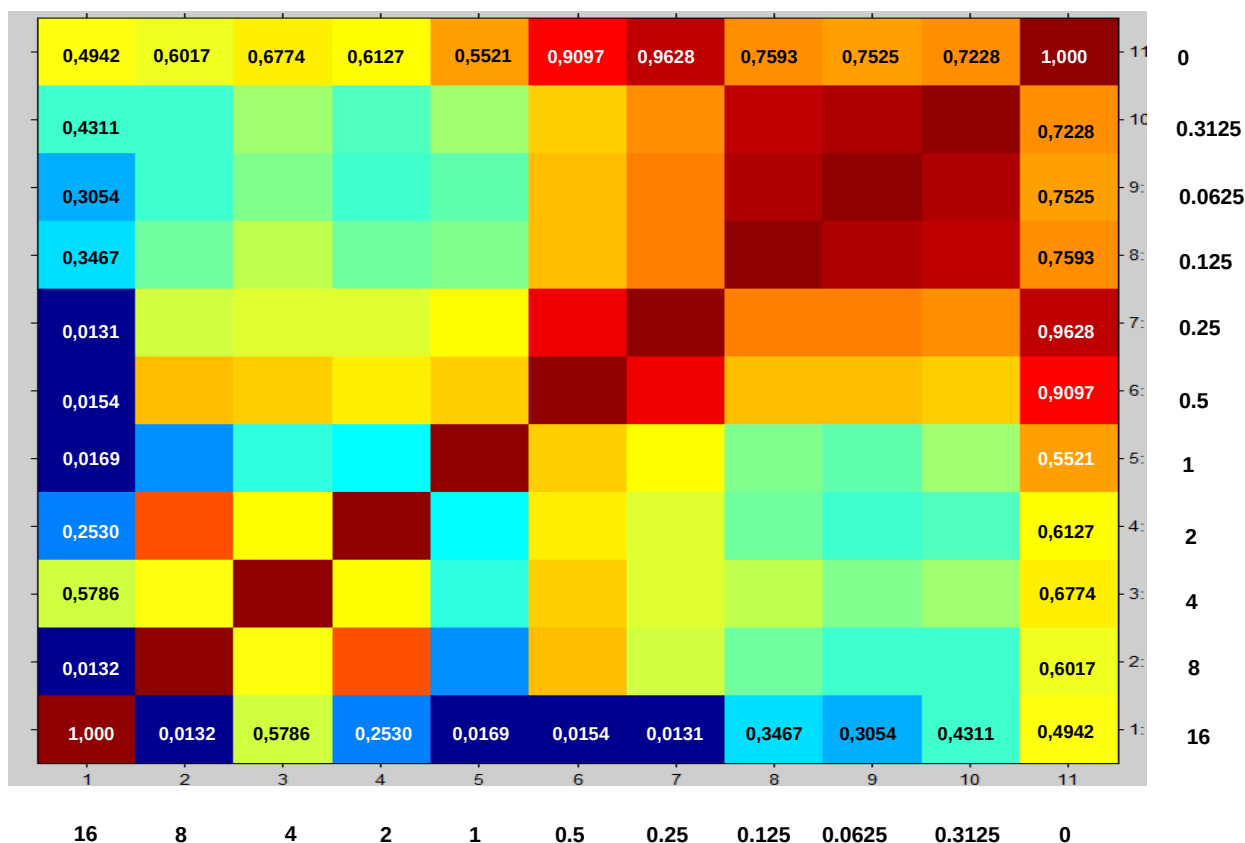


Figura 10. Matriz ICC da *Candida parapsilosis* 5551 frente a Miconazole*

Representação do Índice de Correlação do Composto (ICC) onde a matriz é derivada da seleção dos espectros de massas para *Candida parapsilosis* 5551 exposta por 15 horas a 37°C (CIM 0.5 µg/mL) para Miconazole (incluindo o valor nulo) de 16 - 0,03125 µg/mL. A correlação dos espectros e auto-correlações foram traduzidos em um mapa de calor onde os espectros relacionados são mostrados em cores quentes e os espectros não relacionados em cores frias. Fonte: MALDI Biotyper versão 3.0.

Tabela 8. Valores de correlação e auto-correlações para Miconazole

MPCC (µg/mL)	ICC Nulo	ICC Máximo
0	0,4942	1,000
0,03125	0,4311	0,7228
0,0625	0,3054	0,7525
0,125	0,3467	0,7593
0,25	0,0131	0,9628
0,5	0,0154	0,9097
1	0,0169	0,5521
2	0,2530	0,6127
4	0,5786	0,6774
8	0,0132	0,6017
16	1,000	0,4942

Valores de ICC nulo e ICC máximo para Miconazole
(0.5 µg/mL) para *Candida parapsilosis* 5551.

3.5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A identificação rápida e correta das espécies de *Candida* é de grande importância para a sobrevivência dos pacientes e principalmente para implementação de medidas eficazes para o controle da doença. A espectrometria de massas tem sido proposta como uma alternativa econômica, ou seja reduzindo o tempo para identificação correta, além de reduzir o tempo de internação dos pacientes em UTI's. Estudos têm mostrado que o MALDI-TOF MS permite a identificação rápida e precisa de culturas de leveduras a partir da extração proteica do isolados clínicos, mostrando concordância com a identificação convencional (MARTINES-LAMAS et al., 2011). As leveduras utilizadas neste estudo foram advindas de pacientes com candidemia internados na UTI e foram escolhidas independentemente do tipo de mecanismos de resistência a drogas. Como esperado, a base TSA-CLSI pode detectar a resistência de um isolado, independentemente do mecanismo de resistência; No entanto, a resistência detectado por MALDI-TOF MS espectros é possível quando a quantidade de proteína modificada é expressa nas células suficientemente para ser discriminados.

O MALDI-TOF MS tem sido descrito como uma ferramenta de identificação rápida e precisa para bactérias e fungos em laboratórios de microbiologia clínica. Existem vários estudos anteriores que testaram a desempenho de MALDI TOF MS para a identificação de espécies de *Candida*. Em um estudo realizado por Pulcrano et al. (2012), foi avaliado 82 leveduras, isoladas de infecções da corrente sanguínea, sendo todas as leveduras identificadas a nível de espécie. Outro estudo feito por Yaman et al. (2012), foram identificadas 281 leveduras isoladas a partir de culturas de sangue.

Em nosso estudo, o procedimento para a realização do teste por MALDI-TOF MS, identificou 43 leveduras corretamente pelo MALDI-TOF MS representando 100%, incluindo cepas que são identificadas a nível de espécie por metodologias moleculares.

No presente estudo, os isolados de *Candida* spp. de origem hematológica, não demonstraram resistência para anidulafungina, contudo 4,6% foram resistentes para caspofungina, 4,6% para micafungina e 9,3% para o fluconazol. Assim,

podemos observar que todas as leveduras tiveram uma boa resposta frente aos antifúngicos testados.

Pfaller et al. (2008) realizaram uma vigilância de sentinela em 90 centros médicos de todo o mundo a partir de 5.346 espécies de *Candida* isoladas de sangue. Foi realizado o teste de Susceptibilidade antifúngica frente a anidulafungina, caspofungina e micafungina a fim de determinar a CIM. Como resultado as três equinocandinas demonstraram uma excelente potência e espectro com 98,8 a 100% e todos os isolados sensíveis com a CIM de 2 µg/mL. Observou que apenas seis (0,1%) de 5,346 isolados testados apresentaram CIM >4µg/mL, sendo três isolados de *C. guilliermondii* (caspofungina CIM ≥8 g/mL), e cada isolado de *C. glabrata* (caspofungina CIM ≥8 µg/mL), *C. tropicalis* (caspofungina ≥8 µg/mL), e *C. rugosa* (anidulafungina CIM ≥8 µg/mL).

Dalazen et al., (2011), mostraram que 60 leveduras foram testadas frente ao fluconazol e 92% dessas foram resistentes..

O TSA- MALDI-TOF MS, permitiu a comparação dos espectros mostrando as variações entre a composição das proteínas de cepas sensíveis e resistentes. Assim, após a exposição das leveduras do complexo *C. parapsilosis* frente a diferentes concentrações de cada equinocandina, pôde ser observado uma variação na expressão das proteínas de cada cepa. Para ocorrer essa comparação entre os espectros, o nível de expressão de proteína, ou a quantidade da proteína modificada, devem ser suficientemente abundantes nas células para serem discriminadas (SARACLI, et al., 2015).

Em comparação do TSA com as duas metodologias a do CLSI e a do MALDI-TOF MS foi possível observar a concordância entre ambas, obtendo um desempenho entre 91,6% a 98,3%. Das três equinocandinas avaliadas, a caspofungina foi a que obteve 100% de concordância entre o TSA pelo MALDI-TOF MS e o CLSI, categorizando todas as leveduras como sensíveis. Para micafungina, o TSA MALDI-TOF MS não evidenciou sensibilidade em 3% das leveduras em contraponto ao TSA pelo CLSI. Já a anidulafungina foi a que obteve uma divergência maior de 17% no TSA MALDI-TOF MS em comparação com o CLSI.

Saracli et al., (2015) avaliaram através da tecnologia do MALDI-TOF MS, a detecção de resistência antimicótica dos triazóis em 35 espécies de *Candida albicans*, 35 espécies de *C. glabrata* e 37 espécies de *C. tropicalis*. Dessa maneira, a concordância essencial entre MALDI-TOF MS e CLSI variou entre 54% e 97%, e

foi maior para posaconazol contra *C. glabrata*. A reprodutibilidade de o ensaio de MALDI-TOF MS variou entre 54,3 e 82,9% e foi melhor para o fluconazol contra *C. albicans* e posaconazol contra *C. glabrata*. A reprodutibilidade também foi mais elevada para isolados de *C. glabrata* em comparação com *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Otimizações para futura aplicação dos testes devem ser realizadas, já que podem existir alguma(as) falha(as) na padronização da quantidade de proteínas expostas, assim, as alterações proteômicas devem ser quantitativamente detectadas pelo MALDI-TOF MS, visto que, algumas leveduras após a exposição com os fármacos podem não expressar de maneira considerável as alterações no perfil proteico (MARINACH et al., 2009; CAROLIS et al., 2012; VELLA et al., 2013; SARACLI et al., 2015).

Para as 30 leveduras analisadas frente à três formulações das equinocandinas, foi possível observar a mudança mínima no perfil espectral para a maioria, no entanto alguns resultados não foram tão sugestivos, embora cada levedura já tinha seus *breakpoints* definidos pelo teste padrão do CLSI.

A reprodutibilidade do TSA pelo MALDI-TOF MS ainda é um tanto laboriosa, no entanto, mostra-se confiável quando à comparamos com o TSA pelo CLSI, para espécies do Complexo *C. parapsilosis* frente as equinocandinas. Além disso, é necessário que sejam realizados mais testes com outras espécies de *Candida* associadas a outros fármacos, para que então, o TSA pelo MALDI-TOF MS seja utilizado como rotina em laboratórios de microbiologia (VELLA et al., 2013).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* foram as leveduras mais isoladas em pacientes internados na UTI do Hospital das Clínicas da UFPE;
- O MALDI-TOF MS consegue identificar espécies de leveduras, em que a diferenciação apenas seria possível por Métodos de Biologia Molecular e possui 99,99 % de confiabilidade;
- A maioria dos isolados de *Candida parapsilosis* (93,2%) se demonstraram sensíveis as equinocandinas de acordo com CLSI;
- A maioria dos isolados de *Candida parapsilosis* (79,9%) se demonstraram sensíveis as equinocandinas de acordo com MALDI-TOF MS;
- MALDI-TOF MS é capaz de determinar o *breakpoint* de uma levedura clínica após 15 horas de exposição ao antifúngico;
- CIM e MPCC obtidos através do CLSI e MALDI-TOF, apresentaram concordância de 91,6%, 96,6% e 98,3% para anidulafungina, caspofungina e micafungina, respectivamente, frente os isolados de *Candida parapsilosis*;
- Teste de sensibilidade antifúngica pelo MALDI-TOF MS permite predizer a melhor escolha antifúngica para pacientes críticos com candidemia.

REFERÊNCIAS

ADERIYE, Babatunde I.; OLUWOLE, Olusola A Antifungal Agents That Target Fungal Cell Wall Components: A Review. **Agricultural and Biological Sciences Journal**, Ado- Ekiti, v. 1, n. 5, p. 206-216, july, 2015.

ALANIO, Alexandre. La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en mycologie clinique: avantages réels, écueils potentiels. **Journal des Anti-infectieux**, Paris, v. 2013, n.15, p.71-82, apr, 2013.

ANDRADE, Jônathas G.; FREITAS, Humberto F.; CASTILHO, Marcelo S. Estudos de QSAR 2D baseados em descritores topológicos e fragmentos moleculares para uma série de derivados azólicos ativos contra *Candida albicans*. **Química Nova**, São Paulo, v.35 n.3, p.466-472, 2012.

ARNOLD R. J.; REILLY J. P. 1998. Fingerprint matching of *E. coli* strains with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of whole cells using a modified correlation approach. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Toronto, v.12, n.10 p.630–636, may, 1998.

ASHFORD, B. Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. **Am J Trop Med Hyg**, v.8, p.507-538, 1928.

BERTINI, Alessia; BERNARDIS, Flavia; HENSGENS, Lambert A.M.; SANDINI, Silvia; SENESI, Sonia; TAVANTI, Arianna. Comparison of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* adhesive properties and pathogenicity. **International Journal of Medical Microbiology**, Pisa, v. 303, n. 2013, p. 98– 103, 2013.

BLANCO-BLANCO, María Teresa; GÓMEZ-GARCÍA, Antonio Cándido; HURTADO, Cipriano; GALÁN-LADERO, María Angeles; LOZANO, María del Carmen; García-Tapias, Ana; BLANCO, María Teresa. *Candida orthopsilosis* fungemias in a Spanish tertiary care hospital: Incidence, epidemiology and antifungal susceptibility. **Revista Iberoamericana de Micología**, Badajoz, v. 31, n.2, p.145–148, apr, 2014.

BOFF, E.; LOPES, P. G. M.; SPADER, T.; SCHEID, L. A.; LORETO, E.; DAL FORNO, N. F.; AQUINO, V.; SEVERO, L. C.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H.; Reavaliação da suscetibilidade de *Candida* à anfotericina B: estudo comparativo com isolados de três hospitais do Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, p. 36-40, 2008.

BOUGNOUX, Marie-Elisabeth; TAVANTI, A.; BOUCHIER, C.; GOW, N. A. R.; MAGNIER, A.; DAVIDSON, A. D.; MAIDEN, M. C. J.; D'ENFERT, C.; ODDS, F. C. Collaborative Consensus for Optimized Multilocus Sequence Typing of *Candida albicans*. **Journal Of Clinical Microbiology**, Oxford, v.41, n.11, p.5265–5266, nov, 2003.

BOUGNOUX, Marie-Elisabeth; ANGEBAULT, Cécile; LETO, Julie; BERETTI, Jean-Luc. Identification des levures par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

Revue Francophone des Laboratoires, Sorbonne, v. 2013, n.450, p. 63-69, mar, 2013.

BRANCO, Joana Alexandra Vilarinho. 32 f. **Estudo Molecular da resistência antifúngica de *Candida parapsilosis***. Dissertação (Mestrado)- Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 2012.

CAROLIS, Elena; VELLA, Antonietta; FLORIO, Ada R.; Posteraro, Patrizia; PERLIN, David S.; SANGUINETTI, Maurizio; POSTERARO, Brunella. Use of matrix-assisted laser desorption ionization- time of flight mass spectrometry for caspofungin susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, New Jersey, v. 50, n. 7, p. 2479-2483, july 2012.

CLAYDON, Martin A.; DARVEY, Simon N. EDWARDS-JONES, Valerie; GORDON, Derek B. The Rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. **Nature Biotechnology**, Manchester v.14, p.1584-1586, sep, 1996.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Testing of Yeasts Approved standard document M27-A3, Wayne, PA, USA: **CLSI**, v. 28, n.14, p. 1-25, apr, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement, Wayne, PA, USA: **CLSI**, v. 32, n.17, p. 1-23, dez. 2012.

CORDEIRO, Rossana de Aguiar; MACEDO, Ramila de Brito; TEIXEIRA, Carlos Eduardo Cordeiro; MARQUES, Francisca Jakelyne de Farias; BANDEIRA, Tereza de Jesus Pinheiro Gomes; Moreira, José Luciano Bezerra; BRILHANTE, Raimunda Sâmia Nogueira; ROCHA, Marcos Fábio Gadelha; SIDRIM, José Júlio Costa. The calcineurin inhibitor cyclosporin A exhibits synergism with antifungals against *Candida parapsilosis* species complex. **Journal of Medical Microbiology**, Ceará, v. 63, p. 963-944, apr, 2014.

CORTÉS, J. A. L.; RUSSI, J. A. N. Equinocandinas. **Rev. Chil. Infect.** Bogotá, v. 28, n. 6, p. 529-536, sep, 2011.

DANNAOUI, Eric. Résistance des *Candida* aux antifongiques : détection et mécanismes. **Revue Francophone des Laboratoires**. v.43, n.450, p. 71-77, mar, 2013.

DE ROSSI, Tatiane; LOZOVY, Marcell Alysson Batisti; SILVA, Rosiane Valeriano; FERNANDES, Eduardo Vignoto; GERALDINO, Thais Herrero; COSTA Ivete Conchon; SARIDAKIS, Halha Ostrenski; WATANABE, Maria Angelica Ehara; FELIPE, Ionice. Interações entre *Candida albicans* e hospedeiro. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 15-28, jan./jun. 2011.

DEGAND, Nicolas; CARBONNELLE, Etienne; DAUPHIN, Brunhilde; BERETTI, Jean-Luc; BOURGEOIS, Muriel; SERMET-GAUDELUS, Isabelle; SEGONDS, Christine; BERCHE, Patrick; NASSIF, Xavier; FERRONI, Agnès; Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of

nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Toulouse, v.46, n.10, p.3361-3367, Aug, 2008.

DEMITTO, Fernanda de Oliveira; AMARAL, Renata Claro Ribeiro; BIASI, Renata Perugini; GUILHERMETTI, Eliana; Svidzinski, Terezinha Inez Estivalet; BAEZA, Lilian Cristiane. Suscetibilidade a antifúngicos in vitro de *Candida* spp. em pacientes do Hospital Universitário Regional de Maringá-PR. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**, Maringá, v.48, n. 5, p.315-321, 2012.

DENNING, David W. Echinocandin antifungal drugs. **The Lancet**, Manchester, v.362, n.4, p. 1142–1151, oct. 2003.

EL-MASHAD, Noha; MAHMOUD, Mohamed Taha. Commercial tests for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida* species compared to standard (NCCLS) broth microdilution. **International Journal of Medicine and Medical Sciences**, Zagazig, v.3, n.4,p. 100-104, apr, 2011.

ESCHENAUER, Gregory; DEPESTEL, Daryl D.; CARVER, Peggy L. Comparison of echinocandin antifungals. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, Ann Arbor, v. 3, n. 1,p. 71-97, 2007.

FLEMING, S.; YANNAKOU, C. K.; HAEUSLER, G. M. CLARK, J.; GRIGG, A.; HEATH, C. H.; BAJEL, A.; VAN HAL, S. J.; CHEN, S. C.; MILLIKEN, S. T.; MORRISSEY, C. O.; TAM, C. S.; SZER, J.; WEINKOVE, R.; SLAVIN, M. A. Consensus guidelines for antifungal prophylaxis in haematological malignancy and haemopoietic stem cell transplantation, 2014. **Internal Medicine Journal**, Parkville, v.44, n.2014, p.1283-1297, 2014.

HILLENKAMP, Franz; PETER-KATALINIC, Jasna. **MALDI MS A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications**.1º Edição, Münster: Wiley-VCH, 2007. 363 p.

FU, Man-Shun; SORDI, Luisa; MÜHLSCHLEGEL, Fritz A. Functional characterization of the small heat shock protein Hsp12p from *Candida albicans*. **PLOS ONE**, v.7, n.8, p.1-10, 2012.

GHANNOUM, M. A.; CHEN, A.; BUHARI, M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; BAXA, D.; GOLEMBIESKI, A.; VAZQUEZ, J. A. Differential in vitro activity of anidulafungin, caspofungin and micafungin against *Candida parapsilosis* isolates recovered from a burn unit. **Clinical Microbiology and Infection**. Detroit, v.15, n.3, p.274-279, 2008.

GIOLO, Muriel Padovani; SVIDZINSKI, Terezinha Inez Estivalet. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.46, n.3, p.225-234, june 2014.

GONÇALVES, S. S.; AMORIM, C. S.; NUCCI, M.; PADOVAN, A. C. B.; BRIONES, M. R. S.; MELO, A. S. A.; COLOMBO, A. L. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a

nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, São Paulo, v.16, n. 7, p. 885-887, july, 2010.

GRIFFIN, P. M.; PRICE, G. R.; SCHOONEVELDT, J. M.; SCHLEBUSCH, S.; TILSE, M. H.; URBANSKI, T.; HAMILTON, B.; VENTERA, D. Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry To Identify Vancomycin-Resistant Enterococci and Investigate the Epidemiology of an Outbreak. **Journal of Clinical Microbiology**, Brisbane, v.50, n.9, p.2918-2931, sep, 2012.

HAZEN, Kevin C. Influence of DMSO on antifungal activity during susceptibility testing *in vitro*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. Harlottesville, v. 75, p. 60-63, 2013.

HINRICHSEN, Sylvia Lemos; FALCÃO, Erika; VILELLA, Tatiana Aguiar Santos; COLOMBO, Arnaldo Lopes; NUCCI, Márcio; MOURA, Líbia; RÊGO, Leandro; LIRA, Conceição; ALMEIDA, Luciano. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Recife, v.41, n.4, p.394-398, jul-ago, 2008.

HRABÁK, Jaroslav; STUDENTOVÁ, Vendula; WALKOVÁ, Radka; ZEMLIČKOVÁ, Helena; JAKUBU, Vladislav; CHUDÁČKOVÁ, Eva; GNIADKOUSKI, Marek; PFEIFER, Yvonne.; PERRY, John D.; WILKINSON, Kathryn; BERGEROVÁ, Tamara. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48 and OXA-162 Carbapenemases by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, Newcastle upon Tyne, v.50, n.7, p.2441-2443, may, 2012.

HRABÁK, Jaroslav; CHUDÁČKOVÁ, Eva; WALKOVÁ, Radka. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry for Detection of Antibiotic Resistance Mechanisms: from Research to Routine Diagnosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Plzen, v.26, n.1, p.103–114, jan, 2013.

IDELEVICH, Evgeny A.; GRUNEWALD, Camilla M.; LLENWEBER, Jorg. Wullenwebwer.; BECKER, Karsten. Rapid Identification and Susceptibility Testing of *Candida* spp. from Positive Blood Cultures by Combination of Direct MALDI-TOF Mass Spectrometry and Direct Inoculation of Vitek 2. **PLOS ONE**, Munster, v.9, n.12, dec, 2014.

JOACHIM H, POLAYES S. Subacute endocarditis and systemic mycosis (monilia). **Systemic Mycosis**, v.115, n.3, p.205-208, july 1940.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; VACCARI, E. M. H.; MELO, N. T.; **Tratado de Micologia Médica**. 9º Ed. São Paulo; Sarvier, 2002.

LANTERNIER, F.; LORTHOLARY, O. Anidulafungine une nouvelle option thérapeutique dans les candidoses systémiques. **Médecine et maladies infectieuses**, Paris, v.40, n.8, p.440-448, dec, 2010.

LIMA-NETO, Reginaldo; SANTOS, Cledir; LIMA, Nelson; SAMPAIO, Paula; PAIS, Célia; NEVES, Rejane Pereira. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a

Candida clinical isolates culture collection. **Brazilian Journal of Microbiology**, Braga, v.45, n.2, p.515-522, sep, 2014.

MAJCHERCZYK, Paul A.; MCKENNA, Therese; MOREILLON, Philippe; VAUDAUX, Pierre. The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiol Lett**, v.255, n. 2, p.233–239, feb. 2006.

MALAKHOVA, M.V.; VERESHCHAGIN, V.A.; IL'INA, E.N.; GOVORUN, V.M.; FILIMONOVA, O.; GRUDININA, S.A.; SIDORENKO, S.V. MALDI-ToF mass-spectrometry in analysis of genetically determined resistance of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolone. **Antibiot.Khimioter.**v.52 p.10 –17, 2007 (In Russian) [[PubMed](#)].

MALIGIE, Marybeth A.; SELITRENNIKOFF, Claude P. *Cryptococcus neoformans* Resistance to Echinocandins: (1,3)-Glucan Synthase Activity Is Sensitive to Echinocandins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Aurora, v. 49, n.7, p. 2851–2856, july 2005.

MARINACH, Carine; ALANIO, Alexandre; PALOUS, Martine; KWASEK, Stéphanie ; FEKKAR, Arnaud; BROSSAS, Jean-Yves; BRUN, Sophie; SNOUNU, Georges; HENNEQUIN, Christophe; SANGLAND, Dominique; DATRY, Annick; GOLMARD, Jean-Louis; MAZIER, Dominique. MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: the example of *Candida albicans* and fluconazole. **Proteomics**, Paris, v. 9, p.4627-4631, june 2009.

MARTÍNEZ-LAMAS, Lucía; MOLINO, María Luisa Pérez; PARDO, Fernanda; VARELA, Eduardo; REGUEIRO, Benito José. Espectrometría de masas matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight vs. metodología convencional en la identificación de *Candida no-albicans*. **Enferm Infecc Microbiol Clin**. Santiago de Compostela, v.29, n. 8, p. 568–572, 2011.

MARVIN, Laure F.; ROBERTS, Matthew A.; FAY, Laurent B. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**. St. Louis, v. 337, p.11-21, aug, 2003.

MCDUGALD, Diane; RICE, Scott A.; BARRAUD, Nicolas; STEINBERG, Peter D.; KJELLEBERG, Sataffan. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. **Nature Reviews Microbiology**, Sydney, v. 10, n. 2012, p. 39-50, jan, 2012.

MIKULSKA, Małgorzata; CALANDRA, Thierry; SANGUINETTI, Maurizio; POULAIN, Daniel; VISCOLI, Claudio. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. **Critical Care**, Genoa, v.14, p.1-14, 2010.

MIRANDA, Lourdes das Neves; RODRIGUES, Eliete C. A.; COSTA, Silvia F.; VAN DER HEIJDEN, Inneke Marie; DANTAS, Kátia C. LOBO, Renata D.; BASSO, Mariusa; VARKULJA, Gláucia F.; KREBS, Vera Lúcia Jornada; GIBELLI, Maria

Augusta Bento Cicaroni; CRIADO, Paulo R.; LEVIN, Anna Sara. *Candida parapsilosis* candidaemia in a neonatal unit over 7 years: a case series study. **BMJ Open**, São Paulo, p.1-6, feb, 2012.

MONTAGNA, Maria Teresa; LOVERO, Grazia; CORETTI, Caterina; MARTINELLI, Domenico; GIGLIO, Osvalda.; IATTA, Roberta; BALBINO, Stella; ROSATO, Antonio; CAGGIANO, Giuseppina. Susceptibility to echinocandins of *Candida* spp. strains isolated in Italy assessed by European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing and Clinical Laboratory Standards Institute broth microdilution methods. **BMC Microbiology**, Bari, v.15, n.106, p.1-6, 2015.

MUELLER-LOEBNITZ, Christoph; OSTERMANN, Helmut; FRANZKE, Anke; LOEFLER, Juergen; UHAREK, Lutz; TOPP, Max; EINSELE, Hermann. Immunological Aspects of *Candida* and *Aspergillus* Systemic Fungal Infections. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Disease**, Berlin, p. 1-7, jan. 2013.

MULU, Andargachew; KASSU, Afework; ANAGAW, Belay; GELAW, Aschalew; ALEMAYEHU, Martha; BELYHUN, Yeshambel; BIADGLEGNE, Fantahun; HURISSA, Zewdu; MOGES, Feleke; ISOGAI, Emiko. Frequent detection of 'azole' resistant *Candida* species among late presenting AIDS patients in northwest Ethiopia. **BMC Infectious Diseases**, Leipzig, v.13, n.82, p.1-10, 2013.

NOMURA, Fumio. Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. **Biochimica et Biophysica Acta**, Chiba, v.1854, p.528–537, 2015.

PAM, V. K.; AKPAN, J. U.; ODUYEBO, O. O.; NWAOKORIE, F. O.; FOWORA, M. A.; OLADELE, R. O.; OGUNSOLA, F. T.; SMITH, S. I.; Flucanazole susceptibility and ERG11 gene expression in vaginal *Candida* species isolated from Lagos Nigeria. **Journal of Molecular Epidemiology and Genetics**, Lagos, v.3, n.1, p. 84-90, feb, 2012.

PANDA, Ashutosh; GHOSH, Anup K.; MIRDHA, Bijay R.; XESS, Immaculata; PAUL, Saikat; SAMANTARAY, Jyotish C.; SRINIVASAN, Alagiri; KHALIL, Shehla; RASTOGI, Neha; DABAS, Yubhisha. MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of clinical fungal isolates based on ribosomal protein biomarkers. **Journal of Microbiological Methods**, Chandigarh, v. 109, p. 93–105, 2015.

PERLIN, David S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. **Drug Resist Updat.**, New Jersey, v.10, n.3, p.121-130, june 2007.

PERLIN, David S. Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance. **ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES**, Newark, p. 1-11, 2015, ISSN 0077-8923.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. **Clinical Microbiology Reviews**, Iowa, v.20, n.1, p.133–163, jan, 2007.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; KROEGER, J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. In Vitro Susceptibility of Invasive Isolates of *Candida* spp. to Anidulafungin, Caspofungin, and Micafungin: Six Years of Global Surveillance. **Journal Of Clinical Microbiology**, Iowa, v.46, n.1, p. 150–156, jan. 2008.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; ANDES, D.; ARENDRUP, M.C.; BROWN, S.D.; LOCKHART, S.R.; MOTYL, M.; PERLIN, D.S.; the CLSI Subcommittee for Antifungal Testing. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: Integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. **Drug Resistance Updates**, Iowa, p. 1-13, jan, 2011, doi:10.1016/j.drug.2011.01.004.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Progress in Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* spp. by Use of Clinical and Laboratory Standards Institute Broth Microdilution Methods, 2010 to 2012. **Journal of Clinical Microbiology**, Iowa, v.50, n.9, p.2846-2856, sep, 2012.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; LEAH N. WOOSLEY, JONES, R. N.; CASTANHEIRA, M. Echinocandin and Triazole Antifungal Susceptibility Profiles for Clinical Opportunistic Yeast and Mold Isolates Collected from 2010 to 2011: Application of New CLSI Clinical Breakpoints and Epidemiological Cutoff Values for Characterization of Geographic and Temporal Trends of Antifungal Resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, Iowa, v.51, n.8, p.2571-2581, aug, 2013.

PIRES, Regina Helena; SANTOS, Jaime Maia; ZAIA, José Eduardo; MARTINS, Carlos Henrique Gomes; MENDES-GIANNINI, Maria José Soares. *Candida parapsilosis* complex water isolates from a haemodialysis unit: biofilm production and in vitro evaluation of the use of clinical antifungals. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.106, n.6, p.646-654, sep. 2011.

POSTERARO, Brunella; SANGUINETTI, Maurizio. The future of fungal susceptibility testing. **Future Microbiology**, Rome, v.9, n.8, p.947–967, 2014.

PULCRANO, Giovanna; IULA, Dora Vita; VOLLARO, Antonio; TUCCI, Alessandra; CERULLO, Monica; ESPOSITO, Matilde; ROSSANO, Fabio; CATANIA, Maria Rosaria. Rapid and reliable MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Candida non-albicans* isolates from bloodstream infections. **Journal of Microbiological Methods**, Naples, v.94, p.262-266, july 2013.

PUTIGNANI, L.; DEL CHIERICO, F.; ONORI, M.; MANCINELLI, L.; ARGENTIERI, M.; BERNASCHI, P.; COLTELLA, L.; LUCIGNANO, B.; PANSANI, L. RANNO, S.; RUSSO, C.; URBANI, A.; GIORGIO FEDERICI, G.; MENICHELLA, D. MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi. **Molecular BioSystems**, Roma, v.7, n.3, p. 620-629, sep. 2010.

RAMESH, Nachimuthu; PRIYADHARSINI, Maruthupandian; SUMATHI, Chettipalayam Samiappan; BALASUBRAMANIAN, Velramar; HEMAPRIYA, Janarthanam; KANNAN, Rajesh. Virulence Factors and Anti Fungal Sensitivity

Pattern of *Candida* sp. Isolated from HIV and TB Patients. **Indian J Microbiol.** Tiruchirappalli, v.51, n.3, p.273–278, april, 2011.

RODRIGUES, Daniela; MEZZARI, Adelina; FUENTEFRIA, Alexandre Meneghello. Candidúria: Revisão Atual. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, Fortaleza, v. 24, n.2, p.142-150, abr-jun 2011.

ROMEO, Orazio; DEFINO, Demetrio; CASCIO, Antonio.; PASSO, Carla; AMORINI, Maria; ROMEO, Daniela; PERNICE, Ida. Microsatellite-based genotyping of *Candida parapsilosis* sensu stricto isolates reveals dominance and persistence of a particular epidemiological clone among neonatal intensive care unit patients. **Infection, Genetics and Evolution**, Messina, v.13, p.105-108, jan, 2013.

SARACLI, Mehmet A.; FOTHERGILL, Annette W.; SUTTON, Deanna A.; WIEDERHOLD, Nathan P. Detection of triazole resistance among *Candida* species by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **Medical Mycology**, San Antonio, v.53, 736–742, july, 2015.

SEGHIR, A.; BOUCHERIT-OTMANI, Z.; BELKHERROUBI-SARI, L.; BOUCHERIT, K. Cathétérisme et risque infectieux fongique au centre hospitalo-universitaire de Tlemcen: épidémiologie et sensibilité aux antifongiques. **Journal de Mycologie Médicale**, Naâma, v. 24, p.e179-e184, oct, 2014.

SHIBATA, Nobuyuki; KOBAYASHI, Hidemitsu; SUZUKI, Shigeo. Immunochemistry of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on mannan. Proceedings of The Japan Academy. **Series B Physical and Biology Sciences**, Miyagi, v. 88, p. 250-265, 2012.

SIDRIM, José Júlio Costa; ROCHA, Marcos Fábio Gadelha. **Micologia Médica a Luz dos Autores Contemporâneos**; Edição 1, Rio de Janeiro; Editora GUANABARA, 2004, p. 265-274.

SILVA, Hygor Rodrigues; REGINI, Jefferson Roberto Reginato; NEGRI, Melyssa. Biofilme: ameaça invisível em ambientes Cirúrgicos. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, Ingá, v.4,n.1, p. 43-48, set-nov, 2013.

SILVA, Carolina M.; CARVALHO-PARAHYM, Ana Maria R.; MACÊDO, Danielle P. C; LIMA-NETO, Reginaldo G.; FRANCISCO, Elaine C.; MELO, Analy S. A.; SILVA, Maria Conceição M.; JUCÁ, Moacir B.; MELLO, Luciana R. B; AMORIM, Rosemary M. J.; NEVES, Rejane P. Neonatal Candidemia Caused by *Candida haemulonii*: Case Report and Review of Literature. **Mycopathologia**, Recife, feb, 2015.

SOARES, Urias Junior de Oliveira; SOUZA, Gerusa Rios; BARBOSA, Amir Horiqini; MARTINS, Carlos Henrique Gomes; PIRES, Regina Helena. Detecção e identificação de leveduras em sucos de laranja natural comercializados. **Alimentos e Nutrição**. Araraquara, v. 22, n. 4, p. 663-668, out- dez, 2011.

SUAREZ, S.; NASSIF, X.; FERRONI, A. Applications de la technologie MALDI-TOF en microbiologie clinique. **Pathologie Biologie**, Paris, v.63, p.43–52, 2015.

TANAKA, K. The origin of macromolecule ionization by laser irradiation. **Nobel Lecture**, Kyoto, p.197-217, dec, 2002.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A.; MAIDEN, M. C.; ODDS, F. C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, Oxford, v.43, n.1, p.284-92, jan, 2005.

TUMBARELLO, Mario; FIORI, Barbara; TRECARCHI, Enrico Maria; POSTERARO, Patrizia.; LOSITO, Angela Raffaella; DE LUCA, Alessio; SANGUINETTI, Maurizio; FADDA, Giovanni; CAUDA, Roberto; POSTERARO, Brunella. Risk Factors and Outcomes of Candidemia Caused by Biofilm-Forming Isolates in a Tertiary Care Hospital. **PLoS ONE**, Rome, v.7 ,n. 3, p.1-9, mar, 2012.

VEEN, S. Q.; CLAAS, E.C. J.; KUIJPER, E. J. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, Leiden, v.48, n.3, p.900-907, mar, 2010.

VELLA, Antonietta; CAROLIS, Elena; VACCARO, Luisa; POSTERARO, Patrizia; PERLIN, David S.; KOSTRZEWA, Markus; POSTERARO, Brunella; SANGUINETTI, Maurizio. Rapidal antifungal susceptibility testing by Matrix- Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Rome, v.51, n.9, p.2964-2969, set, 2013.

VIJAYAKUMAR, Ramraj; GIRI, Sidhartha; KINDO, Anupma Jyoti. Molecular species identification of *Candida* from Blood Samples of Intensive Care Unit Patients by Polymerase Chain Reaction – Restricted Fragment Length Polymorphism. **Journal of Laboratory Physicians**, Chennai, v.4, n.1, p.1-4, jan-jun, 2012.

WALKER, Louise A.; GOW, Neil. A. R.; MUNRO, Carol A. Elevated Chitin Content Reduces the Susceptibility of *Candida* Species to Caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Aberdeen, v.57, n.1, p.146-154, jan, 2013.

WANG, H.; LIU, N.; YIN, M.; HAN, H.; YUE, J.; ZHANG, F.; SHAN, T.; GUO, H.; WU, D. The epidemiology, antifungal use and risk factors of death in elderly patients with candidemia: a multicentre retrospective study. **BMC Infectious Diseases**, Shandong, v. 14, p. 1-9, 2014.

WILKE, M. H. Treatment and Prophylaxis of Invasive Candidiasis With Anidulafungin, Caspofungin and Micafungin and its Impact on Use and Costs - Review of The Literature. **Europe an Journal of Medical Research**, Munich, v. 16, p.180-186, apr, 2011.

XIAO, Meng; FAN, Xin; CHEN, Sharon C.-A.; WANG, He; SUN, Zi-Yong; LIAO, Kang; CHEN, Shu-Lan.; YAN, Yan.; KANG, Mei; HU, Zhi-Dong; CHU, Yun-Zhuo; HU, Tie-Shi; NI, Yu-Xing; ZOU, Gui-Ling; KONG, Fanrong; XU, Ying-Chun. Antifungal susceptibilities of *Candida glabrata* species complex, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* species complex and *Candida tropicalis* causing invasive candidiasis in

China: 3 year national surveillance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Harbin, p.1-9, oct, 2014.

YAMAN, Gorkem; AKYAR, Isin; CAN, Simge. Evaluation of the MALDI TOF-MS method for identification of Candida strains isolated from blood cultures. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Istanbul, v.73, p.65–67, jan, 2012.

ZBOROMYRSKA, Yuliya; FERRER-NAVARRO, Mario; MARCO, Francesc; VILA, Jordi. Detección de resistencia a agentes antibacterianos mediante MALDI-TOF espectrometría de masas. **Rev Esp Quimioter**, Barcelona, v.27, n.2, p.87-92, 2014.

APÊNDICE A- TERMO DE COMPROMISSO E CONFIDENCIALIDADE

TERMO DE COMPROMISSO E CONFIDENCIALIDADE

Título do projeto: Detecção de resistência antifúngica as equinocandinas de isolados clínicos de *Candida parapsilosis* stricto sensu, *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis* através de espectrometria de massa.

Pesquisador responsável: Reginaldo Gonçalves de Lima Neto

Instituição/Departamento de origem do pesquisador: Universidade Federal do Pernambuco-UFPE/ Departamento de Medicina Tropical

Telefone para contato: (81) 99147-9644

E-mail: goncalves_reginaldo@hotmail.com

O(s) pesquisador (es) do projeto acima identificado(s) assume(m) o compromisso de:

- Preservar o sigilo e a privacidade dos voluntários cujos dados (informações de prontuários e/ou materiais biológicos) serão estudados;
- Assegurar que as informações e/ou materiais biológicos serão utilizados, única e exclusivamente, para a execução do projeto em questão;
- Assegurar que os resultados da pesquisa somente serão divulgados de forma anônima, não sendo usadas iniciais ou quaisquer outras indicações que possam identificar o voluntário da pesquisa.

O(s) pesquisador (es) declara(m) que os dados coletados nesta pesquisa (idade, sexo, doença de base, uso de medicamentos, etc), ficarão armazenados em (pastas de arquivo no computador pessoal do pesquisador responsável), sob a responsabilidade do (Ana Emília de Medeiros Roberto), sob a responsabilidade do pesquisador orientador (Reginaldo Gonçalves de Lima Neto) no endereço (acima informado), pelo período de mínimo 5 anos.

O(s) Pesquisador(es) declara(m), ainda, que a pesquisa só será iniciada após a avaliação e aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco – CEP/CCS/UFPE.

Recife, de de 20.....

Assinatura Pesquisador Responsável

APÊNDICE B– MANUSCRITO SUBMETIDO A MEDICAL MYCOLOGY

Comparison between antifungal susceptibility testing by CLSI and MALDI-TOF MS for echinocandins against clinical isolates of the *Candida parapsilosis* complex.

Ana Emília de Medeiros Roberto¹; Rejane Pereira Neves¹; Júlia Furtado Campos²; Reginaldo Gonçalves de Lima Neto ¹.

¹Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil and Center for Strategic Technologies Northeastern (CETENE), Brazil

To whom correspondence should be addressed:

Reginaldo G Lima-Neto.

Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil. 50670-901. Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco. Tel.: + 55 81 2126 8570; Fax: + 55 81 2126 8481. Email: goncalves_reginaldo@hotmail.com

ABSTRACT

MALDI-TOF MS is a physico-chemical technique that has been used for rapid and reliable microbial identification; however rare studies extend its application to a novel assay of antifungal susceptibility testing (AFST). Furthermore, AFST is an essential procedure to predict success of antifungal therapy. Herein, MALDI-TOF was applied to discriminate the profile of susceptibility or resistance of clinical isolates of *Candida parapsilosis* complex. 26 *C. parapsilosis*, 2 *C. orthopsilosis* and 2 *C. metapsilosis* strains were exposed to anidulafungin, caspofungin and micafungin at ten different concentrations (0.03-16 µg/ml) plus drug-free control after 15-h incubation. The MALDI-TOF spectra at these concentrations were used to create the individual composite correlation index (CCI) matrices for each isolate. After cross correlations and autocorrelations of every spectrum concentration with the extreme concentrations, 0 (null) and 16 (maximal), the composition was used as distance parameter between spectra. CCI values around 1 represent high conformance, while CCI values near 0 indicate clear diversity of the spectra. The results were automatically translated into a heat map, and then compared to the classifications for susceptible or resistant obtained by MICs according to CLSI M27-A3 and M27-S4 guidelines. The MALDI-TOF assay was able to classify echinocandin susceptibility against all strains. The Minimum Profile Change Concentration and MIC from *C. parapsilosis* isolates obtained by MALDI-TOF MS and CLSI demonstrate concordance of 91.6%, 96.6% and 98.3% for anidulafungin, caspofungin and micafungin, respectively. These results showed that MALDI-TOF may be used to simultaneously determine the *Candida* species and classification as susceptible or

resistant to echinocandins, in addition provide a rapid and reliable means of detecting emerging antifungal.

Key-words: *Candida parapsilosis*, MALDI-TOF MS, Echinocandin, Antifungal resistance.

Introduction

There is a general consensus that clinical outcomes in invasive fungal infections (IFIs) are better when treatments are started earlier. Despite new antifungal agents such as echinocandins, invasive candidiasis is associated with excessive morbidity and mortality, as well as a higher charge on healthcare [1].

While *C. albicans* is still the major species associated with candidemia, the frequency of isolation of non-*C. albicans* *Candida* species differs with geographical location. Thereby, Brazil has displayed some unique epidemiologic features regarding candidemia, as the typical species distribution with high rates of *C. parapsilosis* [2].

A crucial issue always was whether current antifungal susceptibility methods and their breakpoints are capable of identifying resistant fungal strains and may be correlated with therapy failures. This way, new alternate methods should be introduced to improve the detection of antifungal resistance, which is perhaps the most challenging goal in clinical microbiology [3].

Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) is a physical and chemical technique that has been used for rapid and reliable microbial identification. Recently, this method has been previously applied to the detection of yeasts and filamentous molds that have acquired resistance to antifungal compounds [4, 5, 6].

The change that occurs in the protein composition of *Candida* isolates after exposure to antifungal drugs allows a determination of the minimal profile change concentration (MPCC), an endpoint value that is an alternative to the classical minimal minimum inhibitory concentration (MIC) obtained by CLSI [4, 7, 8]. The objective of this study was to evaluate MALDI-TOF MS as a method of determining echinocandins antifungal resistance in clinical isolates of *Candida parapsilosis complex* and to compare the agreement level with CLSI protocol.

Materials and Methods

Strains, storage and identification

The collections of clinical samples were started after the approval of the Ethics Committee on Human Research of the Federal University of Pernambuco identified by protocol CAAE 35762214.2.0000.5208. 44 specimen positive for Candidemia were collected from different patients admitted into intensive care units of three tertiary public hospitals at the Northeastern from Brazil among August, 2014 to July, 2015. Three samples of venous blood was aseptically collected on consecutive days by venipuncture in Vacutainer® tubes containing EDTA and subsequently incubated in tubes containing medium Brain Heart Infusion at 37 °C for isolation of the etiologic agent. The isolates were identified by MALDI-TOF MS and a representative of species was stocked in URM Culture Collection at the Federal University of Pernambuco, under registered number WFCC 604.

Antifungal Susceptibility Testing by CLSI Method

The technique followed the M27-A3 and M27-S4 guidelines [7, 8]. The culture medium used was RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA) with L-glutamine and without sodium bicarbonate, pH 7.0 ± 0.1 , morpholino propane sulfonic acid (MOPS; 0.165 mol.L^{-1} ; Sigma-Aldrich, USA). The culture medium was sterilized in $0.22 \text{ }\mu\text{M}$ membrane (Millipore, Darmstadt, Germany). Commercial antifungal agents used were the class of echinocandins, prepared in Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Synth, Diadema, Brazil). Caspofungin (MSD, Clermont-Ferrant, France), anidulafungin (Pfizer, Kalamazoo, EUA) and micafungin (Astellas, Toyama, Japan) were prepared and used at concentrations among 0.03 to $16 \text{ }\mu\text{g/ml}$. The *Candida parapsilosis* clinical isolates obtained from the blood cultures were maintained on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) plus yeast extract and incubated at $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24-h. The isolates suspensions were prepared in saline solution (0.85g/l NaCl) and density was adjusted according to the 0.5 MacFarland scale at 90% transmittance in a spectrophotometer at 530nm. This inoculum was two-fold diluted to achieve 10^3 CFU/ml .

In susceptibility testing were used in flat 96-well microtiter plates (TPP; Trasadingen, Switzerland). The inoculum was added to the wells with antifungal agents for testing, and the plates were incubated at $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 hours to determine the MIC. The MIC for echinocandins were determined for 50% inhibition compared to control wells. The test was performed in duplicate.

Antifungal Susceptibility Testing by MALDI-TOF MS (AFST-MS)

The AFST-MS was performed according to Marinach et al. [4] with modifications proposed for De Carolis et al. [10]. Protein extracts of *Candida parapsilosis* complex isolates were obtained from a suspension of 10^7 CFU/ml ,

cultured in RPMI containing serial dilutions of caspofungin, anidulafungin and micafungin (0.03125 to 16 µg/ml) in microtiter plates and maintained at 37 °C under stirring for 15-h. Suspension in RPMI without adding antifungal was used as negative control. The cells were washed twice in sterile water and resuspended in 10% formic acid. One microliter of each yeast suspension was directly spotted in duplicate on polished steel target plate (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), and then was added 1 µl of absolute ethanol and 1 µl of a saturated solution acid α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile - 2.5% trifluoroacetic acid, and allowed to air dry completely.

Spectra were acquired with Autoflex III Mass Spectrometer (Bruker Daltonics, Germany/USA) within a mass range from 3000 to 8000 Da and recorded in positive linear mode [4]. For each experiment, spectra were obtained from the total of 10 concentrations of each of the three antifungals and drug free control the control positive, resulting in 33 different experimental conditions for yeast, and 990 analyzes throughout the population evaluated and were imported and analyzed to the software MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics, Germany/USA).

The CLSI QC strain *Candida parapsilosis* ATCC 22019 was included in AFST by MALDI-TOF MS and CLSI method on each day of antifungal susceptibility testing.

Data Analysis

The Correlation Composite Index (CCI) tool from MALDI Biotyper was used for statistical analysis to examine the relationship between the spectra according to previously described by Arnold and Reilly [9] and was adapted for MALDI-TOF MS-based AFST by De Carolis et al. [10] for *Candida* spp. and simplified by Vella et al. [5] for *C. albicans*.

The composition of cross correlations and autocorrelations of each isolate was used as a distance parameter between the spectra. CCI values around 1 represents a high conformance of spectra, while CCI values near 0 indicate a clear diversity of the spectra. The results were automatically viewed in a correlation matrix was translated in a heat map, where closely related spectra are marked in hot colors and unrelated ones in cold colors, based on their respective high or low CCI values. Thus, we matched for each concentration its spectrum similarity against each of the two extreme concentrations (null or maximum) of the drug according to Marinach et al. [4]. This allowed determination of the MPCC for echinocandins, a value defined as the lowest drug concentration at which a spectrum is more similar to the one observed at the maximum concentration than the spectrum observed at the null concentration [10].

Classification of each isolate by the MALDI-TOF MS based assay was compared them with its CLSI-based AFST classification. The categorical placement of a strain according to the CLSI breakpoint was used as a gold standard to evaluate the agreement of the MALDI-TOF MS based susceptibility assay.

Results

Of the 44 patients, 30 of these isolates from different patients were identified from complex *Candida parapsilosis* for MALDI-TOF MS, these were selected for both methodologies CLSI and MALDI-TOF MS. The most frequent isolates were 30 (68,1%) yeast of complex *Candida parapsilosis*, where 26 (59%) yeasts are the species *Candida parapsilosis stricto sensu*, 2 (4,5%) *Candida orthopsilosis* and 2 (4,5%) *Candida metapsilosis*. The other yeasts were 10 (22,7%) of *Candida albicans*, 2 (4,5%) *Candida tropicalis*, 1 specie (2,2%) of *Candida haemulonii* and 1 identified

only as isolated *Candida* sp, because it does not develop in synthetic medium Sabouraud Dextrose Ágar.

The antifungal susceptibility testing according to CLSI classifies as susceptible against echinocandins (anidulafungin, caspofungin and micafungin) strains of *C. parapsilosis* complex that exhibit MIC ≤ 2 µg/ml, intermediate at 4µg/ml and resistant ≥ 8 µg/ml. All yeasts isolates (100%) were sensitive to the anidulafungin, 29 (96.6%) were sensitive and 1 (3.5%) was resistant to the caspofungin. For micafungin, 29 (96.6%) were sensitive and 1 (3.5%) was intermediate.

When comparing the two methods have the following results: 1) MALDI-TOF MS showed 25 (83.3%) anidulafungin-susceptible yeasts, 2 (6.6%) resistant yeast and 3 (9.9%) intermediate yeasts, while by CLSI all 30 (100%) yeasts were susceptible. The MALDI-TOF MS showed 29 (96.6%) caspofungin- susceptible yeast and one resistant (3.3%), similar to the CLSI results. The MALDI-TOF MS displayed all 30 (100%) micafungin-susceptible yeasts, whereas for the CLSI was obtained 29 (96.6%) susceptible and 1 (3.3%) intermediate.

The condition assays described in CLSI M27-A3 were followed in order to enable a better comparison between CLSI and MALDI-TOF MS based AFST. The breakpoints determined through echinocandin concentrations obtained by MIC and MPCC are summarized in Table 1.

Using the reference CLSI AFST as the gold standard, the reproducibility value in relation to MALDI-TOF MS based AFST of each species and echinocandin drugs varied from 91,6%, 96,6% and 98% anidulafungin, caspofungin and micafungin respectively.

The major discrepancy was *Candida parapsilosis* 5551 isolate which presented MIC of 0.5 µg/ml against anidulafungin being categorized as susceptible,

but MPCC of 8 µg/ml by mass spectrometry being resistant. All *Candida parapsilosis* 5551 spectra were correlated and autocorrelated generating an array translated into heat map (Figure 1) via CCI. Table 2 shows the CCI null and maximum values for each concentration which were used to generate the correlation matrix.

The *Candida parapsilosis* 5551 remained unchanged against caspofungin and micafungin under CLSI and MALDI-TOF MS methods, classified as susceptible with MIC and MPCC of 0.5 µg/ml, respectively. The heat map and correlation matrix are presented in Figure 2 and Table 3 to caspofungin and Figure 3 and Table 4.

After to cross each spectra concentration with one of the two extreme concentrations, maximum or null, the CCI matrix derived presents to the right side of the heat maps their maximum concentrations and to the bottom thereof their null concentrations. These results were expressed in a tables for each drug evaluated.

Discussion

Mass spectrometry by MALDI-TOF has been proposed as an economical alternative to conventional identification methods. Studies have shown that MALDI-TOF MS allows rapid and accurate identification of yeast cultures from the protein extraction from clinical isolates, showing agreement with the conventional identification [11].

The MALDI-TOF MS allows the comparison of spectra showing the variations among the protein composition of susceptible and resistant strains. Thus, after exposure of the *Candida parapsilosis* complex at the different concentrations of each echinocandin could be observed a variation in the proteins expression of each yeast. The complex *Candida parapsilosis* is considerate the second agent of candidemia

very important in the Latin America. The literature show which there are few data on the distribution and susceptibility to antifungal agents of these species *Candida*.

It is also important to note that the yeasts used in this study were clinical isolates from candidemia patients addimitted in UCI and were chosen irrespective of the type of drug resistance mechanisms. As expected, the CLSI-based AFST can detect resistance of an isolate regardless of resistance mechanism; however, resistance detected by MALDI-TOF MS spectra is possible when the amount of modified protein is expressed sufficiently in the cells to be discriminated.

Guinea [12] show which Northern Europe and the USA was observed a high number of cases caused by *C. glabrata* and a low number of cases caused by *C. parapsilosis*. However, reports from Spain and Brazil demonstrated a lower number of cases caused by *C. glabrata* and higher number of cases attributed to *C. parapsilosis*. The explanation is unknown, although it may be a consequence of the impact of climate, antifungal policy, or central venous catheter care procedures.

This is a first paper using only complex *Candida parapsilosis* using the three echinocandins in ten different concentrations and a control positive. In the papers previous using others species of *Candida*, however, in that paper the complex *C. parapsilosis* showed more predominant in the three hospitals involved in research [4, 5, 6, 10]. A factor is which this opportunistic species transmitted throughout the hospital environment. Furthermore, De Carolis et al. [10], using in their study of four species complex *Candida parapsilosis*, in our study we used thirty species of the same complex possible to determine the sensitivity for the majority of the isolates tested. Compared the AFST from CLSI and the MALDI-TOF MS methods was possible to observe the correlation between both, achieving a performance of 91.6% to 98.3%. Of the three echinocandins assessed the AFST by MALDI-TOF MS,

caspofungin presented same values to the CLSI protocol. Micafungin values differed on 3% when MALDI-TOF MS was compared to the CLSI. Anidulafungin showed a greater error of 17% despite methodologies. After 15 hours it was possible to determine the best drug and dose for treatment of candidemia by AFST for MALDI-TOF MS leading there is accuracy in reading and more accurate results.

Pilot tests were performed with a reduced incubation time, however we did not get favorable results, therefore we use the longest incubation time. Currently new tests have been performed with an incubation interval much reduced with changes in the methodology in order to make the most accurate test.

Here in, we evaluated a full range of antifungal concentrations for the isolates, which we allow to determined CCI ratios describe with a more robust tolerance value. The reproducibility of MALDI-TOF MS based AFST is still somewhat laborious, however, shows the reliable when compared with CLSI based AFST for *Candida parapsilosis* complex against echinocandins. A larger number of isolates needs to be tested to determine what tolerance zone for CCI ratios will be appropriate and may allow for more reproducible values with future use in the microbiologic laboratorial routine.

In summary, our data show that the endpoint readings with MALDI-TOF MS represent a slight time savings (15 hours versus 24 hours) over the CLSI method, MALDI-TOF MS has great advantage of eliminating subjective read-outs, which occur with the CLSI method when filamentous fungi are tested. A cost comparison of the MALDI-TOF MS with the reference method appears to show an economic disadvantage. However, if compared with commercial CLSI based method that are currently used for antifungal susceptibility testing, MALDI-TOF MS is surely cost-effective for those laboratories that routinely use MALDI-TOF MS for species

identification of clinical isolates [4, 10]. Thus the test is to show that the technology MALDI-TOF MS it is effective when applied to antifungal susceptibility testing assays.

Table 1. Comparison between the TSA * for CLSI** and TSA for MALDI-TOF MS†

Species	N° Isolate	MIC [‡] (µg/mL)			MPCC [•] (µg/mL)		
		Anidulafungin	Caspofungin	Micafungin	Anidulafungin	Caspofungin	Micafungin
<i>C. parapsilosis</i>	02/09	S' (0.25)	S (0.0625)	S (0.25)	I (4)	S (0.03125)	S (0.125)
<i>C. parapsilosis</i>	04/09	S (0.25)	S (0.25)	S (0.25)	S (0.25)	S (0.0625)	S (0.25)
<i>C. parapsilosis</i>	05/09	S (0.25)	S (0.25)	S (0.25)	S (0.0625)	S (2)	S(0.03125)
<i>C. parapsilosis</i>	121	S (0.25)	S (0.125)	S (0.125)	S (2)	S (0.125)	S (0.125)
<i>C. parapsilosis</i>	122	S (0.125)	S (0.25)	S (0.125)	S (0.0625)	S (0.25)	S (0.0625)
<i>C. parapsilosis</i>	251	S (0.0625)	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.125)	S(0.03125)
<i>C. parapsilosis</i>	346 A	S (0.25)	S (0.25)	S (2)	S (0.25)	S (0.0625)	S (1)
<i>C. parapsilosis</i>	346 B	S (0.25)	S (0.25)	S (2)	S (0.25)	S (0.0625)	S (1)
<i>C. parapsilosis</i>	445	S (0.125)	S (0.25)	S (0.25)	S (0.5)	R (8)	S (0.5)
<i>C. parapsilosis</i>	451	S (0.5)	R" (8)	S (0.03125)	S (0.125)	S (2)	S (0.125)
<i>C. parapsilosis</i>	474	S (0.5)	S (0.5)	I ⁺ (4)	I (4)	S (0.25)	S (0.125)
<i>C. parapsilosis</i>	595	S (0.25)	S (0.25)	S (1)	I (4)	S (0.25)	S (0.25)
<i>C. parapsilosis</i>	596 A	S (0.25)	S (0.25)	S (0.5)	S (0.0625)	S (0.0625)	S (0.5)
<i>C. parapsilosis</i>	596 B	S (0.25)	S (0.25)	S (0.5)	S (0.125)	S (0.03125)	S (2)
<i>C. parapsilosis</i>	630	S (0.0625)	S (0.0625)	S (0.0125)	S (0.03125)	S (0.125)	S (0.0625)
<i>C. parapsilosis</i>	653	S (0.125)	S (1)	S (0.25)	S (0.03125)	S (0.03125)	S(0.03125)
<i>C. parapsilosis</i>	2995	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.0625)	S (0.25)	S (0.25)
<i>C. parapsilosis</i>	5283	S (0.125)	S (0.0625)	S (0.25)	S (0.5)	S (0.03125)	S (0.0625)
<i>C. parapsilosis</i>	5551	S (0.5)	S (0.125)	S (0.125)	R (8)	S (0.5)	S (0.5)
<i>C. parapsilosis</i>	6085	S (0.25)	S (0.5)	S (1)	S (1)	S (0.25)	S (0.125)
<i>C. metapsilosis</i>	7398	S (0.03125)	S(<0.03125)	S(<0.03125)	S (0.125)	S (0.125)	S (0.25)
<i>C. parapsilosis</i>	7491	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.125)	S (0.125)	S (0.25)
<i>C. parapsilosis</i>	7736	S (0.25)	S (0.0625)	S (0.25)	S (0.5)	S (0.25)	S (0.5)
<i>C. metapsilosis</i>	7755	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.0625)	S (0.03125)	S(0.03125)
<i>C. parapsilosis</i>	9968	S (0.25)	S (1)	S (0.5)	R (8)	S (0.03125)	S (2)
<i>C. orthopsilosis</i>	12680	S (0.0625)	S (0.5)	S (0.0625)	S (0.25)	S (0.5)	S (1)
<i>C. parapsilosis</i>	13531	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.125)	S (0.25)
<i>C. orthopsilosis</i>	14495	S (0.0625)	S (0.03125)	S (0.25)	S (1)	S (0.125)	S(0.03125)
<i>C. parapsilosis</i>	13650	S (0.25)	S (0.25)	S (2)	S (1)	S (0.5)	S (0.5)
<i>C. parapsilosis</i>	14659	S (<0.03125)	S(<0.03125)	S(<0.03125)	S (0.0625)	S (0.25)	S (0.25)
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	S (0.125)	S (1)	S (0.25)	S (0.125)	S (0.25)	S (0.125)

* TSA- Antifungal Susceptibility Testing

** CLSI-Clinical Laboratory

†MALDI-TOF MS-Assisted Laser Desorption Matrix / Ionization Time of Flight Mass Spectrometry

‡MIC- Minimum Inhibitory Concentration. • MPCC- Minimal Profile Change Concentration

'S-Sensitive. "R-resistant. + I- Intermediate.

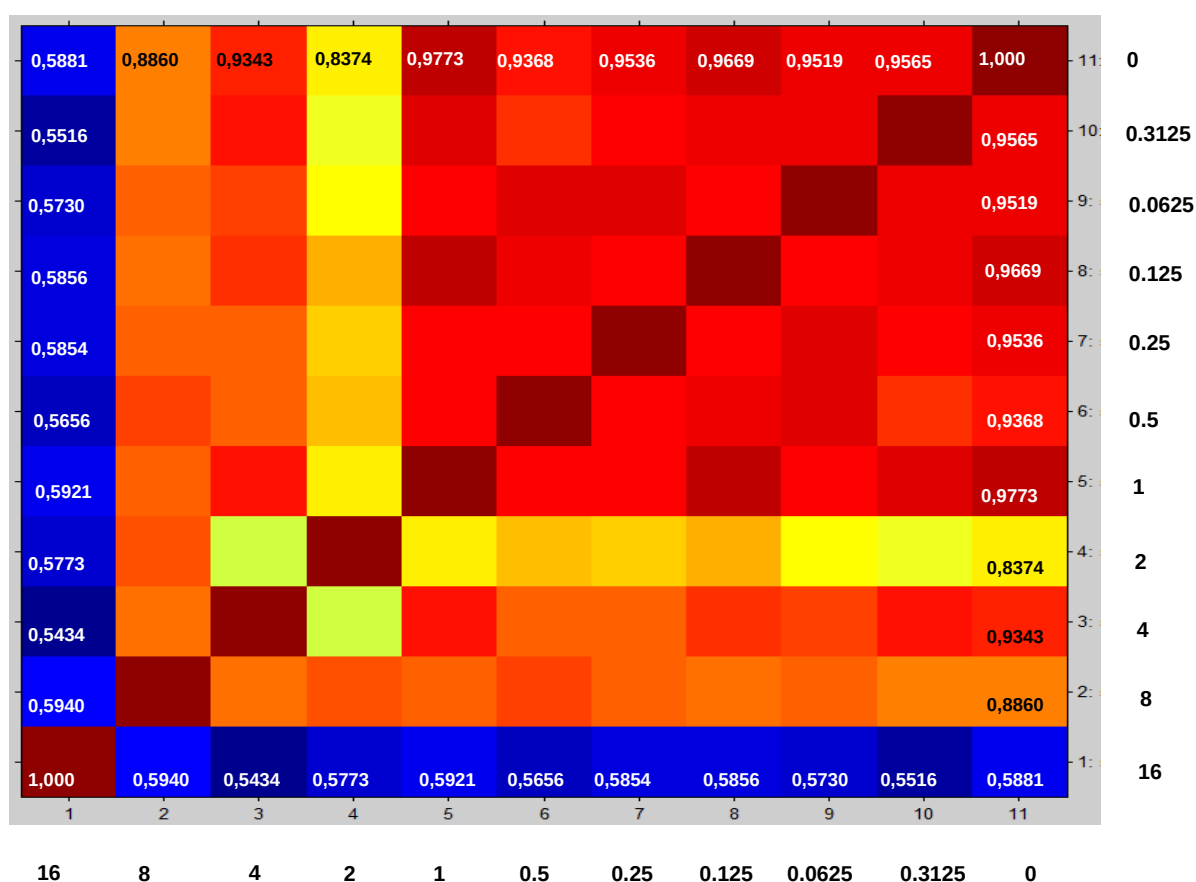


Figure1. Matrix ICC- Yeast 5551 *Candida parapsilosis*, compared to Anidulafungin*

* Performance Correlation Index Compound (ICC) wherein the matrix is derived from the selection of mass spectra for (5551) *Candida parapsilosis* exposed for 15 hours at 37°C (MIC 8µg/mL) for Anidulafungin (including null) of 0,03125 - 16 µg/mL, the correlation of the spectra and auto-correlations have been translated into a heat map where related spectra are shown in warm colors and spectra unrelated in cool colors. Source: MALDI Biotyper version 3.0.

Table 2. Correlation values and self-correlations for anidulafungin

MPCC (µg/mL)	ICC Nulo	ICC Máximo
0	0,5881	1,000
0,03125	0,5516	0,9565
0,0625	0,5730	0,9519
0,125	0,5856	0,9669
0,25	0,5854	0,9536
0,5	0,5656	0,9368
1	0,5921	0,9773
2	0,5773	0,8374
4	0,5434	0,9343
8	0,5940	0,8860
16	1,000	0,5881

Null ICC and ICC maximum values for Anidulafungin (8µg/mL) to (5551) *Candida parapsilosis*.

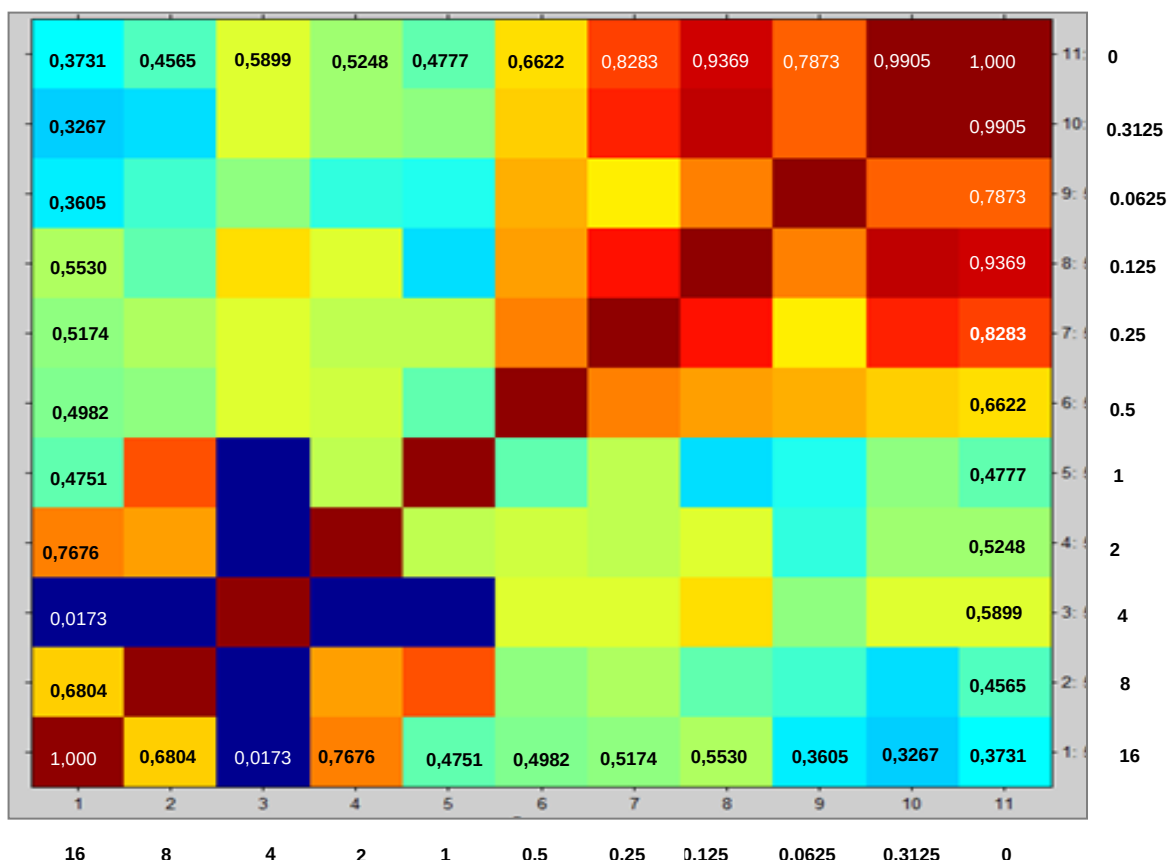


Figure 2. Matrix ICC- Yeast 5551 *Candida parapsilosis*, compared Caspofungin*

* Representation of the Correlation Composite Index (ICC) where the matrix is derived from the selection of the mass spectra for (5551) *Candida parapsilosis* exposed for 15 hours at 37°C (CIM 0.5 µg/mL) for Caspofungin (including null) of 0,03125 - 16 µg/mL, the correlation of the spectra and auto-correlations have been translated into a heat map where the related spectra are shown in warm colors and spectra unrelated in cool colors. Source: MALDI Biotyper version 3.0.

Table 3. Correlation values and self-correlations for Caspofungin

MPCC (µg/mL)	ICC Nulo	ICC Máximo
0	0,3731	1,000
0,03125	0,3267	0,9905
0,0625	0,3605	0,7873
0,125	0,5530	0,9369
0,25	0,5174	0,8283
0,5	0,4982	0,6622
1	0,4751	0,4777
2	0,7676	0,5248
4	0,0173	0,5899
8	0,6804	0,4565
16	1,000	0,3731

Null ICC and ICC maximum values for Caspofungin (0.5 µg/mL) to (5551) *Candida parapsilosis*.

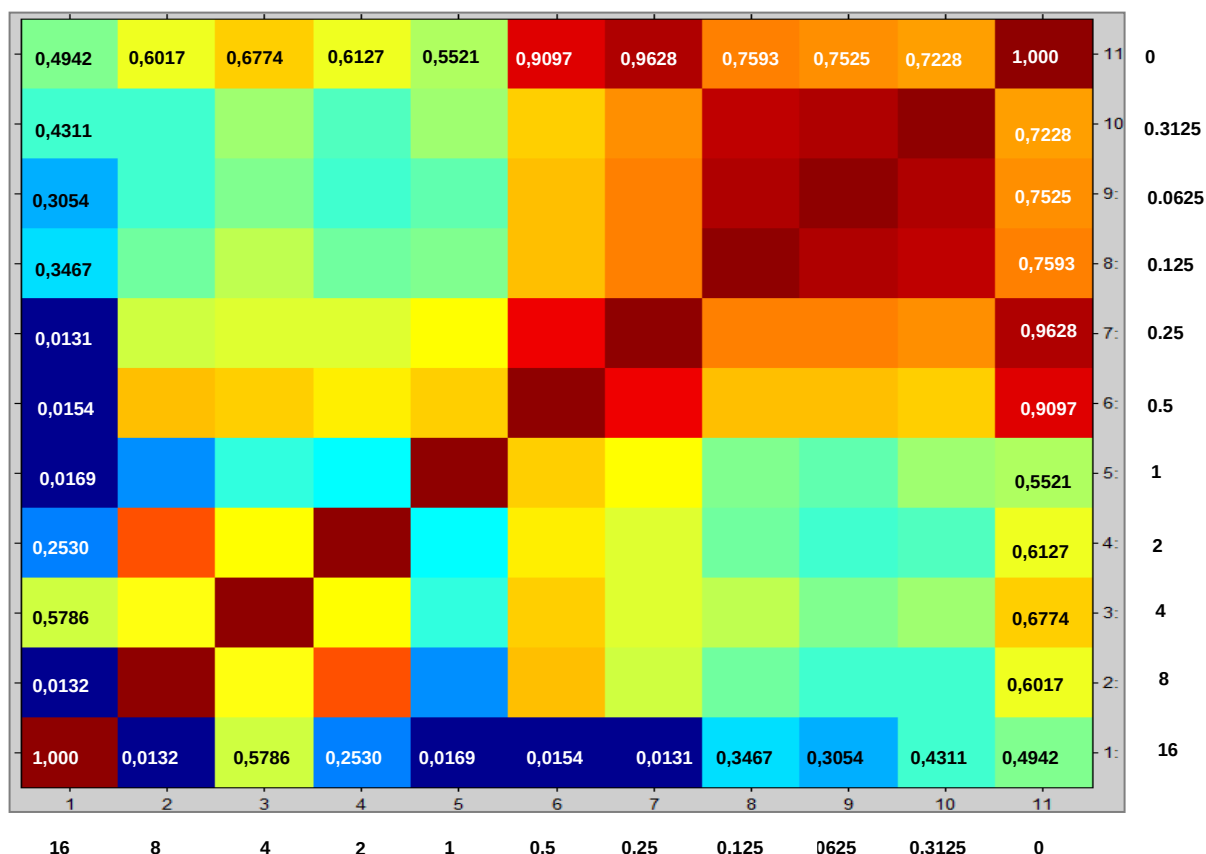


Figure 3. Matrix ICC- Yeast 5551 *Candida parapsilosis* compared to Micafungin*

* Representation of the Correlation Composite Index (ICC) where the matrix is derived from the selection of the mass spectra for (5551) *Candida parapsilosis* exposed for 15 hours at 37°C (CIM 0.5µg/mL) for Micafungin (including null) of 0.03125 - 16µg/mL, the correlation of the spectra and auto-correlations have been translated into a heat map where the related spectra are shown in warm colors and spectra unrelated in cool colors. Source: MALDI Biotyper version 3.0.

Table 4. Correlation values and self-correlations for Micafungin

MPCC (µg/mL)	ICC Nulo	ICC Máximo
0	0,4942	1,000
0,03125	0,4311	0,7228
0,0625	0,3054	0,7525
0,125	0,3467	0,7593
0,25	0,0131	0,9628
0,5	0,0154	0,9097
1	0,0169	0,5521
2	0,2530	0,6127
4	0,5786	0,6774
8	0,0132	0,6017
16	1,000	0,4942

Null ICC and ICC values for maximum Micafungin (0.5µg/mL) to (5551) *Candida parapsilosis*.

References

1. Arendrup MC. Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care* 2010; **16**: 445–452.
2. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T et al. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. *Plos One* 2013; **8**: 1-7.
3. Posteraro B, Torelli R, De Carolis E, Posteraro P, Sanguinetti M. Antifungal Susceptibility Testing: Current Role from the Clinical Laboratory Perspective. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2014; **6**: 1-7.
4. Marinach C, Alanio A, Palous M et al. MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: The example of *Candida albicans* and fluconazole. *Proteomics* 2009; **9**: 4627–4631.
5. Vella A, De Carolis E, Vaccaro L et al. Rapid Antifungal Susceptibility Testing by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Analysis. *J Clin Microbiol* 2013; **51**: 2964–2969.
6. Saracli MA, Fothergill AW, Sutton DA, Wloderhold NP. Detection of triazole resistance among *Candida* species by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Med Mycol* 2015; **53**: 736–742.
7. *Reference Method for Broth Dilution Testing of Yeasts Approved standard document M27-A3*, Wayne, PA: Clinical And Laboratory Standards Institute. 2008; **28**: 1-25.
8. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. M27-S4. Fourth informational supplement.* Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute, 2012.
9. De Carolis E, Vella A, Florio AR, et al. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDITOF MS) for caspofungin susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 2479–2483.
10. Arnold RJ, Reilly JP. Fingerprint matching of *E. coli* strains with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of whole cells using a modified correlation approach. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1998; **12**: 630–636.
11. Martines-Lamas L, Molino MLP, Pardo F, Varela E, Regueiro BJ. Espectrometría de masas matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight vs. metodología convencional en la identificación de *Candida* no-*albicans*. *Enf Infect Microbiol Clin* 2011; **29**: 568–572.
12. Guinea, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidaemia. *Clin Microbiol and Infect* 2014; 1-5.

ANEXO A – NORMAS DA SUBMISSÃO DO MANUSCRITO

OXFORD JOURNALS

CONTACT US MY BASKET MY ACCOUNT

Medical Mycology

ABOUT THIS JOURNAL CONTACT THIS JOURNAL SUBSCRIPTIONS CURRENT ISSUE ARCHIVE SEARCH

Oxford Journals > Medicine & Health > Medical Mycology > For Authors > Manuscript Preparation

MANUSCRIPT PREPARATION

SUBMISSION

All submissions must be uploaded as Word files to the Medical Mycology ScholarOne Manuscripts site at mc.manuscriptcentral.com/tmm. Users who have not previously submitted work through this site must create an account from the link on the login page. Assistance with this and all other areas of the site is available in the User Guide, which is accessed via the 'Get Help Now' button at the top right corner of all ScholarOne Manuscript web pages. If you need additional help, please contact mmym@oup.com.

Permissions

Written permission should be obtained to adapt a part of or reprint an entire table, graph, or illustration that has been previously published. Authors are responsible for obtaining permission from the copyright holder to use copyrighted material prior to submission, and are responsible for paying any associated fees. Click [here](#) for more information on permissions.

HOW TO CONTACT THE EDITORIAL OFFICE

The Editorial Office can be contacted as follows:

Nes Diaz
Email: mm.editorialoffice@oup.com

ARTICLE TYPES

Papers may be submitted in the following categories.

Original Papers

Manuscripts must have: (a) a Cover-Page that includes the full title and a short title, name(s) and affiliation(s) of all author(s), the name, telephone/ fax numbers and email address of the designated corresponding author, and a list of up to five keywords; (b) a separate page for a Summary or Abstract of up to 250 words

prepared without sub-headings; (c) text consisting of Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion and References; (d) **References must be cited sequentially in the order in which they first appear in the text, in superscript numerals, and included in the same numerical order in the Reference section;** (e) each Table should be submitted as a separate page and should have footnoted descriptions of all abbreviations contained in the Table (**see section below on Tables for more detailed information**); (f) each Figure should be submitted as a separate file (page), with appropriate figure legends allowing a reader to understand their contents without reference to the text (**see section below on Figures for more detailed information**). Manuscripts MUST be in English, double-spaced, in no less than size 12 point, **without line numbering and up to approximately 30 manuscript pages (10-12 print pages) including cover-page, abstract, text, references, and tables/figures.**

Reviews

Authors must first electronically submit an outline of their proposed article for evaluation by the journal. The outline should be no more than two, double-spaced pages in 12 point, in which the authors describe the objectives and contents of the report. The outline must be submitted to the Reviews Editor, Riina Richardson: Riina.Richardson@manchester.ac.uk. Once the proposal has been evaluated, the authors will be informed of the results of the Review Editor's initial consideration of their proposal. **Reviews are NOT restricted by the formatting or length requirements of Original Papers.**

Case Reports

Such articles should be submitted to Medical Mycology Case Reports via www.ees.elsevier.com/mmcr from which all information pertaining to this on-line, open access ISHAM journal may be obtained.

Short Communications

These manuscripts are to provide an opportunity for the presentation of preliminary or brief observations that do not warrant an original paper. **The manuscript should be prepared as an original paper, except they may be no more than 12-15 manuscript pages (approximately 5-7 print pages) including cover-page, abstract, text, references, and tables/figures.**

Letters to the Editor

Letters are to allow readers the opportunity to discuss issues related to previously published original articles, short communications, and reviews in Medical Mycology. Letters are **NOT** to be used for the presentation of the authors' preliminary data from their own investigations. **Letters should be no more than 5 double-spaced manuscript pages including references (approximately 2 print pages), in no less than size 12 point.**

MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

Please refer to a recent issue of *Medical Mycology* for guidance on style and layout of articles. Also refer to the Article Types section for guidance on relevant information for each article type.

File Formats

All manuscripts must be submitted as Microsoft Word documents (.doc files).

Manuscript Preparation

Manuscripts **MUST** be in English, double-spaced, in no less than size 12 point, organized as appropriate for the manuscript type and have one inch margins all around. Statistics and measurements should be given in numerals when followed by a unit, e.g., mg, ml, etc. In contrast, **numerals employed in other circumstance, e.g., two patients, should be spelled out if less than ten**

THE JOURNAL

- > About the journal
- > Rights & permissions
- > Dispatch date of the next issue
- > We are mobile - find out more
- > Journals Career Network

Published on behalf of

ISHAM
INTERNATIONAL SOCIETY FOR
HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY

Impact Factor: 2.335
5-Yr impact factor: 2.325

Editor-in-Chief
Karl V. Clemons
> [View full editorial board](#)

FOR AUTHORS

- > Instructions to authors
- > Submit now
- > Services to authors
- > Author self-archiving policy

OXFORD  OPEN

Looking for your next opportunity?

[Chair, Department of Epidemiology](#)
Little Rock, Arkansas

[BC/BE Neuro Oncologist](#)
Florida

[GROUP LEADER POSITION IN CLINICAL BIOSTATISTICS](#)
Paris, Other / Non US

[Assistant/Associate/Full Professor](#)
Gainesville, Florida [View All Jobs](#)

OXFORD  Journals Career Network

CORPORATE SERVICES

- > What we offer
- > Advertising sales
- > Reprints
- > Supplements

(10). **ALL abbreviations, even those commonly used in medical mycology, e.g., Sabouraud glucose agar (SGA), must be defined when first used in the abstract and text. Please NOTE that the inability of authors to clearly present the contents of their submissions in English may constitute grounds for the immediate rejection of the papers or their return to authors so that they can correct their English usage prior to assignment to an associate editor.** For authors who require professional assistance with English usage, there are companies that will provide assistance for a fee. For more information, see our language services page [here](#).

References

Authors are responsible for the accuracy and completeness of their references and for correct text citation. In preparing your citations please follow the AMA Manual of Style, 10th Edition. For detailed information, please [check here](#) under References.

Some key style points that *Medical Mycology* articles must follow:

- Number references in the order they appear in the text; do not alphabetize.
- In text, tables, and legends, identify references with superscript numerals.
- When listing references, follow AMA style and abbreviate names of journals according to the journals listed in PubMed. The abbreviation should be in italic font and a period inserted after the final abbreviation, e.g., J Clin Microbiol. [see period]
- List all authors up to 6, but if more than 6, list the first 3 by name and the rest by "et al." *
- Journal references should include the issue number in parentheses after the volume number and before page numbers that should be inclusive (685-692, NOT 685-2).

Examples of reference style:

Journal article

Author AB, Author CD, Author EF, et al. [if more than six authors] Title of paper. J Title Abbrev. 1995; 00 (1): 000-000.

- If the title is in a language other than English, the authors should provide the English translation. The name of the original language should be included within a bracket, e.g., [in Spanish], after pagination at the end of the citation. For example, Author AB, Author CD, Author EF, et al. [if more than six authors] Title of paper. J Title Abbrev 1995; 00 (1): 000-000 [in Spanish].

Book chapter

Author AB, Author CD, Author EF, et al. [if more than six] Chapter title. In: Editor AB, Editor CD, eds. Book Title With Initial Uppercase Letters (as indicated here and in italic font), 5th edn. Place: Publisher, 1995: 000-000.

Book

Author AB, Author CD (eds). Book Title With Initial Uppercase Letters (as indicated here and in italic font), 5th edn. Place: Publisher, 1995.

Thesis

Author AB. Paper title with lowercase initials to all words, except the first word. PhD thesis, University of X, 1995.

Conference proceedings/Supplements

Author AB. Paper title. In: Editor AB, ed. Proceedings Title, place, date. Place: publisher, 1995: 000-000.

Meeting abstracts

Abstracts of works presented at scientific meetings should be cited in brackets within the text of the manuscripts rather than in the Reference sections. The citations should be formatted as: Author AB. Abstract title. Name of meeting, its location, the date and abstract number.

Personal communications, Unpublished results etc.

References to personal communications, unpublished results and papers submitted for publication (but not yet accepted) should only appear in brackets in the text, and in the following form: [A. B. Author, unpublished results] or [C. D. Author, personal communication].

Tables

Tables should present only essential data, must be numbered sequentially in the order in which they are first referenced in the text, and all **MUST** be referred to in the text. Each table should be supplied as a separate page at the end of the main document and not imbedded within the body of the text. The table header should be **brief and self-explanatory**. If it contains generic and species names, these must be spelled out in full, e.g., *Candida albicans*, not *C. albicans*. Column headings should be brief and include units in parentheses where applicable. Only horizontal rule lines should be used and then only for headers and footers. Tables should be considered as "stand alone" documents through which data are summarized for presentation to readers. As such, all abbreviations employed in the tables **MUST** be defined by footnotes included directly below the tables.

Figures/Images

Images should be submitted as TIF, EPS, PDF, or JPG (preferred) files. Scanned images should be of a sufficient resolution, i.e., 300 dpi for halftones/color, 500 dpi for combination halftones and 1000-1200 dpi for line art. Illustrations should be submitted as individual files, separate from the manuscript text file. For more information about preparing figures, see our Figures page [here](#).

Authors will be charged USD 600 for each figure reproduced in color in the print version of the journal (for more information about charges, see the Medical Mycology Charges page [here](#)). However, any figure submitted as a color original may appear in color in the journal's online edition, without any charges being assessed to the authors. **NO** part of any image may be enhanced, removed, relocated, introduced or manipulated in any manner after the capture of the original image unless the authors provide the editor with a clear and accurate description of the nature of the image manipulation.

Figures, like tables, should be considered as "stand alone" components of the manuscript. As such, authors should provide legends at the end of the text, following the Reference section, which clearly describe the significant features of the illustrated objects. In addition, authors may employ, as warranted, arrows or similar indicators.

Supplementary Files

Supplementary information, including extensive data sets, large figures, audio and DVD/video material, can be made available as part of the online version of your manuscript. Please do not include supplementary information within the main manuscript file, but upload the material as separate file(s), labeled as "Supplemental Digital Content". Please include a sequential number (S1, S2, etc.) for each file and a brief description of the content at the appropriate position in the text. Please note that supplementary files are not copy-edited and will be presented as submitted.

Nomenclature

Proposals of new fungal taxa **MUST** conform to the requirements outlined in the International Code of

ALERTING SERVICES

- > [Email table of contents](#)
- > [CiteTrack](#)
- > [XML RSS feed](#)

It is the sole responsibility of authors to disclose any affiliation with any organization with a financial interest, direct or indirect, in the subject matter or materials discussed in the manuscript (such as consultancies, employment, expert testimony, honoraria, speakers bureaus, retainers, stock options or ownership) that may be perceived as potentially affecting the conduct or reporting of the work submitted. All sources of funding are to be explicitly stated. If uncertain as to what might be considered a potential conflict of interest, authors should err on the side of full disclosure (i.e., when in doubt, provide full disclosure).

In addition, a conflict of interest may be perceived to exist in such situations as when authors are affiliated with or employed by a private enterprise whose product or competitor's product, e.g., drug, device or diagnostic kit, is the focal point of the paper.

Information about potential conflict of interest must be clearly stated at the point of submission. This may be made available to reviewers and may be published with the manuscript at the discretion of the Editors and Publisher. The journal recommends that you and your co-authors include the sub header, 'Conflict of Interest', in the Acknowledgment section at the end of your manuscript. If no such conflict exists, simply respond 'None'. If you or your co-authors have received funding that meets the criteria described in the paragraph above, the source(s) of the funds must be declared (NOTE – you are NOT required to disclose the amounts of funding that you or your co-authors have received). Furthermore, authors must indicate their employment if describing their or other companies' products.

The intent of this policy is not to prevent authors with these relationships from publishing work, but rather to adopt transparency such that readers can make objective judgments on conclusions drawn. Further guidance on conflicts of interest is available [here](#).

JOURNAL COPYEDITING STYLE

Authors are referred to [this document](#) and the *AMA Manual of Style*, 10th Edition.

PERMISSION TO REPRODUCE THIRD-PARTY MATERIAL

All copyright permission must be cleared and, if necessary, paid for by the author; this includes applications and payments to DACS (Data Access Control System), ARS (Artists Rights Society), and similar licensing agencies where appropriate. It is also the author's responsibility to include acknowledgements as stipulated by particular institutions.

For more information, see the Rights and Permissions page [here](#).

COPYRIGHT AND LICENSE

It is a condition of publication in *Medical Mycology* that the authors grant an exclusive license to the journal's sponsoring society, the International Society for Human and Animal Mycology. This ensures that all of the necessary rights needed for publication of the article are in place including provision for any requests from third parties to reproduce the content to be as widely disseminated as possible. No article will be published unless the signed license has been received at Oxford Journals. Once your article is received into production at Oxford Journals, you will receive a "Welcome" email that contains the link to your online license. If it is not possible for you to complete your license online, please email mmmy@oup.com. Any queries about the license form should be sent as soon as possible to Rights and Permissions so that any issues can be resolved quickly.

Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants. Some of the provisions are effective as of January 1, 2012, while others will subsequently become effective. The proposed taxon must be supported by deposition of cultures and/or the unique nucleotide and/or amino acid sequences in appropriate collections or databases, along with the new binomial. The identifier assigned to the taxon by these recognized repositories, e.g., Mycobank, must be included in the text, tables and figures. In addition, binomials should appear in italics, must be spelled out in full when first used in the abstract, text, figures/tables. Thereafter, a generic name may be abbreviated to the first initial only, e.g., *Candida albicans* when first cited and *C. albicans* in the remainder of the abstract and text, except at the beginning of a sentence where the genus should be spelled out in entirety. Species names may NEVER be used without the generic full name or abbreviation combined with the full name of the species. For example, it must be *Candida albicans* or *C. albicans*, but never *albicans*, or *C. neoformans* var. *grubii* but never var. *grubii*. The use of abbreviations of generic and species names, e.g., (Ca) for *C. albicans*, in the text is NOT permitted.

Nucleotide and/or Amino Acid Sequence Data

Nucleotide and/or amino acid sequence data must be deposited in a freely accessible database. The GenBank/EMBL/DBJ accession numbers should be included in the Materials and Methods Section of the manuscript. However, in a figure of a phylogenetic tree, the numbers should be shown along with species names (e.g., *Malassezia globosa* AB099880) (No descriptions are needed in the Materials and Methods Section in this case).

Acknowledgments

The work of other individuals who assisted in the studies or in the preparation of the submission must be specifically indicated in the Acknowledgments section of the paper.

FUNDING

Details of all funding sources for the work in question also should be given in the Acknowledgments section. The following rules should be followed:

- The sentence should begin: "This work was supported by ..."
- The full official funding agency name should be given, i.e. "the National Cancer Institute at the National Institutes of Health" or simply "National Institutes of Health" not "NCI" (one of the 27 sub-institutions) or "NCI at NIH." Please see [here](#) for a full RIN-approved list of UK funding agencies.
- Grant numbers should be complete and accurate and provided in brackets as follows: "[grant number ABX CDXXXXXX]"
- Multiple grant numbers should be separated by a comma as follows: "[grant numbers ABX CDXXXXXX, EFX GHXXXXXX]"
- Agencies should be separated by a semi-colon (plus "and" before the last funding agency)
- Where individuals need to be specified for certain sources of funding the following text should be added after the relevant agency or grant number "to [author initials]."

An example is given here: "This work was supported by the National Institutes of Health [P50 CA098252 and CA118790 to R.B.S.R.] and the Alcohol & Education Research Council [HFY GR667789]."

DECLARATION OF INTEREST

This section should appear after the Acknowledgments and should include any conflicts of interest.

Although there is no standard definition of Conflict of Interest, the United States National Institutes of Health has published the following statement:

form should be sent as soon as possible to Rights and Permissions so that any issues can be resolved quickly and to avoid any delay in publication.

As part of the license agreement, authors may use their own material in other publications, provided that the journal is acknowledged as the original place of publication and Oxford University Press is acknowledged as the publisher.

Work submitted for publication must be original, previously unpublished, and not under consideration for publication elsewhere. If previously published figures, tables, or parts of text are to be included, the copyright-holder's permission must have been obtained prior to submission. For more information on how to obtain permissions, please consult Rights and Permissions.

PROOFS

Authors are sent page proofs by email. To avoid delays in publication, proofs should be checked immediately and corrections, as well as answers to any queries, returned to the publishers as an annotated PDF within **2 working days**. Further details are supplied with the proof. It is the author's responsibility to check proofs thoroughly.

Excessive alterations in the proof stage may delay publication of the article to a subsequent issue. Authors who make extensive amendments to the text at the page-proof stage will be charged an additional fee.

OFFPRINTS

The journal will provide a URL to authors for free electronic access to the published version of the article. Offprints and reprints may be purchased in multiples of 50, either through the Author Services site or using [this order form](#).

ADVANCE ACCESS

Advance Access allows for papers to be published online soon after they have been accepted for publication—reducing the time between submission and publication. Articles posted for Advance Access have been copyedited and typeset but have not yet paginated for inclusion in a specific issue of the journal. Appearance in Advance Access constitutes official publication, with full-text functionality, and the Advance Access version can be cited by a unique DOI (Digital Object Identifier). The final manuscript is then paginated into an issue, at which point it is removed from the Advance Access page. Both versions of the paper continue to be accessible and citable.

Online ISSN 1460-2709 - Print ISSN 1369-3786

Copyright © 2016 International Society for Human and Animal Mycology

OXFORD
UNIVERSITY PRESS

[Site Map](#) [Privacy Policy](#) [Cookie Policy](#) [Legal Notices](#) [Frequently Asked Questions](#)

ANEXO B – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Serres Humanos		UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
--	--	---	--

COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Detecção de resistência antifúngica as equinocandinas de isolados clínicos de Candida parapsilosis stricto sensu, Candida orthopsilosis e Candida metapsilosis através de espectrometria de massa.

Pesquisador: Reginaldo Gonçalves de Lima Neto

Versão: 2

CAAE: 35762214.2.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 078197/2014

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

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