



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

MARIA DA CONCEIÇÃO ALEXANDRE CASTRO

CANDIDEMIA NOSOCOMIAL: DIAGNÓSTICO COM PROTEÔMICA APLICADA
NA IDENTIFICAÇÃO E RESISTÊNCIA DAS LEVEDURAS E USO DA
INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL

Recife

2021

MARIA DA CONCEIÇÃO ALEXANDRE CASTRO

**CANDIDEMIA NOSOCOMIAL: DIAGNÓSTICO COM PROTEÔMICA APLICADA
NA IDENTIFICAÇÃO E RESISTÊNCIA DAS LEVEDURAS E USO DA
INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas
da Universidade Federal de Pernambuco, para
obtenção do título de doutora em Medicina Tropical.
Área de Concentração: Medicina Tropical.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rejane Pereira Neves

Co-orientador: Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto

Recife

2021

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

C355c Castro, Maria da Conceição Alexandre.
Candidemia nosocomial : diagnóstico com proteômica aplicada na identificação e resistência das leveduras e uso da inteligência artificial / Maria da Conceição Alexandre Castro. – 2021.
107 f. : il. ; tab. ; 30 cm.

Orientadora : Rejane Pereira Neves.
Coorientador : Reginaldo Gonçalves de Lima Neto.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2021.
Inclui referências, apêndice e anexos.

1. Candidemia. 2. Unidades de Terapia Intensiva. 3. Resistência Antifúngica. 4. Rio Grande do Norte. 5. Nariz Eletrônico. I. Neves, Rejane Pereira (Orientadora). II. Lima Neto, Reginaldo Gonçalves de (Coorientador). III. Título.

616.988 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2021-233)

MARIA DA CONCEIÇÃO ALEXANDRE CASTRO

**CANDIDEMIA NOSOCOMIAL: DIAGNÓSTICO COM PROTEÔMICA APLICADA
NA IDENTIFICAÇÃO E RESISTÊNCIA DAS LEVEDURAS E USO DA
INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Medicina Tropical da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção
do título de Doutora em Medicina Tropical.
Área de Concentração: Medicina Tropical.

Aprovada em: 05/08/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Rejane Pereira Neves (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Sylvia Lemos Hinrichsen (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^o. Dr. Leandro Maciel Almeida (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof^o. Dr. Cícero Pinheiro Inácio (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^o. Dr. Henrique Douglas Coutinho (Examinador Externo)
Universidade da Região do Cariri – URCA

Dedico esta pesquisa a todos os pacientes.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me proporcionar a sede do saber, o desejo da sabedoria, a força para enfrentar a vida, o foco para realização dos meus sonhos, a fé para nunca desistir... O sopro da vida.

A meus pais, Graça e Francisco, por sempre acreditarem e me incentivarem a voar, sempre com o sorriso e abraço acolhedor em cada regresso meu.

A meus irmãos Gil, Raimundo e Naldo, por me protegerem e me mimarem.

A meu irmão Alexandre, por todas as ligações e incentivo em momentos tão difíceis nesta trajetória... Por todos os abraços, amor, carinho e companheirismo compartilhado enquanto estive comigo nesta vida carnal.

Ao irmão que Deus me presenteou nesta jornada, Danylo, que nunca me deixou desistir, sempre estive comigo segurando minha mão, acalmando meu coração, enxugando minhas lágrimas e colocando os sorrisos mais loucos nos meus olhos.

A meus sobrinhos Israely, Maria Eduarda, Gil Filho, Rayrone, Raynarla e Isabely, por ser meu tudo de felicidade, com o “Te amo titia” mais lindo que já ouvi e senti.

A minhas cunhadas Aline, Mércia e Milane, por todo apoio, palavra amiga e incentivo.

A minha tia Santa, por ser meu maior orgulho e exemplo na enfermagem, na vida e no amor. Hoje no plano espiritual, sei que continua a olhar por mim e sorrir com cada conquista nessa profissão de dedicação e amor ao próximo.

A Professora, e minha inspiração, Sylvia Lemos, por todas as conquistas intelectuais e pessoais que tenho obtido ao lado desta guerreira, amiga, conselheira, exemplo de perseverança.

A meus amigos/primos que sempre estiveram comigo nos momentos mais loucos, felizes e tristes, Norminha, Carine, Junior, Renan, Thiago, Ertênia, Sofia, Karyne e Gabriela.

A minhas avós Bia, por todas as orações e afago. E Eluza, vó que a vida me deu neste processo, sempre acolhedora, com uma palavra de incentivo e abraço que me acalma.

A minha orientadora Rejane, por aceitar seguir comigo nesta jornada, me ensinando cada vez mais a amar a micologia.

A meu co-orientador Reginaldo, por todos os ensinamentos neste mágico mundo da pesquisa.

A meu companheiro de jornada intelectual Cícero, por toda paciência e distribuição gratuita do seu saber.

Ao Professor Leandro e Renan por juntarem-se a mim no desafio de juntar o mundo da informática com o da saúde.

“A vida é hoje”

RESUMO

O controle e diagnóstico das infecções por *Candida* ainda é um desafio clínico mundial. A candidemia apresenta índices de mortalidade hospitalar cada vez mais crescente, com distribuição de espécies de *Candida* não-*albicans* apresentando perfil de suscetibilidade antifúngica diferenciadas, afetando principalmente pacientes em UTI. O objetivo desse estudo foi identificar e caracterizar a epidemiologia das candidemias nosocomiais, determinar a sensibilidade antifúngica dos isolados e propor a metodologia proteômica MALDI-TOF e de inteligência artificial para identificação rápida das espécies de *Candida*. Trata-se de um estudo transversal analítico descritivo, realizado no período de 2018 a 2020, com 50 pacientes internados em UTIs de três hospitais terciários, na cidade de Natal no Estado do Rio Grande do Norte. Além disso, foram obtidas leveduras de *C. krusei* e *C. parapsilosis sensu stricto* pertencentes à Coleção de Culturas Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco. A identificação das espécies de *Candida* nas 50 amostras dos pacientes foi realizada através das técnicas de MALDI-TOF e PCR, onde foram identificadas principalmente as espécies *Candida albicans* (48%), *C. tropicalis* (32%) e *C. pelliculosa* (6%). Os principais fatores de risco para candidemia, entre os pacientes dos três hospitais, foi o uso de sondagem vesical (94%), nutrição parenteral (84%), cateter venoso central (48%), corticoterapia (44%) e imunossupressão (44%). Quando comparados os casos de candidemia nos diferentes hospitais e a apresentação das espécies de *Candida*, não houve diferença significativa na distribuição dos óbitos. O percentual de mortes foi de 16,67% no Hospital B e 25% no Hospital C. Entretanto, não obtivemos dados de óbito para os pacientes do Hospital A. Os isolados foram submetidos a testes de susceptibilidade antifúngica, observando-se o fenômeno de resistência por *C. albicans* a anidulafungina, micafungina, voriconazol e anfotericina B, bem como de *C. tropicalis* a estes dois últimos antifúngicos. *C. pelliculosa* também foi resistente ao voriconazol. Enquanto que *C. parapsilosis* e *C. krusei* apresentaram resistência à anidulafungina. A tecnologia do nariz eletrônico associada à inteligência artificial foi utilizada para identificar amostras de *C. albicans* (10), *C. krusei* (10) e *C. parapsilosis sensu stricto* (10). Como não foram encontrados estudos que realizam a identificação das espécies de *Candida* utilizando essa metodologia, construímos três bases de dados a partir das ATCC de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis sensu stricto*. Métodos de inteligência artificial foram avaliados e os testes estatísticos foram aplicados para validação dos resultados. Nas três bases

de teste utilizadas conseguimos resultados de acurácias consideravelmente altas, todas acima de 90%. A distribuição de espécies e susceptibilidade antifúngica de isolados de *Candida* provenientes de casos de candidemia trazem novas perspectivas ao entendimento desse grave panorama. Assim, fornece informações úteis sobre a epidemiologia, fatores de risco e padrão de susceptibilidade úteis para a seleção de agentes antifúngicos empíricos para pacientes com candidemia.

Palavras-chave: candidemia; unidade de terapia intensiva; resistência antifúngica; Rio Grande do Norte; nariz eletrônico.

ABSTRACT

The control and diagnosis of *Candida* infections is still a worldwide clinical challenge. Candidemia has an increasing in-hospital mortality rate, with the distribution of non-*albicans* *Candida* species presenting a differentiated antifungal susceptibility profile, mainly affecting ICU patients. The aim of this study was to identify and characterize the epidemiology of nosocomial candidemias, determine the antifungal sensitivity of the isolates and propose the MALDI-TOF proteomics and artificial intelligence methodology for rapid identification of *Candida* species. This is an analytical descriptive cross-sectional study, carried out from 2018 to 2020, with 50 patients admitted to ICUs of three tertiary hospitals, in the city of Natal, State of Rio Grande do Norte. In addition, yeasts of *C. krusei* and *C. parapsilosis* sensu stricto belonging to the URM Micoteca Culture Collection of the Federal University of Pernambuco were obtained. The identification of *Candida* species in the 50 patient samples was performed using the MALDI-TOF and PCR techniques, where *Candida albicans* (48%), *C. tropicalis* (32%), and *C. pelliculosa* (6%) were identified. The main risk factors for candidemia among patients at the three hospitals were the use of urinary catheters (94%), parenteral nutrition (84%), central venous catheter (48%), corticosteroid therapy (44%) and immunosuppression (44 %). When comparing the cases of candidemia in different hospitals and the presentation of *Candida* species, there was no significant difference in the distribution of deaths. The percentage of deaths was 16.67% in Hospital B and 25% in Hospital C. However, we did not obtain death data for patients in Hospital A. The isolates were submitted to antifungal susceptibility tests, observing the phenomenon of resistance by *C. albicans* to anidulafungin, micafungin, voriconazole, and amphotericin B, as well as by *C. tropicalis* to these last two antifungals. *C. pelliculosa* was also resistant to voriconazole. While *C. parapsilosis* and *C. krusei* showed resistance to anidulafungin. The electronic nose technology associated with artificial intelligence was used to identify samples of *C. albicans* (10), *C. krusei* (10), and *C. parapsilosis* sensu stricto (10). As no studies were found to identify *Candida* species using this methodology, we built three databases from the ATCC of *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. parapsilosis* sensu stricto. Artificial intelligence methods were evaluated and statistical tests were applied to validate the results. In the three test bases used, we achieved considerably high accuracy results, all above 90%. The species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* isolate from candidemia cases bring new perspectives to the understanding of this serious scenario. Thus, it provides useful information on the epidemiology, risk factors, and

susceptibility pattern useful for the selection of empirical antifungal agents for patients with candidemia.

Keywords: candidemia; intensive care unit; antifungal resistance; Large Northern River; electronic nose.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo 1

Gráfico1 - O gráfico de sobrevivência espelha os dados permitindo verificar quais das curvas apresenta melhor resultado, quanto mais acima está a curva, menos mortes. Dessa forma, pode-se observar que as curvas das duas espécies são bem próximas, justificando o resultado de que não há diferença significativa na média de sobrevivência entre elas.....50

Artigo 2

Figure 1 - Illustration of the fungal infection diagnosis. The process starts collecting a sample from the patient (panel A). The sample is seeded in Petri dishes with a Sabouraud agar medium kept at a 37° C temperature for 24 hours (panel B). The standard approach uses biochemical methods to evaluate the prepared sample in a process that can take up to 40 days of analysis to diagnose. Another recent hi-tech approach is based on mass spectrometry by MALDI-TOF techniques that achieve Candida identification within 24 hours, but it is still very expensive (panel C). The proposed approach analyzes the volatile organic compounds of the prepared samples acquired and interpreted using Electronic Nose and Artificial Intelligence methods, making a diagnosis in less than 1 second (panel D).....64

Figure 2 - A) Items of the electronic nose. The electronic nose has a manual suction and injection device (item 1) of a certain air volume from a sample presented in a Petri dish (item 3). Items 2.1 and 2.2 are control valves for the collection and injection of air volume through item 1. The sample collection starts with the opening of valve 2.1 and aspiration of the air volume of item 3. Afterward, valve 2.1 is closed, followed by the opening of valve 2.2 to inject the air sample in the VOC analysis chamber (item 4). Once the air volume is injected into the VOC analysis chamber, the sensors (installed in the chamber, item 4) generated data through the interaction on its surface with molecules converting them to digital signals sending to a computer system, item 5. Finally, item 6 is activated, representing a chamber cleaning

device by removing the stored air and injecting filtered air without VOCs. B) Photography of the real electronic nose in the transportation case.....67

Figure 3 - Data acquisition flowchart from a sample presented to the electronic nose First step (1) is to turn on the device and (2) wait until the sensor’s signals reach a baseline that usually occurs within 20 minutes. With the sample presented in a Petri dish (3), approximately 40 milliliter of air is aspirated and injected into the sensors’ chamber (4). The air mass aspirated remains for 60 seconds (5) in the sensors’ chamber to promote the VOCs’ interaction with the sensor’s surface. After wait (5), the chamber is purged for more than 60 seconds (6) or until the signals reach the baseline (7). If the signals reach the baseline, a new air mass could aspire from the sample dish again. The data gathering occurs continually from steps two until seven. All the time windows and the air volumes are defined based on many tests performed to calibrate the electronic nose for the fungi identification problem domain.....68

Figure 4 - Statistics of the collected data. A) Time variance of the sensors. B) Variance of the data from standard and non-standard samples of three species. C) Variation of the readings in relation to the response variable in the combined dataset (standard and non-standard). D) Correlation between signals of the combined dataset (standard + non-standard).....70

Figure 5 - Data visualization of the Standard and Non-Standard datasets. A) Visualisation of the Standard dataset through dimension reduction using the UMAP technique. B) Visualisation of the Non-Standard dataset through dimension reduction using UMAP. C) Visualisation of the combination of Standard and Non-Standard datasets through dimension reduction using

UMAP. D) Visualisation of the combination of Standard and Non-Standard datasets through dimension reduction using the t-SNE technique. The difference between the data distribution from Standard and Non-Standard datasets is evident in this visualization. Even nonlinear dimension reduction approaches have difficulty separating the data clusters. The performance of UMAP is better than t-SNE when considering the complexity of the combined datasets.....72

Figure 6 - Experiment results. A) Performance of the classifiers considering different partitions of the datasets: A.1) Training and Testing on Standard dataset; A.2) Training and Testing on Non-Standard dataset; A.3) Training and Testing in the combined version of Standard and Non-Standard datasets; A.4) Training using the Standard dataset and Testing using Non-Standard dataset. B) Performance of the classifiers grouped by classification error considering the different datasets. Multilayer Perceptron, ensemble methods, and Decision Trees presented the best performances. C) Performance of AutoML approach on the different datasets.....73

Figure 7 - PipelineProfiler applied to analyze the classification pipelines generated by AutoML on the Non-Standard dataset. The pipeline has three parts. 1) The primitive contribution, showing the correlation of primitive usage with the pipeline scores. 2) The Pipeline Matrix, presenting a summary of the pipelines, the primitives used, and the hyperparameters. 3) The Pipeline Comparison view, highlighting the differences among selected pipelines.....76

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1 - Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes atendidos.....	45
Tabela 2 – Número de isolados de <i>Candida</i> spp. identificados por fatores de risco do estudo em cada hospital.....	46
Tabela 3 - Taxa de mortalidade, por hospital, ocasionado pelas espécies de <i>Candida</i>	48
Tabela 4 - concentração inibitória mínima (MIC) dos antifúngicos.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD Agar Sabouraud Dextrose

ATCC *American Type Culture Collection*

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

CAPES Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CETENE Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste

CIM Concentração inibitória mínima

CIN Centro de Informática

CLSI *Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais*

CNPQ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CNS Conselho Nacional de Saúde

COVS Compostos orgânicos voláteis

CRN Candida do Rio Grande do Norte

DMSO Dimetil sulfóxido

EDTA Ácido etilenodiamínico tetra-acético

E-NARIZ Nariz Eletrônico

FACEPE Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco

GENBANK National Center Biotechnology Information

HA Hospital A

HB Hospital B

HC Hospital C

HIV Vírus da Imunodeficiência Humana

IA Inteligência Artificial

ICC Índice de Correlação do Composto

IRAS Infecções Relacionadas a Assistência a Saúde

IMT Instituto de Medicina Tropical

ITS *Internal Transcribed Spacer*

LABCEN/CCB Laboratório Central do Centro de Ciências Biociências

LACEN Central de Saúde Pública do Rio Grande do Norte Dr. Almino Fernandes

LAVIMI Laboratório de virologia e micologia

LR Logistic Regression

MALDI-TOF MS *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry*

MEGA7 Análise genética evolutiva molecular versão 7.0

MLP Multi-Layer Perceptron

MOPS Ácido morfolino propano sulfônico

MS Ministério da Saúde

PCR Reação em cadeia polimerase

PIFE Politetrafluoretileno

RN Rio Grande do Norte

RPMI *Roswell Park Memorial Institute*

SDD Sensível dose dependente

SNO2 Dióxido de estanho

TPP Tissue culture plates

UFRN Universidade Federal do Rio Grande do Norte

UFPE Universidade Federal de Pernambuco

UTI Unidade de Terapia Intensiva

URM Coleção de Culturas da Micoteca

USB – Universal Serial Bus

YEPD Dextrose Peptona Extrato de Levedura

5-FC 5 fluorocitosina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	CONSEIDERAÇÕES GERAIS.....	23
2.2	PERFIS EOIDEMIOLÓGICOS DA CANDIDEMIA.....	24
2.3	FATORES DE RISCO PARA CANDIDEMIA.....	26
2.4	DIAGNÓSTICO COM PROTEÔMICA E INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL.....	27
2.5	TRATAMENTO E SUCETIBILIDADE ANTIFUNGICA.....	29
3	OBJETIVOS.....	32
3.1	GERAL.....	32
3.2	ESPECÍFICOS.....	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1	COMITÊ DE ÉTICA.....	33
4.2	TIPO E LOCAL DO ESTUDO.....	33
4.3	POPULAÇÃO/AMOSTRA DO ESTUDO.....	33
4.4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	34
4.4.1	Coleta das Amostras e Diagnóstico Micológico.....	34
4.4.2	Identificação por MALTI-TOF MS.....	34
4.4.3	Identificação Molecular.....	35
4.4.4	Identificação por Inteligência Artificial e Nariz Eletrônico.....	36
4.4.5	Teste de Sensibilidade Antifungica.....	36
4.5	ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA.....	37
4.5.1	Coleta de dados.....	38
4.6	CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS.....	38
4.6.1	Variáveis Dependentes.....	38
4.6.2	Variáveis Indeependentes.....	38
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
5	RESULTADOS.....	40
Artigo 1	Distribuição, fatores de risco e suscetibilidade antifúngica de espécies <i>Candida</i> isoladas da corrente sanguínea de pacientes críticos.....	40
Artigo 2	Breakthrough of clinical <i>Candida</i> cultures identification using the analysis of volatile organic compounds and artificial intelligence methods.....	64

6	CONCLUSÃO.....	83
	REFERÊNCIAS.....	85
	APÊNDICE – FICHA DA COLETA DE DADOS.....	97
	ANEXO A – COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO A	100
	REVISTA RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT.....	
	ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO A	101
	REVISTA SENSORS AND ACTUATORS B: CHEMICAL.....	
	ANEXO C – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	103

1 INTRODUÇÃO

As razões para a alta incidência das infecções por *Candida* ainda não são claras (PEIXOTO et al., 2014; SANTOS et al., 2018). Nesse tocante, os índices de morbidade e mortalidade têm atingido até 70% dos pacientes com esta infecção (LI et al., 2017; PAPPAS et al., 2018). Estudos tem procurado relacionar a distribuição dessas leveduras, que variam de acordo com a região geográfica e perfil populacional (YAPAR, 2014; MATTA; SOUZA; COLOMBO, 2017) a fatores de risco diferenciados entre as espécies como às características dos pacientes, ao aumento de pacientes imunocomprometidos e uso cada vez mais frequente de dispositivos invasivos (GUINEA, 2014; YAPAR, 2014; MATTA et al., 2017). Denotando a necessidade de estudos mais detalhados que realizem o isolamento e identificação destes fungos, além da determinação dos fatores de risco inerentes aos pacientes e resistência fúngica, uma ameaça crescente que conduz às falhas terapêuticas.

Atualmente são conhecidas mais de 200 espécies de *Candida*, e estas apresentam perfil de suscetibilidade antifúngica diferenciadas, sendo associadas a vários tipos de patogenicidade e altas taxas de morbimortalidade (SARDI et al., 2013; ALTHAUS et al., 2015). No entanto, os métodos clássicos de identificação das espécies de *Candida* utilizado na rotina laboratorial (fenotípicos, testes bioquímicos, fisiológicos), é um desafio na questão diagnóstica, com resultados muitas vezes subjetivos, devido à baixa sensibilidade dessas técnicas (FAHAMI et al., 2010; COLOMBO et al., 2012; MERSEGUEL et al., 2015; LI et al., 2017). Porém, a identificação exata da espécie recai, não somente sobre questões epidemiológicas a serem esclarecidas sobre a prevalência dos agentes envolvidos, como também, pelo monitoramento e detecção da resistência antifúngica, contribuindo para a escolha terapêutica mais adequada (SABINO; SAMPAIO; VERÍSSIMO, 2014; KUCUKATES et al., 2016; CHAKRABARTI et al., 2020).

Associado as técnicas convencionais, a identificação das cepas de *Candida* vem sendo complementado 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; LIMA-NETO et al.,

2014; PAUL et al., 2017). Esta técnica é eficaz na identificação de fungos isolados e em amostras clínicas de pacientes, podendo discriminar espécies crípticas, como as do complexo *C. parapsilosis*, *C. haemulonii* e *C. rugosa*, além de detectar resistência antifúngica, em menor tempo do que os testes clássicos (MIMICA; MARTINO; PASTERNAK, 2013; SILVA et al., 2015). Apesar de oferecer uma alta taxa de correlação na identificação em nível de espécie, outras abordagens tem surgido, como o uso de sensores associados a IA, a fim de oferecer novos horizontes ao cenário devastador ocasionado pelas espécies de *Candida*.

A Inteligência Artificial (IA), com uso de dispositivos de nariz eletrônico (e-nariz) tem possibilitado o uso desta ferramenta como alternativa aos métodos convencionais de diagnósticos de doenças clínicas (WILSON, 2015). Diversos tipos de fungos produzem uma gama específica de voláteis (MAGAN; EVANS, 2000), onde a impressão digital do gás emitido por estes patógenos pode ser utilizada para detectar, precocemente, a infecção fúngica e seus gêneros por meio do nariz eletrônico, podendo esta técnica também ser utilizada na identificação de *Candida* (SUHORAB et al., 2019).

No Brasil como também em diversos países da América Latina as taxas de incidência das espécies de *Candida* têm divergido das descritas no Hemisfério Norte, estando a *C. parapsilosis* (25%), *C. tropicalis* (21%) e *C. glabrata* (13%) apresentando um aumento relativo quando comparada a *C. albicans* (41%) (GUINEA, 2014; YAPAR, 2014; SINGARAVELU; GÁCSER; NOSANCHUK, 2014; ZICCARDI et al., 2015; GONÇALVES et al., 2016). Os estudos epidemiológicos mostram que a elevada prevalência das espécies de *Candida* não-*albicans*, identificada nos últimos anos, tem sido afetada pelas diferenças regionais (YAPAR, 2014; SANTOS et al., 2018).

No Nordeste do Brasil, um estudo realizado por Hinrichsen et al. (2008) no estado do Pernambuco, mostrou que as taxas de candidemias por *Candida* não-*albicans* ultrapassaram os 50% dos agentes isolados, predominando *C. parapsilosis* (33%) e *C. tropicalis* (24%). Enquanto Menezes e colaboradores (2012) identificaram no estado do Ceará as espécies *C. albicans* (44%), *C. tropicalis* (36%) e *C. parapsilosis* (7%) como as mais prevalentes, mostrando haver diferenças epidemiológicas da candidemia no Nordeste brasileiro.

Entretanto, nenhum desses estudos destina-se ao estudo epidemiológico específico do paciente crítico.

Não havendo até o momento pesquisas sobre esta casuística no estado do Rio Grande do Norte (CASTRO, 2017), sobretudo envolvendo o estudo da frequência, fatores determinantes e sensibilidade aos antifúngicos das diferentes leveduras do gênero *Candida* acometendo pacientes sob cuidados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI), que é o local onde ocorre o predomínio da candidemia no complexo hospitalar.

Desse modo, este trabalho permitira estabelecer a prevalência e os fatores de risco associada e a susceptibilidade dos agentes etiológicos a diferentes antifúngicos, identificando a distribuição das espécies de *Candida* desencadeadoras de infecção na corrente sanguínea de pacientes de UTIs de três hospitais de referência no estado do Rio Grande do Norte.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A incidência de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) por fungos tem aumentado nas últimas décadas com repercussões clínicas importantes, uma vez que estão associadas a índices crescentes de morbidade e com mortalidade que atinge até 70% dos pacientes criticamente doentes com candidemia (YAPAR, 2014; LI et al., 2017; PAPPAS et al., 2018). Esta é caracterizada pela presença da levedura do gênero *Candida* na corrente sanguínea, representando o terceiro microrganismo mais isolado em hemoculturas, estando em sétimo lugar nos estudos de base populacional (PFALLER et al., 2014; WU et al., 2017; DOI et al., 2016). De todas essas infecções, no ambiente hospitalar as espécies de *Candida* respondem por até 80% dos casos ocorridos (ELAINE; ANALY, 2015; GUIMARÃES et al., 2012; TAMURA et al., 2007). Aproximadamente, 65% destas infecções advêm de microrganismos da microbiota da pele, com a formação de biofilmes no sítio de inserção de cateteres ou sondas (DORIA et al., 2015).

A candidemia é desencadeada pela migração do agente de seu habitat normal para a corrente sanguínea ou outros tecidos, devido à quebra ou desequilíbrio das barreiras de proteção do hospedeiro. Na maioria dos casos o prognóstico não é favorável, sendo de grande importância a confirmação diagnóstica para a implantação do tratamento antifúngico adequado (PEIXOTO et al., 2014; PAPPAS et al., 2018).

As manifestações clínicas causadas pelas espécies *Candida* são variadas, podendo gerar uma infecção localizada de mucosas até uma doença disseminada, sendo esta forma, ocorrendo principalmente em pacientes terminais com doenças debilitantes, neoplásicas, doenças imunossupressoras, neonatos de baixo peso e após transplantes de células hematopoiéticas e órgãos sólidos, podendo acometer diferentes órgãos e tecidos, como pulmões, meninges, rins, bexiga, articulações, fígado, coração e olhos (PEIXOTO et al., 2014; WU et al., 2017).

Os períodos de hospitalização dos pacientes gravemente enfermos com candidemia são prolongados, por envolver quadros de septicemia, terapia antibiótica e imunossupressora. Além de sintomas clínicos semelhantes com os das infecções bacterianas da corrente sanguínea, diversos procedimentos médicos invasivos e, muitas vezes, tratamento específico tardio, gerando maior sofrimento aos pacientes e familiares, como também custos elevados (DOI et al., 2016; LI et al., 2017).

Os trabalhos realizados em diferentes países demonstram que a incidência da candidemia varia de acordo com a região geográfica e perfil populacional, apresentando maior risco em desenvolver infecção por *Candida* os pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), em uso de dispositivos médicos-invasivos, imunocomprometidos, hemodiálise prévia, crianças abaixo de 1 ano de idade e idosos acima de 70 anos (YAPAR, 2014; LI et al., 2017; MATTA; SOUZA; COLOMBO, 2017; CHAKRABARTI et al., 2020), com envolvimento de diferentes espécies de *Candida*.

Existem mais de 200 espécies de *Candida*, no entanto menos de 20 espécies tem sido identificadas como causadoras de infecções da corrente sanguínea. Estudos epidemiológicos tem sugerido que os agentes mais comuns englobam *C. albicans*, principal patógeno oportunista isolado em humanos, seguida de *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. guilliermondii* e *C. pelliculosa*, como as mais frequentes (SARDI et al., 2013; YAPAR, 2014).

2.2 PERFIS EPIDEMIOLÓGICOS DE CANDIDEMIA

Candidemia é a manifestação mais comum de infecções disseminada por fungos, tornando-se uma ameaça substancial à saúde pública devido às elevadas taxas de mortalidade e custos econômicos (WU et al., 2017; XIAO et al., 2019; PEIXOTO et al., 2014). Contudo, a patogênese das espécies de *Candida* é mal compreendida e as taxas de infecções estão cada vez mais crescentes, havendo a necessidade de estudos mais detalhados destes fungos que realizem seu isolamento e identificação, além da determinação dos fatores de risco envolvidos a estes pacientes (SANTOS et al., 2018; SILVA et al., 2014).

As taxas de mortalidade entre pacientes criticamente enfermos portadores de candidemia variam de 25 a 45%. Com uma mortalidade em torno de 15-35% em adultos e 10-15% em recém-nascidos. A redução dessas taxas parece ser dependente da administração adequada do medicamento, incluindo a dose correta em estágios iniciais da infecção e por período de tempo determinado (ELAINE; ANALY, 2015; GUINEA, 2014; PFALLER; DIEKEMA, 2007).

Em geral, mais de 90% das infecções por *Candida* são causadas comumente por *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, com percentagem associada a outras espécies de *Candida* tais como, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* e *C. rugosa* (DE BEDOUT; GÓMEZ, 2010; LOCKHART, 2014; SARDI et al., 2013; YAPAR, 2014). Atualmente, espécies emergentes como o complexo *Candida haemulonii* (*Candida haemulonii*, *Candida haemulonii* var. *Vulnera* e *Candida duobushaemulonii*) e *C. auris* tem surgido como patógenos fúngicos oportunistas associados a infecções da corrente sanguínea e surtos em Unidade de Terapia Intensiva neonatal, além de notáveis resistência fúngica, representando uma ameaça global (RAMOS et al., 2015; PAPPAS et al., 2018).

Candida albicans é o principal patógeno da candidemia em todo o mundo, no entanto, mudanças que favorecem espécies de *Candida* não- *albicans* estão ocorrendo nos últimos anos (LIU et al., 2019; TADEC et al., 2016). Estas mudanças estão relacionadas às características dos pacientes como o aumento de imunocomprometimento, de terapia antifúngica empírica e do uso cada vez mais frequente de cateteres venosos e sondas (WU et al., 2017; GUINEA, 2014; YAPAR, 2014).

Na América do Norte e em diversos países europeus, se tem observado uma diminuição na incidência das infecções ocasionadas por *C. albicans* e um aumento das causadas por *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (CLEVELAND et al., 2012; LOCKHART et al., 2012; LI et al., 2017). O mesmo se observa no Brasil, como também em outros países da América Latina, onde o complexo *C. parapsilosis* representa 20-30% das candidemias (PINHATI et al., 2016; GONÇALVES et al., 2010).

Um estudo observacional realizado por Medrano et al. (2006) em um hospital da cidade de Fortaleza, Ceará, nordeste brasileiro, mostrou que 72% das infecções fúngicas foram causadas por espécies de *Candida* não-*albicans*, com predominância de *C. parapsilosis* (36%), seguido de *C. albicans* (28%) e *C. tropicalis* (16%). O mesmo foi observado por Hinrichsen et al. (2008) na cidade do Recife, Pernambuco, região também do nordeste do Brasil, onde as taxas de candidemias por *Candida* não-*albicans* ultrapassaram os 50%, sendo *C. parapsilosis* (33%) o agente mais isolado.

2.3 FATORES DE RISCO PARA CANDIDEMIA

A malignidade é uma importante comorbidade de pacientes com candidemia. Esta infecção se apresenta como um dos principais desafios enfrentado por hospitais de diversos países, devido ao aumento das taxas de morbidade e mortalidade e ao tempo de internação, podendo este período se estender por 10 a 30 dias, o que resulta em custos elevados (WU et al., 2017; COLOMBO et al., 2013; HU et al., 2014).

A levedura *Candida* pode ser transmitida por via exógena, como por exemplo, as mãos dos profissionais de saúde que manipulam equipamentos e dispositivos utilizados na assistência aos pacientes, e por via endógena sob condições de debilidade do hospedeiro, já que várias destas espécies são colonizadoras da microbiota normal da pele, do trato gastrointestinal e geniturinário humano (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; PARAMYTHIOTOU et al., 2014; PEIXOTO et al., 2014; PAPPAS et al., 2018).

As principais condições que favorecem a candidemia estão relacionadas a fatores iatrogênicos como a presença de um cateter venoso central, ao uso de antibióticos de largo espectro, sondagem vesical, ventilação mecânica, nutrição parenteral, cirurgias de grande porte, especialmente envolvendo o abdômem e permanência prolongada em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (KUCUKATES et al., 2016; HIRAI et al., 2014; HU et al., 2014; PAMMI et al., 2014). Estas condições viabilizam a disseminação da infecção, favorecendo aos fatores de virulência como a secreção de enzimas hidrolíticas, adesão às proteases e

formação de biofilme, promovendo resistência fungica aos agentes da candidemia (TADEC et al., 2016; SINGH; PARIJA, 2012).

Pacientes com neoplasias hematológicas, neutropenia, usuários prévios de agentes citotóxicos e corticosteroides e aqueles em tratamento antibacterianos prolongados e de largo espectro em UTI são mais susceptíveis a desenvolverem infecções relacionadas à *Candida* (FORTÚN; GOIA, 2017; PEIXOTO et al., 2014). Nestas unidades a incidência universal da candidemia varia entre 6,7 a 54 casos por 1000 pacientes (HU et al., 2014). Em hospitais brasileiros esta taxa é cerca de 2,4 por 1000 admissões (COLOMBO et al., 2013), muitas vezes com dificuldades de atribuir a mortalidade a candidemia devido a falhas e/ou diagnóstico tardio ou a causa da patologia de base dos enfermos (PARAMYTHIOTOU et al., 2014; XIAO et al., 2019).

2.4 DIAGNÓSTICO COM PROTEÔMICA E INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL (AI)

As espécies de *Candida* de importância clínica são identificadas por métodos clássicos fenotípicos, testes bioquímicos e fisiológicos (MERSEGUEL et al., 2015), como também, diversas técnicas moleculares como a de reação em cadeia da polimerase (PCR), bastante utilizada na micologia, permitindo a amplificação *in vitro* de segmentos de DNA (BAGAGLI; MARQUES, 2010). Associado a essas técnicas convencionais, a identificação das cepas de *Candida* está sendo complementado 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; LIMA-NETO et al., 2014). Esta técnica físico-química é eficaz na identificação de fungos isolados e em amostras clínicas (MIMICA; MARTINO; PASTERNAK, 2013).

A espectrometria de massas por tempo de voo com ionização por dessorção de matriz assistida por laser (MALDI-TOF MS) emergiu como uma valiosa ferramenta para identificação e diagnóstico microbiano, possibilitando a distinção entre espécies crípticas como *C. dubliniensis*, *C. famata* e *C. auris*, além de complexos de espécies como o complexo

Candida parapsilosis (*parapsilosis stricto sensu*, *orthopsilosis* e *metapsilosis*), complexo *Candida haemulonii* (PAUL et al., 2017; SILVA et al., 2015) e complexo *Candida rugosa* (COLOMBO et al., 2013). Durante o processamento das amostras para identificação no MALDI-TOF MS, os microrganismos são identificados usando células intactas ou extratos celulares. O processo é rápido, sensível e econômico em termos de mão de obra e custos envolvidos, podendo ser usada para a identificação rotineira de bactérias, vírus e fungos clinicamente importantes (SINGHAL et al., 2015; PAUL et al., 2017).

A obtenção espectral pelo MALDI-TOF MS pode evidenciar uma única mudança mínima no perfil proteico de um isolado clínico, a qual pode ser associada aos *breakpoints* de sensibilidade ou resistência antifúngica do referido isolado através de testes *in vitro* (CLSI, 2008). Assim, essa técnica de identificação rápida e precisa das espécies de *Candida* causadoras de infecções fungica, poderá auxiliar na escolha da administração terapêutica em tempo oportuno e exclui a necessidade de realização de testes que verificam o perfil de susceptibilidade/resistência que são demorados (DECONINCK et al., 2016; SINGHAL et al., 2015; VELLA et al., 2013).

Os avanços recentes da inteligência artificial (IA) com uso de dispositivos de nariz eletrônico (e-nariz) tem possibilitado o uso desta ferramenta como alternativa aos métodos convencionais de diagnósticos de doenças clínicas. As tecnologias de nariz eletrônico têm a capacidade de detectar doenças de forma não invasiva e indolor em seus estágios iniciais, permitindo tratamentos precoces e geralmente uma recuperação mais rápida do paciente (WILSON, 2015).

Nariz Eletrônico é um dispositivo projetado para detectar e discriminar odores simples ou complexos usando um conjunto de sensores químicos. São baseados no processo biológico de interpretação do odor, trabalhando de maneira similar, com sensores que substituem os receptores do nariz humano (GUTIÉRREZ; HORRILLO, 2014), transmitindo um sinal a um programa de computador que o processará e simulará a interpretação cerebral. Esse dispositivo é capaz de produzir uma assinatura química ou "impressão digital" para um odor específico simples ou

complexo (MAGAN; EVANS, 2000), utilizando algoritmos de identificação, tais como Multi-Layer Perceptron (MLP) e Logistic Regression (LR) (FACELI et al., 2011; GONZALEZ, 2018).

Diversos tipos de fungos produzem uma gama específica de compostos voláteis (MAGAN; EVANS, 2000). A impressão digital do gás emitido por estes microrganismos pode ser utilizada para detectar precocemente a infecção por *Candida* e seus gêneros por meio do nariz eletrônico (SUCHORAB et al., 2019). Dependendo do meio de cultura utilizado, assim como a idade da mesma, a quantidade de compostos gerados pode ser influenciada, podendo então esse ser um biomarcador de doenças (WILSON, 2015). Portanto, a possibilidade de identificar infecções por fungos, com base em análises de compostos químicos voláteis é relevante na área da saúde.

2.5 TRATAMENTO E SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA

O tratamento das infecções desencadeadas por espécies de *Candida* está voltado para inibição da proliferação da levedura e dirimir os fatores de riscos favoráveis ao seu crescimento (LÓPEZ-MARTÉNEZ, 2010). Este tratamento é baseado no uso de agentes antifúngicos, classificados em polienos (anfotericina B), triazóis (fluconazol, itraconazol e voriconazol), equinocandinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina), e análogos de nucleósideo (fluocitosina) (MAUBON et al., 2014; ALBURQUENQUE et al., 2013).

A resistencia antifungica pode ser desencadeada de três formas, uma forma primária ou intrínseca que existe antes da exposição ao antifungico. A forma adquirida é o segundo tipo, que ocorre após a exposição ao antifungico, podendo ser reversível, atribuível à adaptação transitória ou a não reversível resultante de várias alterações genéticas (COWEN et al., 2015).

O fluconazol e a anfotericina B são os medicamentos mais utilizados para o tratamento de infecções por *Candida* (PARAMYTHIOTOU et al., 2014), principalmente em recém-nascidos de alto risco, pacientes neutropênicos, indivíduos com infecção pelo HIV, transplantados e pacientes em UTI (DÉRY; HASBUN, 2011). O uso excessivo e/ou inadequado destes fármacos no tratamento ou profilaxia é visto como causa do aumento a

resistência das espécies de *Candida*, não conferindo benefício algum ao paciente (SARDI et al., 2013; XIAO et al., 2019).

Nos últimos anos as equinocandinas têm emergido como uma nova opção terapêutica, apresentando ampla ação contra a maioria das espécies de *Candida*, com taxas de mortalidade reduzida e menor toxicidade, quando comparado com as outras classes antifúngicas (COLOMBO et al., 2013; GROSSMAN; CHILLER; LOCCHART, 2014; NETT; ANDES, 2016). Já os análogos de nucleosídeos, também conhecido como 5-fluocitosina (5-FC), possuem seu espectro de ação limitado às leveduras devido a maior toxicidade (CUENCAS-ESTRELLA, 2010; MAUBON et al., 2014).

A espécie *C. albicans* é sensível a quase todas as drogas antifúngicas de uso sistêmico, havendo resistência adquirida a azólicos em alguns casos, quando o tratamento é prolongado, havendo relatos de resistência a anfotericina B. *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei*, apresentam menor sensibilidade ao fluconazol e anfotericina B, onde *C. tropicalis* tem apresentado resistência a 5-fluorocitosina, enquanto *C. glabrata* e *C. krusei* mostram maior resistência ao fluconazol e voriconazol (BARBEDO; SAGARBI, 2010). Já o complexo *C. parapsilosis*, possuem sensibilidade antifúngica diferenciada entre as três espécies, sendo as concentrações inibitórias mínimas de caspofungina e anidulafungina frente a *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* menores que aquelas para *C. parapsilosis stricto sensu* (SPREGHINI et al., 2012), e as taxas de resistência ao fluconazol são diferenciadas e cada vez mais aumentadas entre estas leveduras (LOCKHART et al., 2012; PINHATI et al., 2016).

O rápido início do tratamento adequado promove aos pacientes menor tempo de permanência hospitalar e gastos terapêuticos, e ainda minimiza os riscos de morbidade e mortalidade (WU et al., 2017; ANDERSEN et al., 2016; ZARRIN; MAHMOUDABADI, 2009). Na UTI, cerca de 7,5 dos pacientes fazem uso da terapia antifunfica sistêmica, embora dois terços desses pacientes não tenham candidemia documentada (AZOULAY et al., 2012). Ademais, a escolha do antifúngico para um tratamento ideal deve considerar os riscos de comorbidade, a espécie do fungo vigente, a interação farmacológica com o fungo e a história clínica do paciente (ALCAZAR-FUOLI; MELLADO, 2014).

O aumento constante na resistência aos antifúngicos resulta na necessidade de identificação precisa e rápida da espécie de *Candida* para controlar a ocorrência da candidemia por meio do diagnóstico precoce e prevenção (SANTOS et al., 2018). Dessa forma, a detecção da resistência contribui para a escolha terapêutica mais adequada, favorecendo o restabelecimento clínico do paciente e uma menor mortalidade (KUCUKATES et al., 2016; SABINO; SAMPAIO; VERÍSSIMO, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Identificar e caracterizar a epidemiologia das candidemias nosocomiais, determinar a sensibilidade antifúngica dos isolados e propor a metodologia proteômica MALDI-TOF e de inteligência artificial para detecção rápida das espécies de *Candida*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar espécies de *Candida* a partir de hemoculturas de pacientes internados em UTI de três Unidades de Saúde Públicas do estado do Rio Grande do Norte com métodos clássicos;
- Realizar identificação proteômica pela técnica de MALDI-TOF MS dos isolados de *Candida* a partir de isolados em cultura;
- Realizar identificação de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* de isolados de *Candida* em cultura, através de sensores e Inteligência Artificial;
- Identificar a incidência de candidemia nosocomial nas diferentes Unidades de Saúde e as espécies prevalentes de *Candida*;
- Determinar os fatores de risco e a mortalidade associada, para cada espécie de *Candida*, em pacientes críticos das três Unidades de Saúde Públicas do Rio Grande do Norte;
- Determinar a concentração inibitória mínima das leveduras através de testes de sensibilidade antifúngica padronizados pelo documento M27-A3 e M27-S4 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), frente anfotericina B, fluconazol, voriconazol, anidulafungina, caspofungina e micafungina;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COMITÊ DE ÉTICA

Esta pesquisa foi submetida para análise ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos e as atividades iniciaram-se apenas mediante aprovação (CAAE: 81413517.4.0000.5208). Os prováveis riscos nesta pesquisa foram possível identificação do paciente ou quebra de sigilo das informações colhidas no prontuário. Como forma de amenizar a pesquisadora se comprometeu com a confidencialidade e sigilo dos dados obtidos para realização desse estudo foram observados os pressupostos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS)/Ministério da Saúde (MS) de 12 de Dezembro de 2012, que dispõe sobre a pesquisa com seres humanos (BRASIL, 2012). Além de garantir a privacidade do sujeito envolvido no estudo.

4.2 TIPO E LOCAL DO ESTUDO

Estudo transversal analítico descritivo, realizado no Laboratório de Micologia Médica do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), onde se realizou o diagnóstico micológico, os testes de sensibilidade e manutenção das culturas, na Central Analítica do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), onde a espectrometria de Massas foi desenvolvida e no Centro de Informática (CIN) da Universidade Federal de Pernambuco, onde realizamos a identificação das espécies de *Candida* com o dispositivo nariz eletrônico (e-nariz). Como também, a pesquisa contou com participação do Laboratório LAVIMI/IMT-UFRN (Laboratório de Virologia e Micologia) do Instituto de Medicina Tropical do Rio Grande do Norte, com armazenamento das amostras a - 80°.

4.3 POPULAÇÃO/AMOSTRA DO ESTUDO

A população do estudo foi constituída pelo total de pacientes internados nas UTIs do Hospital A (HA), Hospital B (HB) e Hospital C (HC), que obtiveram amostras de hemoculturas identificadas como sendo pertencentes ao gênero *Candida* pelo CHROmagar

Candida e/ou sistema automatizado Vitek (Biomerieux) no LACEN. No total obtivemos um total de 50 amostras de *Candida* de hemoculturas dos pacientes. Além de cepas de *C. krusei* e *C. parapsilosis sensu stricto* pertencentes à Coleção de Culturas Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco.

4.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.4.1 Coleta das amostras e Diagnóstico micológico

As coletas foram realizadas no período de abril de 2018 a fevereiro de 2020, de acordo com solicitação médica, em três Hospitais públicos terciários da região metropolitana de Natal-RN. As amostras sanguíneas de pacientes internados nestes hospitais foram obtidas após a coleta ser realizada por profissional de saúde do hospital, juntamente ao Laboratório de Microbiologia da Unidade ou no Laboratório Central de Saúde Pública do Rio Grande do Norte Dr. Almino Fernandes (LACEN-RN), que é a referência no diagnóstico de candidemias para o sistema público terciário de saúde no estado. Após obtenção das amostras, estas foram semeadas em duplicata na superfície do meio ágar Sabouraud (DIFCO) adicionado de 50 mg/L de cloranfenicol contido em placas de Petri, mantidas à temperatura de 30°C e 37°C por até 15 dias. Havendo o surgimento das colônias deu-se a identificação das espécies de *Candida* através do MALDI-TOF MS. Foi adotada como critérios de inclusão para a coleta das amostras dos pacientes, a obtenção apenas de amostras indicativas da presença de leveduras, sendo excluídas amostras com outras identificações nos respectivos laboratórios.

4.4.2 Identificação por MALDI-TOF MS

As amostras foram submetidas à análise por espectrometria de massa (MALDI-TOF Autoflex III Bruker Laser nd:yag smartbeam, Bruker Daltonics Inc., USA/Germany). Para a

análise das leveduras isoladas em cultura, foram utilizadas suspensões de *Candida* cultivadas e mantidas em meio Dextrose Peptona Extrato de Levedura (YEPD) de acordo com Lima-Neto et al. (2014). Os espectros para determinação do perfil proteico dos isolados foram obtidos através de um laser Nd:YAG (*neodymium-do pedyttrium aluminium garnet*; Nd:Y3Al5O12) de 1064nm, onde a intensidade do laser foi ajustada ligeiramente acima do limiar para a produção de íons. Um kit proteico (*protein calibration standart I*, Bruker Daltonics, Bilerica, 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 20 tiros de laser acumulados por perfil e 50 perfis produzidos por amostra, levando a um total de 10.800 disparos de laser somados por espectro. A lista de picos obtidos foi exportada ao software Biotyper™ (Biotyper system, versão 3.1) onde as identificações finais foram alcançadas (Score 1.700 a 3.000). Identificação através do software Biotyper™ foi baseada apenas na presença ou ausência de cada pico no espectro.

4.4.3 Identificação Molecular

Para confirmação taxonômica, o DNA dos isolados foi extraído segundo Inácio et al. (2016) utilizando o protocolo modificado do CTAB. Após a extração, o DNA foi ressuspensionado em 50µl de água MiliQ, quantificado e diluído a 10ng/µL. Para identificação das espécies foram realizadas reações de PCR convencional utilizado os seguintes primers ITS1 e ITS4 (White et al.,1990). Os parâmetros utilizados nas reações de PCR consistiram de desnaturação inicial a 95°C por 5 min, realizada em 30 ciclos de 95°C por 30s, 56°C por 30s, 72°C por 30s e extensão final a 72°C por 10 min. Ao final do processo, as amostras foram purificadas por meio do kit GenJET PCR Purification (Fermentas, UK) e os fragmentos de DNA genômico sequenciados na Plataforma de sequenciamento-LABCEN/CCB (UFPE) segundo protocolos preestabelecidos do laboratório parceiro.

As sequências consenso foram obtidas por meio do programa Sequencher 4.7, sendo as sequências de nucleotídeos submetidas à ferramenta BLAST do GenBank (National Center

of Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para busca por sequências similares. As sequências obtidas nesse estudo foram alinhadas com as sequências de confiança depositadas no banco de dados e analisadas filogeneticamente com o auxílio do programa MEGA7.

4.4.4 Identificação por Inteligência Artificial e Nariz Eletrônico

Foram utilizadas dez amostras de *C. albicans*, duas *C. krusei* e duas de *C. parapsilosis sensu stricto* dentre as identificadas nos pacientes desse estudo, oito *C. parapsilosis sensu stricto* e oito *C. krusei* pertencentes à Coleção de Culturas Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco para identificação no sensor (nariz eletrônico), isoladas em meio Agar Sabouraud Dextrose (ASD) e incubados a 35°C por 24 horas.

No dispositivo desta pesquisa existe uma entrada de ar por onde são injetadas as amostras para análises e uma saída para a limpeza (purga) da câmara com sensores, suas conexões e válvulas são de aço inoxidável. A câmara de análise e as mangueiras que conduzem o ar são de Politetrafluoretileno (PTFE). Tanto o uso de aço inoxidável e PTFE são escolhas de projeto para minimizar adsorção na superfície dos COVs analisados. Os sensores utilizados para a análises dos COVs são de dióxido de estanho (SnO₂) e sua mudança de condutividade elétrica, resultante da interação química ou física entre os gases e a sua superfície, é convertida para um sinal digital pela placa de aquisição de dados, que permite a coleta de sinais gerados pelos sensores a cada segundo exigindo apenas uma conexão USB padrão para transferência de dados e fornecimento de corrente elétrica para funcionamento do dispositivo.

4.4.5 Teste de sensibilidade antifúngica

A técnica utilizada seguiu o protocolo M27-A3 e M27-S4 (CLSI, 2008, 2012). 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 caspofungina, micafungina e anidulafungina, anfotericina B e voriconazol (todos $0,03\text{-}16 \text{ }\mu\text{g/mL}$), preparado em dimetil sulfoxido (DMSO) e fluconazol ($0,125\text{-}64 \text{ }\mu\text{g/mL}$) da Sigma-Aldrich. Os isolados clínicos de *Candida* obtidos a partir das hemoculturas foram mantidos em meio Agar Sabouraud Dextrose (ASD) e incubados a 35°C . 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 ensaios foram utilizadas placas de microtitulação planas de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). O inóculo foi adicionado aos poços com as drogas a serem testadas, e as placas incubadas a 35°C durante 24 horas para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os CIMs para as equinocandinas foram determinadas para 50% de inibição em relação aos poços controles.

Candida krusei ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foram usados como controle de qualidade. O teste de sensibilidade antifúngica foi realizado em duplicata para cada isolado.

A leitura da concentração inibitória mínima (CIM) das drogas testadas foi realizada após 24h e 48h de incubação conforme o protocolo CLSI - M27-S4 (CLSI, 2008, 2012). A presença ou ausência de crescimento das leveduras em cada poço da placa foi avaliada por meio de leitura, estabelecendo a interpretação dos resultados baseada no crescimento (turbidez) visualmente observado.

4.5 ANÁLISES EPIDEMIOLÓGICAS

4.5.1 Coleta de dados

Um formulário específico (APÊNDICE A) foi utilizado para documentar dados epidemiológicos dos pacientes com candidemia coletados através da revisão de prontuários médicos, sendo posteriormente armazenados em um banco de dados por meio do programa Microsoft Excel 2010. Dados sobre a evolução dos pacientes e suas informações clínicas foram acompanhados até o momento da alta hospitalar, transferência para outra unidade ou óbito. Os dados coletados foram armazenados em pastas de arquivo no computador pessoal do pesquisador responsável.

4.6 CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS

4.6.1 Variáveis dependentes

Epidemiologia das candidemias nosocomiais, espécies de *Candida* isoladas em amostras clínicas de pacientes internados nos hospitais A, B C e, determinação da sensibilidade antifúngica dos isolados.

4.6.2 Variáveis independentes

Foram coletadas as seguintes variáveis: idade, gênero, tempo de internamento, doenças de base, condições clínicas, procedimentos invasivos realizados, tratamento medicamentoso, espécie fúngica isolada e presença de outros microrganismos.

Os fatores de risco analisados foram: presença de cateter venoso central, ventilação mecânica, antibioticoterapia prévia, nutrição parenteral, sonda vesical, corticoterapia, cirurgia prévia e se abdominal ou não, hemodiálise, idade extrema, tempo prolongado de internamento, doença hematológica ou oncológica, diabetes, presença de neutropenia, quimioterapia ou radioterapia e imunossupressão. Foram consideradas como condições de risco para candidemia aquelas presentes até 30 dias antes da ocorrência da infecção.

Informações sobre mortalidade, taxa de incidência e prevalência de espécies de *Candida* foram armazenadas.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As variáveis categóricas foram expressas por meio de suas frequências e porcentagens, para análise de associação entre elas, utilizou-se o teste Qui-quadrado, considerando significativo o *p-valor* $<0,05$. Dessa forma, se *p-valor* for significativo, rejeita-se a hipótese nula e conclui-se que a hipótese de dependência entre as variáveis é verdadeira. Foi analisada a sobrevida para óbito através da análise de Kaplan-Meier, considerando o teste de long rank para testar a hipótese de que não há diferença na distribuição da sobrevivência nos grupos avaliados, considerando significativo o *p-valor* $<0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Artigo 1 – Publicado na Revista Research, Society and Development

DISTRIBUIÇÃO, FATORES DE RISCO E SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE ESPÉCIES CANDIDA ISOLADAS DA CORRENTE SANGUÍNEA DE PACIENTES CRÍTICOS

Resumo

A candidemia é uma preocupação crescente em hospitais de todo o mundo, com distribuição de espécies de *Candida* não-*albicans* cada vez mais frequente em pacientes na UTI e alta taxa de mortalidade. Este estudo teve o objetivo de identificar as espécies de *Candida*, fatores de risco e taxas de resistência antifúngica no Estado do Rio Grande do Norte. Trata-se de um estudo transversal analítico descritivo, realizado de 2018 a 2020, com 50 pacientes internados em UTIs de três hospitais terciários, na cidade de Natal no Estado do Rio Grande do Norte. Não foram encontradas diferenças estatísticas relacionadas ao sexo, mas significância relacionada a faixa etária, principalmente nos menores de onze anos. *C. albicans* (48%), *C. tropicalis* (32%) e *C. pelliculosa* (6%) foram as mais prevalentes. Os principais fatores de risco para candidemia, entre os pacientes dos três hospitais foi o uso de sondagem vesical (94%), nutrição parenteral (84%), cateter venoso central (48%), corticoterapia (44%) e imunossupressão (44%). Quando comparados os casos de candidemia nos diferentes hospitais e apresentação das espécies de *Candida*, não houve diferença significativa na distribuição dos óbitos. Desta forma, especial atenção deve ser direcionada aqueles pacientes que apresentarem estes fatores de risco a fim de realizar uma terapia profilática prévia. O percentual de mortes foi de 16,67% no Hospital B e 25% no Hospital C, não obtivemos dados de óbito para os pacientes do Hospital A. Observou-se resistência de *C. albicans* a anidulafungina, micafungina, voriconazol e anfotericina B, bem como de *C. tropicalis* a estes dois últimos antifúngicos. *C. pelliculosa* também foi resistente ao voriconazol. Enquanto que *C. parapsilosis* e *C. krusei* apresentaram resistência à anidulafungina. A distribuição de

espécies e susceptibilidade antifúngica de isolados de *Candida* provenientes de casos de candidemia trazem novas perspectivas ao entendimento desse grave panorama. Assim, fornece informações úteis sobre a epidemiologia, fatores de risco e padrão de susceptibilidade úteis para a seleção de agentes antifúngicos empíricos para pacientes com candidemia.

Palavras-chave: *Candida albicans*; Fluconazol; Resistência antifúngica; Tratamento empírico.

Abstract

Candidemia is a current concern in hospitals around the world, with a recurrent distribution of *Candida* species in ICU patients and a high mortality rate. This study aimed to identify *Candida* species, risk factors, and antifungal resistance rates in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. This is an analytical descriptive cross-sectional study, carried out from 2018 to 2020, with 50 patients admitted to ICUs of three tertiary hospitals, in the city of Natal, State of Rio Grande do Norte, Brazil. No statistical differences were related to sex, but it was related to age group, especially in those under eleven years old. *Candida albicans* (48%), *C. tropicalis* (32%), and *C. pelliculosa* (6%) were the most prevalent species. The main risk factor for candidemia observed in the study was the use of urinary catheters (94%), parenteral nutrition (84%), a central venous catheter (48%), corticotherapy (44%), and immunosuppression (44%). No significant statistical difference in the distribution of deaths when compared to the hospitals and the presentation of *Candida* species. Thus, special attention must be directed to patients who present these risk factors in order to undergo a previous prophylactic therapy. The percentage of deaths was 16.67% in Hospital B, 25% in Hospital C, and 0% for patients in Hospital A. In *Candida albicans* the phenomenon of antifungal resistance was related to anidulafungin, micafungin, voriconazole, and amphotericin B, as well as from *C. tropicalis* to these last two antifungals. *Candida pelliculosa* was also resistant to voriconazole. While *C. parapsilosis* and *C. krusei* showed resistance to anidulafungin. The species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* isolated from candidemia cases bring new perspectives to the understanding of this serious scenario. Thus, it provides useful information on the epidemiology, risk factors, and

susceptibility pattern useful for the selection of empirical antifungal agents for patients with candidemia.

Keywords: *Candida albicans*; Fluconazole; Antifungal resistance; Empirical treatment.

Resumen

La candidemia es una preocupación actual en hospitales de todo el mundo, con una distribución recurrente de especies de *Candida* en pacientes de UCI y una alta tasa de mortalidad. Este estudio tuvo como objetivo identificar especies de *Candida*, factores de riesgo y tasas de resistencia a los antifúngicos en el estado de Rio Grande do Norte, Brasil. Se trata de un estudio analítico descriptivo transversal, realizado de 2018 a 2020, con 50 pacientes ingresados en UCI de tres hospitales terciarios, en la ciudad de Natal, Estado de Rio Grande do Norte, Brasil. No hubo diferencias estadísticas relacionadas con el sexo, pero sí con el grupo de edad, especialmente en los menores de once años. *Candida albicans* (48%), *C. tropicalis* (32%) y *C. pelliculosa* (6%) fueron las especies más prevalentes. El principal factor de riesgo de candidemia observado en el estudio fue el uso de catéteres urinarios (94%), nutrición parenteral (84%), catéter venoso central (48%), corticoterapia (44%) e inmunosupresión (44%). No hay diferencia estadística significativa en la distribución de las muertes en comparación con los hospitales y la presentación de especies de *Candida*. Por tanto, se debe prestar especial atención a los pacientes que presenten estos factores de riesgo para poder someterse a una terapia profiláctica previa. El porcentaje de muertes fue del 16,67% en el Hospital B, del 25% en el Hospital C y del 0% para los pacientes del Hospital A. En *Candida albicans* el fenómeno de la resistencia antifúngica se relacionó con anidulafungina, micafungina, voriconazol y anfotericina B, así como con desde *C. tropicalis* hasta estos dos últimos antifúngicos. *Candida pelliculosa* también fue resistente al voriconazol. Mientras que *C. parapsilosis* y *C. krusei* mostraron resistencia a la anidulafungina. La distribución de especies y la susceptibilidad antifúngica de *Candida* aislada de casos de candidemia aportan nuevas perspectivas a la comprensión de este grave escenario. Por lo tanto, proporciona información útil sobre la epidemiología, los factores de

riesgo y el patrón de susceptibilidad útil para la selección de agentes antimicóticos empíricos para pacientes con candidemia.

Palabras clave: *Candida albicans*; fluconazol; resistencia a los antifúngicos; tratamiento empírico.

1 Introdução

O controle das infecções por *Candida* é um desafio na clínica moderna (Santos et al. 2018). Como problema crescente nos hospitais em todo o mundo, a candidemia apresenta altos índices de morbidade e mortalidade, atingindo até 70% dos pacientes com esta infecção (Yapar, 2014, Li et al. 2017, Pappas et al. 2018). Na corrente sanguínea, este fungo representa o terceiro microrganismo mais isolado em hemoculturas como causa de candidemia nos estudos de base populacional (Pfaller et al. 2014, Wu et al. 2017, Doi et al. 2016).

A epidemiologia da candidemia varia geograficamente, apresentando maior risco em desenvolver infecção por *Candida* os pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), em uso de dispositivos médicos-invasivos, antibioticoterapia de largo espectro, imunocomprometidos, crianças abaixo de 1 ano de idade e idosos (Matta; Souza; Colombo 2017, Lovero et al. 2016, Li et al. 2017, Chakrabarti et al. 2020). Embora *C. albicans* ainda seja a espécie considerada mais comum da candidemia, existe uma preocupação com o aumento das taxas de infecções invasivas por espécies de *Candida* não-*albicans* e resistência a antifúngicos em diferentes partes do mundo. Esse cenário necessita de controle destas infecções através do diagnóstico precoce e prevenção (Pinhati et al. 2016, Doi et al. 2016, Santos et al. 2018).

Na prática laboratorial, comumente o diagnóstico tem sido baseado no isolamento do fungo em cultura, como o CHROMagar *Candida*, usado como um meio seletivo e diferencial (Ghosh et al. 2015, Kaur and Chakrabarti 2017). Contudo, a automatização da hemocultura continua sendo a principal prática de diagnóstico da candidemia, porém ainda com baixa sensibilidade (Skrobik; Laverdiere 2013, Merseguet et al. 2015, Li et al. 2017). Nos últimos

anos a identificação das espécies de *Candida* evoluiu de métodos convencionais baseados em bioquímicos manuais para testes moleculares e baseados em proteínas e ácidos nucleicos automatizados, como MALDI-TOF MS, que tem revolucionado o diagnóstico dessa infecção, com tempo resposta menor do que três horas da identificação da espécie críptica de *Candida*.

No cenário atual, apesar dos avanços clínicos, tem sido crescente o desenvolvimento de resistência entre espécies de *Candida*, principalmente em relação aos azólicos, merecendo destaque as cepas de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (Santos et al. 2018, Andersen et al. 2016, Matta; Souza; Colombo 2017). Assim, o conhecimento da epidemiologia local, diagnóstico e perfil de suscetibilidade antifúngica das espécies de *Candida* são essenciais para orientar estratégias de prevenção e tratamento, dirimindo a carga de candidemia, morbidade e mortalidade associadas.

O presente estudo fornece um panorama das espécies, fatores de risco e taxas de resistência antifúngica entre as espécies de *Candida*, obtidas em amostras da corrente sanguínea de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva em hospitais terciários no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil.

2 Métodos

2.1 Desenho do estudo e coleta de dados dos pacientes

No período de abril de 2018 a fevereiro de 2020 conduzimos um estudo transversal analítico descritivo com 50 pacientes internados em UTIs de três hospitais terciários, localizados na cidade do Natal, no Estado do Rio Grande do Norte. O Laboratório de Micologia Médica do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e a Central Analítica do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) foram os centros de referência para manipulação das amostras neste estudo.

As instituições participantes da pesquisa foram três hospitais públicos terciários do Estado Rio Grandes do Norte, que possuem infraestrutura para o atendimento em UTI. A seleção dos pacientes e variáveis categóricas para este estudo foi definida de acordo com a obtenção das amostras, leveduras pertencentes ao gênero *Candida*. Depois de selecionados os

participantes, os dados clínicos, características demográficas, comorbidades subjacentes e terapêutica antifúngica, foram obtidos através dos prontuários nas diferentes instituições. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos, com CAAE: 81413517.4.0000.5208, sendo seguidos pelos pesquisadores, todos os preceitos éticos para o desenvolvimento do estudo.

2.2 Identificação do microrganismo e suscetibilidade antifúngica

As amostras foram inoculadas em meio CHROMagar *Candida*. A confirmação das espécies foi realizada por espectrometria de massas (MALDI-TOF Autoflex III Bruker Laser nd:yag smartbeam, Bruker Daltonics Inc., USA/Germany) e sequenciamento da região ITS.

Para confirmação taxonômica, o DNA dos isolados foi extraído segundo Inácio et al. (2016) utilizando o protocolo modificado do CTAB. Após a extração, o DNA foi ressuspendido em 50µl de água MiliQ, quantificado e diluído a 10ng/µL. Para identificação das espécies foram realizadas reações de PCR convencional utilizado os seguintes primers ITS1 e ITS4 (White et al.,1990). Os parâmetros utilizados nas reações de PCR consistiram de desnaturação inicial a 95°C por 5 min, realizada em 30 ciclos de 95°C por 30s, 56°C por 30s, 72°C por 30s e extensão final a 72°C por 10 min. Ao final do processo, as amostras foram purificadas por meio do kit GenJET PCR Purification (Fermentas, UK) e os fragmentos de DNA genômico sequenciados na Plataforma de sequenciamento-LABCEN/CCB (UFPE) segundo protocolos preestabelecidos do laboratório parceiro.

As sequências consenso foram obtidas por meio do programa Sequencher 4.7, sendo as sequências de nucleotídeos submetidas a ferramenta BLAST do GenBank (National Center of Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para busca por sequências similares. As sequências obtidas nesse estudo foram alinhadas com as sequências de confiança depositadas no banco de dados e analisadas filogeneticamente com o auxílio do programa MEGA7.

Foram realizados testes de sensibilidade antifúngica, para todas as cepas de *Candida*, de acordo com as diretrizes CLSI M27-A3 e M27-S4 (CLSI, 2008, 2012), para fluconazol

(0.125-64 µg/mL), anfotericina B, voriconazol, caspofungina, micafungina e anidulafungina (todos 0,03-16 µg/mL). As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos antifúngicos foram obtidas após 24 e 48 horas de incubação a 35°C pela pontuação de crescimento para cada uma das cepas analisadas em comparação com as cepas controle, lidos conforme instruções do protocolo CLSI M27-A3. Foram usados como controle de qualidade *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. O teste de sensibilidade antifúngica foi realizado em duplicata para cada isolado.

2.3 Análises estatísticas

As variáveis categóricas foram expressas por meio de suas frequências e porcentagens, para análise de associação entre elas, utilizou-se o teste Qui-quadrado, considerando significativo o *p*-valor <0,05. Dessa forma, se *p*-valor for significativo, rejeita-se a hipótese nula e conclui-se que a hipótese de dependência entre as variáveis é verdadeira.

Foi analisada a sobrevida para óbito através da análise de Kaplan-Meier, considerando o teste de long rank para testar a hipótese de que não há diferença na distribuição da sobrevivência nos grupos avaliados, considerando significativo o *p*-valor <0,05.

3. Resultados

Foram avaliados 50 pacientes dos quais 20 amostras do Hospital A (HA), 18 eram do Hospital B (HB) e 12 do Hospital C (HC). Do total de 50 pacientes, 28 (56%) eram do sexo masculino e 20 (40%) tinham idade entre 0 e 10 anos. Ao comparar o perfil dos três grupos de pacientes atendidos nos hospitais, em relação ao sexo e faixa etária, observou-se que não há diferença estatística relacionada ao sexo (*p*-valor:0,436) e valor significativo foi observado quando analisado as diferentes faixas etárias dos pacientes (*p*-valor <0,001), sobretudo naqueles menores de 11 anos (Tabela 1).

Em relação às espécies de *Candida*, foram identificadas nas culturas dos pacientes, *C. albicans* (n=24/50, 48%), *C. tropicalis* (n=16/50, 32%), *C. pelliculosa* (n=3/50, 6%), *C. parapsilosis* (n=2/50, 4%), *C. glabrata* (n=2/50, 4%), *C. metapsilosis* (n=1/50, 2%), *C. orthopsilosis* (n=1/50, 2%) e *C. krusei* (n=1/50, 2%). Não havendo diferença estatística da

distribuição dessas espécies dentre os hospitais (p-valores: 0,833 e 0,169, respectivamente) (Tabela 2).

Dentre os fatores de risco nas UTIs, analisados no estudo, identificou-se maior incidência entre os pacientes dos três hospitais quanto ao uso de sondagem vesical (47 pacientes, 94%), nutrição parenteral (42 pacientes, 84%), cateter venoso central (24 pacientes, 48%), corticoterapia (22 pacientes, 44%) e imunossupressão (22 pacientes, 44%). Ainda, foi verificado que, dentre os fatores de risco estudados, aqueles que mais estavam relacionados com o surgimento da candidemia foram o uso de antibiótico de largo espectro, corticosteróides, cirurgia prévia, cardiopatia, câncer, hipertensão, diabetes mellitus, neutropenia; quimioterapia e imunossupressão com significância estatística $p < 0,05$. Contudo, o uso de Cateter venoso central, ventilação mecânica, nutrição parenteral e sonda vesical não estavam associados com o surgimento de infecções por *Candida*. Observou-se uso maior de fluconazol no HA (55%; 11/20) e HB (44%, 8/18), como também na terapia com anfotericina (45%, 9/20) e (38,9%, 7/18) respectivamente. Um dado interessante observado foi que, apesar de 46% os pacientes estarem em uso de fluconazol, 40% com anfotericina e 14% com itraconazol, o uso de antifúngicos não evitou o surgimento da candidemia, com $p < 0,129$ (Tabela 1).

Tabela1: Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes atendidos.

Perfil dos pacientes atendidos	Episódios	P Valor
Sexo masculino	28 (56%)	0,436
Sexo feminino	22 (44 %)	
Idade >0 anos	50 (100%)	<0,001
Espécies de <i>Candida</i>	8 (50 isolados)	0,169

Hospitais	3 (50 episódios)	0,833
Cateter Venoso Central	24 (48%)	0,942
Ventilação mecânica	22 (44%)	0,858
Antibiótico de largo espectro	44 (88%)	0,006
Antifúngico	50 (100%)	0,129
Nutrição parenteral	42 (84%)	0,681
Sonda vesical	47 (94%)	0,091
Corticoterapia	22 (44%)	<0,001
Cirurgia prévia	6 (12%)	0,103
Hemodiálise	2 (4%)	0,499
Cardiopatía	7 (14%)	0,004
Neoplasia	10 (20%)	0,012
Diabetes mellitus	10 (20%)	0,01
Hipertensão	13 (26%)	<0,001
Neutropenia	9 (18%)	0,004
Quimioterapia	4 (8%)	0,038
Imunossupressão	22 (44%)	0,001

Fonte: Autores.

Tabela 2 – Número de isolados de *Candida* spp. identificados por fatores de risco do estudo em cada hospital.

		HOSPITAL								
Variáveis		HB		HA		HC		Total		p-valor*
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Isolados	CRN	0	0,0%	1	5,0%	0	0,0%	1	2,0%	0,833
	CRN1	5	27,8%	2	10,0%	4	33,3%	11	22,0%	
	CRN2	3	16,7%	5	25,0%	2	16,7%	10	20,0%	
	CRN3	4	22,2%	4	20,0%	3	25,0%	11	22,0%	
	CRN4	4	22,2%	5	25,0%	2	16,7%	11	22,0%	
	CRN5	1	5,6%	0	0,0%	1	8,3%	2	4,0%	
	CRN6	0	0,0%	1	5,0%	0	0,0%	1	2,0%	
	CRN7	0	0,0%	1	5,0%	0	0,0%	1	2,0%	
	CRN8	0	0,0%	1	5,0%	0	0,0%	1	2,0%	
	CRN9	1	5,6%	0	0,0%	0	0,0%	1	2,0%	
	Total	18	100,0 %	20	100,0 %	12	100,0 %	50	100,0%	
Espécies	<i>C. albicans</i>	6	33,3%	10	50,0%	8	66,7%	24	48,0%	0,169
	<i>C. glabrata</i>	1	5,6%	0	0,0%	1	8,3%	2	4,0%	
	<i>C. krusei</i>	1	5,6%	0	0,0%	0	0,0%	1	2,0%	

<i>C. metapsilosis</i>	1	5,6%	0	0,0%	0	0,0%	1	2,0%
<i>C. orthopsilosis</i>	0	0,0%	1	5,0%	0	0,0%	1	2,0%
<i>C. parapsilosis</i>	2	11,1%	0	0,0%	0	0,0%	2	4,0%
<i>C. pelliculosa</i>	3	16,7%	0	0,0%	0	0,0%	3	6,0%
<i>C. tropicalis</i>	4	22,2%	9	45,0%	3	25,0%	16	32,0%
Total	18	100,0%	20	100,0%	12	100,0%	50	100,0%

*teste qui-quadrado

Fonte: Autores.

Tabela 3 - Taxa de mortalidade, por hospital, ocasionado pelas espécies de *Candida*.

		óbito						
Variáveis		Não		sim		Total		p-valor*
		n	%	N	%	n	%	
Hospital	HB	15	83,3%	3	16,7%	18	100,0%	0,081
	HA	20	100,0%	0	0,0%	20	100,0%	
	HC	9	75,0%	3	25,0%	12	100,0%	
	Total	44	88,0%	6	12,0%	50	100,0%	
Espécies	<i>Candida albicans</i>	21	87,5%	3	12,5%	24	100,0%	0,285

<i>C. glabrata</i>	2	100,0%	0	0,0%	2	100,0%
<i>C. krusei</i>	0	0,0%	1	100,0%	1	100,0%
<i>C. metapsilosis</i>	1	100,0%	0	0,0%	1	100,0%
<i>C. orthopsilosis</i>	1	100,0%	0	0,0%	1	100,0%
<i>C. parapsilosis</i>	2	100,0%	0	0,0%	2	100,0%
<i>C. pelliculosa</i>	3	100,0%	0	0,0%	3	100,0%
<i>C. tropicalis</i>	14	87,5%	2	12,5%	16	100,0%
Total	44	88,0%	6	12,0%	50	100,0%

*teste qui-quadrado

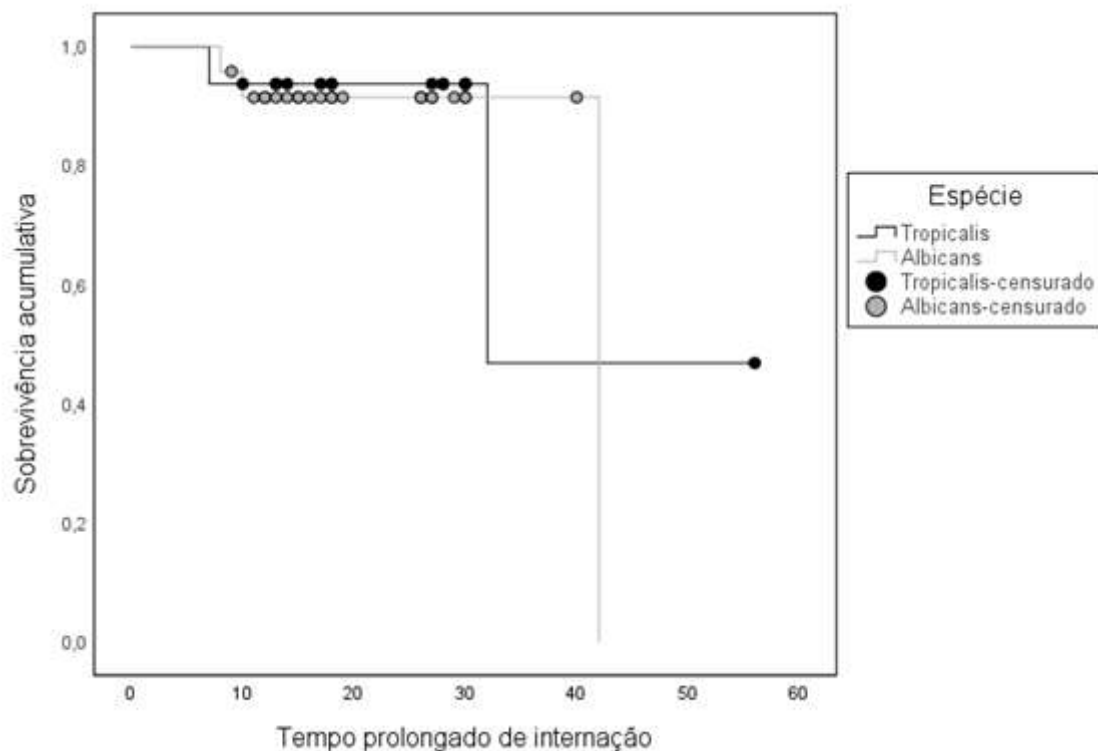
Fonte: Autores.

Conforme tabela 3, não houve diferença significativa na distribuição dos óbitos quando se compara casos nos diferentes hospitais (p-valor: 0,081) e também quando se compara a espécie de *Candida* (p-valor: 0,285). Em relação à sobrevida para óbito quando comparado às espécies *C. tropicalis* e *C. albicans*, mais prevalentes entre os pacientes nos três hospitais, o percentual de mortes foi de 12,5% para ambos os pacientes. Ainda, apesar de os pacientes acometidos por *C. tropicalis* possuírem uma média de sobrevivência levemente maior que *C. albicans*, a hipótese obtida pelo teste long rank considera similar a distribuição da sobrevivência entre os pacientes que contraíram infecção, tanto por *C. albicans* quanto por *C. tropicalis* (41,688 vs. 39,189, respectivamente), ou seja, o tempo de óbito ocorre em prazos semelhantes para ambas (p-valor: 0,863), como observado no gráfico 1.

Em relação à sobrevida para óbito quando comparado pacientes dos hospitais HB e HC, o percentual de mortes é de 16,67% no HB e 25% no HC. O hospital HA não tem dados

de óbito para os pacientes participantes do estudo. Quando aplicado o teste long rank, foi possível perceber que há semelhança sutil na distribuição da sobrevivência entre pacientes dos hospitais HB e HC, ou seja, o tempo de óbito ocorre em prazos semelhantes para ambos (p-valor: 0,710). Ainda, conforme apresentado na tabela 3, os pacientes que contraíram infecções por *C. tropicalis* possuem uma média de sobrevivência maior, porém bem próxima da média dos pacientes que contraíram *C. albicans* (41,688 vs. 39,189, respectivamente).

Gráfico1: O gráfico de sobrevivência espelha os dados permitindo verificar quais das curvas apresenta melhor resultado, quanto mais acima está a curva, menos mortes. Dessa forma, pode-se observar que as curvas das duas espécies são bem próximas, justificando o resultado de que não há diferença significativa na média de sobrevivência entre elas.



Fonte: Autores.

O gráfico de sobrevivência espelha os dados permitindo verificar quais das curvas apresenta melhor resultado, quanto mais acima está a curva, menos mortes.

Na tabela 4 são descritos os valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos, anfotericina B, fluconazol, voriconazol, micafungina, caspofungina e anidulafungina, testados frente a todas as 50 amostras, bem como para as cepas ATCC (controle de qualidade). Dos 24 isolados de *C. albicans*, observou-se resistência a anfotericina B (1/4%), anidulafungina (1/4%), micafungina (1/4%) e voriconazol (1/4%), 3 (11%) sensíveis dose dependente a voriconazol e 1 (4%) a fluconazol. Das 16 amostras de *C. tropicalis*, 1 (6%) isolado foi resistente à anfotericina B e 1 (6%) a voriconazol, enquanto 2 (11%) foram sensível dose dependente a fluconazol e 2 (11%) a voriconazol. Dentre as 3 cepas de *C. pelliculosa*, 1 (25%) foi resistente e 1 (25%) sensível dose dependente ao voriconazol. Enquanto que das duas amostras de *C. parapsilosis* 1 (50%) foi resistente à anidulafungina e o único isolado de *C. krusei* foi resistente ao mesmo antifúngico.

Tabela 4 - concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos

Concentração Inibitória Mínima-CIM (µg/mL)							
Espécie	Isolados	Anfotericina B	Fluconazol	Vorinazol	Micafugina	Caspofugina	Anidulafugina
		24h	24h	24h	24h	24h	24h
<i>Candida albicans</i>	CRN1	1(S)	8(S)	2(SDD)	0,5(S)	0,25(S)	4(R)
	CRN3	8(R)	4(S)	2(SDD)	1(S)	0,5(S)	1(S)
	CRN7	0,06(S)	0,125(S)	0,06(S)	4(R)	0,25(S)	0,25(S)
	CRN12	1(S)	0,25(S)	0,5(S)	2(S)	0,03(S)	0,125(S)
	CRN13	0,06(S)	0,125(S)	0,06(S)	0,06(S)	0,06(S)	2(S)
	CRN14	0,06(S)	0,125(S)	0,06(S)	0,06(S)	0,5(S)	2(S)
	CRN15	0,25(S)	0,125(S)	0,06(S)	0,06(S)	0,5(S)	0,5(S)

	CRN16	0,06(S)	0,125(S)	0,125(S)	2(S)	0,5(S)	0,5(S)
	CRN17	1(S)	1(S)	1(S)	0,25(S)	0,5(S)	0,25(S)
	CRN18	1(S)	0,25(S)	8(R)	0,125(S)	1(S)	1(S)
	CRN19	0,06(S)	0,5(S)	0,125(S)	1(S)	0,5(S)	0,5(S)
	CRN22	0,03(S)	0,0125(S)	0,03(S)	0,25(S)	0,06(S)	1(S)
	CRN27	0,03(S)	0,25(S)	0,03(S)	0,25(S)	0,06(S)	0,06(S)
	CRN30	0,03(S)	0,25(S)	0,25(S)	0,06(S)	0,25(S)	0,125(S)
	CRN32	0,03(S)	0,125(S)	0,03(S)	0,06(S)	0,25(S)	0,5(S)
	CRN34	0,125(S)	0,25(S)	0,03(S)	0,06(S)	0,03(S)	2(S)
	CRN40	1(S)	0,5(S)	0,06(S)	0,125(S)	0,06(S)	0,125(S)
	CRN41	1(S)	4(S)	0,06(S)	0,125(S)	0,03(S)	2(S)
	CRN42	0,25(S)	0,5(S)	0,06(S)	0,06(S)	0,06(S)	0,5(S)
	CRN43	0,125(S)	0,25(S)	0,06(S)	1(S)	0,25(S)	0,5(S)
	CRN44	0,03(S)	0,125(S)	0,06(S)	1(S)	0,03(S)	0,25(S)
	CRN47	0,03(S)	32(SDD)	2(SDD)	0,125(S)	0,25(S)	0,5(S)
	CRN49	0,25(S)	1(S)	0,125(S)	2(S)	0,125(S)	1(S)
	CRN50	0,03(S)	0,5(S)	0,125(S)	2(S)	0,5(SDD)	0,125(S)
<i>C. tropicalis</i>	CRN2	0,5(S)	0,25(S)	1(S)	0,5(S)	0,125(S)	2(S)

	CRN4	2(R)	0,25(S)	8(R)	0,125(S)	2(S)	0,25(S)
	CRN6	0,5(S)	0,125(S)	2(SDD)	0,03(S)	0,5(S)	0,06(S)
	CRN8	0,5(S)	0,25(S)	1(S)	0,5(S)	0,03(S)	0,25(S)
	CRN10	1(S)	0,125(S)	0,06(S)	0,125(S)	0,5(S)	0,03(S)
	CRN20	0,03(S)	0,25(S)	0,06(S)	0,06(S)	2(S)	2(S)
	CRN21	0,03(S)	0,125(S)	0,03(S)	2(S)	0,03(S)	2(S)
	CRN23	0,03(S)	32(SDD)	0,06(S)	0,25(S)	2(S)	2(S)
	CRN26	0,03(S)	0,5(S)	0,125(S)	0,03(S)	2(S)	0,06(S)
	CRN28	0,06(S)	0,5(S)	0,06(S)	0,5(SDD)	1(S)	0,03(S)
	CRN29	0,03(S)	0,5(S)	0,06(S)	0,125(S)	0,06(S)	0,03(S)
	CRN31	0,25(S)	0,125(S)	0,125(S)	0,25(S)	0,125(S)	0,125(S)
	CRN39	0,03(S)	4(S)	0,25(S)	0,25(S)	2(S)	1(S)
	CRN36	0,06(S)	1(S)	0,125(S)	0,25(S)	0,125(S)	0,5(S)
	CRN45	0,03(S)	0,5(S)	0,125(S)	0,06(S)	0,03(S)	0,5(S)
	CRN46	0,25(S)	32(SDD)	2(SDD)	0,125(S)	0,03(S)	0,5(S)
<i>C. pelliculosa</i>	CRN5	1(S)	1(S)	2(SDD)	0,06(S)	0,25(S)	1(S)
	CRN9	0,5(S)	0,5(S)	4(R)	1(S)	0,6(S)	0,25(S)

	CRN11	1(S)	1(S)	1(S)	2(S)	1(S)	0,03(S)
<i>C. glabrata</i>	CRN24	0,03(S)	0,25(S)	0,125(S)	0,25(S)	0,06(S)	0,06(S)
	CRN25	0,06(S)	0,25(S)	0,03(S)	0,125(S)	0,125(S)	0,125(S)
<i>C. orthopsilosis</i>	CRN33	0,03(S)	0,25(S)	0,25(S)	0,03(S)	0,125(S)	1(S)
<i>C. parapsilosis</i>	CRN35	0,03(S)	1(S)	0,25(S)	2(S)	0,03(S)	0,03(S)
	CRN37	0,06(S)	0,5(S)	0,125(S)	0,5(S)	0,03(S)	16(R)
<i>C. metapsilosis</i>	CRN38	0,03(S)	0,25(S)	0,125(S)	0,25(S)	0,25(S)	0,5(S)
<i>C. krusei</i>	CRN48	0,25(S)	0,25	0,06(S)	0,25(S)	1(R)	4(R)
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC2 2019	1	4	0,5	1	0,25	0,5
<i>C. krusei</i>	ATCC6 258	1	4	0,125	0,25	0,125	0,5
CIM50		0,06	0,25	0,125	0,25	0,25	0,5
CIM90		1	4	2	2	1	2

S=Sensível, SDD= Suscetível Dose Dependente, R=Resistente

4. Discussão

Acometendo hoje mais de 250.000 pessoas por ano, a candidemia tornou-se um problema de saúde pública mundial, sem distinção de sexo, afetando pessoas de todas as faixas etárias (Pappas et al. 2018, Pinhati et al. 2016). Nesse âmbito, no estudo não foi observado diferença na incidência de candidemia com relação ao sexo, enquanto que os indivíduos mais acometidos pela candidemia foram pacientes jovens. Estudos anteriores têm

relatado que esta população apresenta maior risco para desenvolver candidemia devido às terapias mais agressivas, necessitando de estratégias de intervenções apropriadas para redução da morbidade e mortalidade (Caggiano et al. 2017, Chakrabarti et al. 2020).

Dentre os agentes etiológicos, *C. albicans* foi à espécie mais comum causando candidemia, seguida por *C. tropicalis*. Ainda, durante o período de realização do estudo foi notado o aparecimento de outras espécies de importância clínica como *C. pelliculosa*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Existem hoje, mais de 17 espécies diferentes de *Candida* identificadas como patógenos causadores de alterações da corrente sanguínea (BSIs). Embora *C. albicans* ainda seja considerada o patógeno dominante da candidemia, o aumento das taxas de infecções invasivas por espécies de *Candida* não-*albicans* e resistência a antifúngicos em diferentes partes do mundo, tem preocupado as instituições de saúde (Liu et al. 2019, Pinhati et al. 2016, Doi et al. 2016, Santos et al. 2018). Assim, esse panorama é semelhante ao observado por outros estudos, onde mais de 90% das candidemias são causadas por *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (Xiao et al. 2019, Santos et al. 2018). Desta forma, uma compreensão da epidemiologia da candidemia e da suscetibilidade antifúngica das espécies, é imprescindível para orientar a vigilância nas estratégias de tratamento e controle destas infecções através do diagnóstico precoce e prevenção.

A maioria dos pacientes em nosso estudo, tiveram longos períodos de cateterismo do trato urinário, nutrição parenteral, cateterismo venoso central, uso de corticoides e imunossupressão. Segundo Tadec et al. (2016) esses fatores se mostram responsáveis pelas infecções fúngicas. Associado a esses riscos, são mais susceptíveis a desenvolverem infecções relacionadas à *Candida*, pacientes com neoplasias hematológicas, neutropenia, em uso de ventilação mecânica e aqueles em tratamento antibacterianos prolongados e de largo espectro em UTI (Fortún; Goia, 2017; Peixoto et al. 2014). Observamos que apesar dos avanços clínicos no suporte de paciente crítico, a candidemia ainda é de difícil diagnóstico, resultando em internação prolongada e aumento dos casos de mortalidade.

Em se tratando da mortalidade ocasionada pelas espécies de *Candida*, foram observados seis óbitos causados por *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, o que

representa um percentual de 12% dos casos de candidemia deste estudo. De maneira similar, outros estudos têm demonstrado que a candidemia é uma condição preocupante, sobretudo, devido a sua alta taxa de mortalidade (Magill et al., 2014; Kullberg, et al. 2015). Skrobik e colaboradores (2013) observaram, ainda, que falhas no diagnóstico podem conduzir ao atraso na terapêutica antifúngica e aumento considerável na taxa de mortalidade. Demonstrando a importância do prévio diagnóstico das diferentes espécies de *Candida* causadoras de candidemia, associado ao conhecimento do padrão de susceptibilidade aos antifúngicos.

Outro dado relevante é que a sobrevida dos pacientes infectados por *C. albicans* e *C. tropicalis* é estatisticamente semelhante com tempo de internação hospitalar prolongado até a morte do paciente, o que leva a crer que essas espécies possuem a mesma relevância quanto ao seu potencial patogênico. Similar ao aqui observado, Li e colaboradores (2017) perceberam que a mortalidade (30%) ocasionada pela candidemia (média de 30 dias) foi significativamente maior quando comparada com a mortalidade das infecções bacterianas. Esses dados apontam o alto impacto negativo para o sistema de saúde ocasionado pela candidemia, o que requer uma abordagem de diagnóstico e tratamento robusto a fim de melhorar esse panorama grave.

A maioria dos isolados de *Candida* (>80%) foram sensíveis ou suscetíveis dose-dependente a anfotericina B, fluconazol, voriconazol e as equinocandinas. Embora a anfotericina B tenha uma ação rápida contra a maioria das cepas de *Candida* e a resistência geralmente considerada rara (Kucukates et al. 2016), em nosso estudo encontramos cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* resistentes a este fármaco. Observamos resistência de isolados de *C. parapsilosis* e *C. krusei* a anidulafungina, embora seja raro esta apresentação antifúngica para as equinocandinas (Maubon et al. 2014, Matta et al. 2017).

O reconhecimento rápido da candidemia e o início imediato da terapia antifúngica apropriada é um fator determinante do resultado. As atuais diretrizes recomendam o tratamento antifúngico empírico, embora muitas vezes falhe em conferir qualquer benefício aos pacientes. Para certas espécies, a susceptibilidade a agentes antifúngicos pode ser prevista

com base em dados de suscetibilidade epidemiológica (Xiao et al. 2019, Deconinck et al. 2016).

Conclusão

A espécie prevalente no estudo foi *C. albicans*, sendo essa o principal agente responsável pela mortalidade. A idade juvenil, antibioticoterapia de largo espectro, imunossupressão, doenças de base preexistentes e neutropenia se destacaram como as principais condições predisponentes ao surgimento da candidemia na UTI. Desta forma, especial atenção deve ser direcionada aqueles pacientes que apresentarem estes fatores de risco a fim de realizar uma terapia profilática prévia. Apesar de não termos observado a relação entre o uso de dispositivos médicos com o surgimento da candidemia, é necessário melhor atenção das equipes médicas a essa questão, tendo em vista que esses dispositivos são comumente relatados em outros estudos como importantes fatores de risco para esta grave infecção.

Apoio financeiro: CAPES, CNPQ, FACEPE

Referências

- 1 Santos, G.C.O., Vasconcelos, C.C., Lopes, A.J.O., Cartágenes, M.S.S., Filho, A.K.D.B., Nascimento, F.R.F., Ramos, R.M., Pires, E.R.R.B., Andrade, M.S., Rocha, F.M.G., Monteiro, C.A. (2018). Infecções por *Candida* e estratégias terapêuticas: mecanismos de ação para agentes tradicionais e alternativos. *Frontiers in Microbiology*, 9:1351. doi: 10.3389/fmicb.2018.01351
- 2 Yapar, N. (2014). Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 10: 95–105. doi:10.2147 / TCRM.S40160
- 3 Li, D., Xia, R., Zhang, Q., Bai, C., Li, Z., Zhang, P. (2017). Evaluation of candidemia in epidemiology and risk factors among cancer patients in a cancer center of China: an 8-year case-control study. *BMC Infectious Diseases*, 17:536. doi: 10.1186/s12879-017-2636-x

- 4 Pappas, P.G., Lionakis, M.S., Arendrup, M.C., Ostrosky-Zeichner, L., Kullberg, B.J. (2018). Candidíase invasiva. *Nat Rev Dis Primers*, 4:18026. [doi:10.1038/nrdp.2018.26](https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26)
- 5 Pfaller, M.A., Wolk, D.M., Lowery, T.J. (2016). T2mr and t2candida: novel technology for the rapid diagnosis of candidemia and invasive candidiasis. *Future microbiology, Future Medicine*, 11(1):103–117. doi: 10.2217 / fmb.15.111
- 6 Wu, P.F., Liu, W.L., Hsieh, M.H., Hii, I.M., Lee, Y.L., Lin, Y.T., Ho, M.W., Liu, C.E., Chen, Y.H., Wang, F.D. (2017). Epidemiology and antifungal susceptibility of candidemia isolates of non-*albicans Candida* species from cancer patients. *Emerging Microbes & Infections*, 11;6(10):e87. doi:10.1038/emi.2017.74
- 7 Doi, A.M., Pignatari, A.C.C., Edmond, M., Marra, A.R., Camargo, L.F.A., Siqueira, R.A., Mota, V.P., Colombo, A.L. (2016). Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *Journal Plos One*, 11:e0146909. doi:10.1371/journal.pone.0146909
- 8 Matta, D.A., Souza, A.C.R., Colombo, A.L. (2017). Revisiting Species Distribution and Antifungal Susceptibility of *Candida* Bloodstream Isolates from Latin American Medical Centers. *Journal of Fungi*, 3(2):24. doi: 10.3390 / jof3020024
- 9 Lovero, G., Gilio, O., Montagna, O., Diella, G., Divenuto, F., Lopuzzo, M., Rutigliano, S., Laforgia, N., Caggiano, G., Montagna, M.T. (2016). Epidemiologia da candidemia em unidades de terapia intensiva neonatal: um problema persistente de saúde pública. *Ann Ig*, 28:282-287. doi: 10.7416/ai.2016.2107
- 10 Chakrabarti, A., Sood, P., Rudramurthy, S.M., Chen, S., Jillwin, J., Iyer, J., Sharma, A., Harish, B.N., Roy, I., Kindo, A.J., Chhina, D., Savio, J., Mendiratta, D., Capoor, M.R., Das, S., Arora, A., Chander, J., Xess, I., Boppe, A., Ray, U., Rao, R., Eshwara, V.K., Joshi, S., Pate, A., Sardana, R., Shetty, A., Pamidimukkala, U. (2020). Characteristics, outcome and risk factors for mortality of paediatric patients with ICU-acquired candidemia in India: A multicentre prospective study. *Mycoses*, 00:1-15. doi:10.3390/jof3030041

- 11 Pinhati, H.M., Casulari, L.A., Souza, A.C., Siqueira, R.A., Damasceno, C.M., Colombo, A.L. (2016). Outbreak of candidemia caused by fluconazole resistant *Candida parapsilosis* strains in an intensive care unit. *BMC Infectious Disease*, 16:433. doi: 10.1186/s12879-016-1767-9
- 12 Ghosh, A.K., Paul, S., Sood, P., Rudramurthy, S.M., Rajbanshi, A., Jillwin, T.J., Chakrabarti, A. (2015). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the rapid identification of yeasts causing bloodstream infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 21:372–378. DOI: 10.1016 / j.cmi.2014.11.009
- 13 Kaur, H., Chakrabarti, A. (2017). Strategies to Reduce Mortality in Adult and Neonatal Candidemia in Developing Countries. *Journal of Fungi*, 3(3):41. ho de 2017. doi: 10.3390 / jof3030041
- 14 Skrobik, Y., Laverdiere, M. (2013). Why *Candida* sepsis should matter to ICU physicians. *Crit Care Clin*. 2013; 29:853–64. doi: 10.1016 / j.ccc.2013.06.007
- 15 Merseguel, K.B., Nishikaku, A.S., Rodrigues, A.M., Padovan, A.C., Ferreira, R.C., Melo, A.S.A., Briones, M.R., Colombo, A.L. (2015). Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. *BMC Infectious Diseases*, 15:57. doi: 10.1186 / s12879-015-0793-3
- 16 Andersen, K.M., Kristoffersen, A.K., Ingebretsen, A., Vikholt, K.J., Ortengren, U.T., Olsen, I., Enersen, M., Gaustad. P. (2016). Diversity and antifungal susceptibility of Norwegian *Candida glabrata* clinical isolates. *Journal of Oral Microbiology*, 8(10):3402. <http://dx.doi.org/10.3402/jom.v8.29849>
- 17 Inácio, C.P, Rocha, A.P., Barbosa, R.N., Oliveira, N.T., Silva, J.C., Lima-Neto, R.G., Macedo, D.P.C., Neves, R.P. (2016). Experimental white piedra: a robust approach to ultrastructural analysis, scanning electron microscopy and etiological discoveries. *Experimental Dermatology*, 25(1), 79-81.
- 18 White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1999). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*.

San Diego, U.S.A.: *Academic Press*, 315-22. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>

19 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008). Reference method for broth dilution testing of yeasts: Approved standard third edition M27-A3. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute. https://www.clsi.org/media/1461/m27a3_sample.pdf

20 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informational supplement. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute. (Document M27-S4).

21 Caggiano, G., Lovero, G., Giglio, O., Barbuti, G., Montagna, O., Laforgia, N., Montagna, M.T. (2017). Candidemia in the Neonatal Intensive Care Unit: A Retrospective, Observational Survey and Analysis of Literature Data. *BioMed Research International*, 2017:7901763. doi: 10.1155 / 2017/7901763

22 Liu, W., Lai, C., Li, M., Wu, C., Ko, W., Hung, Y., Tang, H., Hsueh, P. (2019). Clinical manifestations of candidemia caused by uncommon *Candida* species and antifungal susceptibility of the isolates in a regional hospital in Taiwan, 2007 e 2014. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 52;612-619.

23 Xiao, Z., Wang, Q., Zhu, F., An, Y. (2019). Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and mortality risk factors of candidemia among critically ill patients: a retrospective study from 2011 to 2017 in a teaching hospital in China. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 8:89. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0534-2>

24 Tadec, L., Talarmin, J., Gastinne, T., Bretonnière, C., Miegerville, M., Le Pape, P., Morio, F. (2016). Epidemiology, risk factor, species distribution, antifungal resistance and outcome of Candidemia at a single French hospital: a 7-year study. *Mycoses*, 59:296–303. doi: 10.1111 / myc.12470

25 Fortún, J., Gioia, F. (2017). Invasive Candidiasis in the neutropenic patient. *Revista Especialista em Quimioterapia*, 30(Suppl. 1):22-25.

- 26 Peixoto, J.V., Rocha, M.V., Nascimento, R.T.L., Moreira, V.L., Kashiwabara, T.G.B. (2014). Candidíase: uma revisão de literatura. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*, 8:75-82.
- 27 Magill, S.S., Edwards, J.R., Bamberg, W., Beldavs, Z.G., Dumyati, G., Kainer, M.A., Lynfield, R., Maloney McAllister-Hollod, L., Nadle, J., Ray, S.M., Thompson, D.L., Wilson, L.E., Fridkin, S.K. (2014). Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med.*, 370:1198–208. doi: 10.1056 / NEJMoa1306801
- 28 Kullberg, B.J., Arendrup, M.C. (2015). Invasive Candidiasis. *N Engl J Med*, 373:1445–56. doi: 10.1056/NEJMra1315399
- 29 Kucukates, E., Gultekin, N.N., Alisan, Z., Hondur, N., Ozturk, R. (2016). Identification of *Candida* species and susceptibility testing with Sensititre YeastOne microdilution panel to 9 antifungal agentes. *Saudi Medical Journal*, 37(7):750–757. doi: 10.15537 / smj.2016.7.13412
- 30 Maubon, D., Garnaud, C., Calandra, T., Sanglard, D., Cornet, M. (2014). Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? *Intensive Care Medicine*, 40(9):1241-55. doi: 10.1007 / s00134-014-3404-7
- 31 Deconinck, L., Meybeck, A., Pradier, M., Patoz, P., Melliez, H., Senneville, E. (2016). Community acquired fungemia caused by *Candida pulcherrima*: diagnostic contribution of MALDI-TOF mass spectrometry. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 15:14. doi: 10.1186/s12941-016-0129-1

5.2 Artigo 2 – Submetido à Revista SENSORS AND ACTUATORS B: CHEMICAL

BREAKTHROUGH OF CLINICAL *CANDIDA* CULTURES IDENTIFICATION USING THE ANALYSIS OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS AND ARTIFICIAL INTELLIGENCE METHODS

Abstract

Infections triggered by fungi of the genus *Candida* are widely known, although the high incidence and mortality factors still unclear. The classic methods of identifying *Candida* species are subject to errors, requiring new techniques with faster and more accurate performance. We present a study for identifying fungi species by analyzing volatile organic compounds of cultures acquired and interpreted using Electronic Nose and Artificial Intelligence methods. The proposed approach contributes to establishing an agile and appropriate treatment, reducing the complications in the disease and deaths. We perform experiments with three species of *Candida* obtaining accuracy above 90% in the fungi identification. Therefore, future works are encouraged to deal with more fungus to help create a new identification methodology faster and reliable using artificial intelligence methods.

Keywords: Fungi species identification, Volatile Organic Compounds, Artificial Intelligence, Pattern Recognition, ElectronicNose.

1. Introduction

The healthcare-related fungal infections caused by *Candida* have led to high mortality rates, around 70% of the cases depending on the patient conditions [1, 2, 3]. Although this infection is widely known, the reasons for the high incidence and mortality are still unclear [4, 5]. The suspected reasons are related to the characteristics of patients, late treatment, and intrinsic factors of the species [6, 7].

Candida species, mainly *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. krusei*, are the most present in serious infections that affect humans [8, 7, 9]. *Candida* isolates identification is performed most of the time, using classic phenotypic methods and physiological patterns

[10], take time and imprecise results [11, 10, 9]. Although more sophisticated methods, such as radiographic, molecular, and proteomic techniques, are being implemented in research of accurate identification for a quick and safe diagnosis [5, 12], they can be expensive and laborious. This shows that *Candida* infection diagnostic confirmation is still a challenge [5], and it is necessary to investigate new fungi identification approaches that are more effective, faster, and with economic viability. The use of Artificial Intelligence (AI) and Electronic Noses in fungi identification is emerging as a promising alternative [13, 14].

Volatile Organic Compounds (VOCs) analysis systems (also called Electronic Noses) are designed to detect and discriminate complex odors using a set of physical-chemical sensors. They are inspired by the biological process of odor interpretation, working similarly with sensors that replace the receptors of the human nose transmitting a signal to software that performs the sample inference, simulating the brain interpretation of the olfactory signs [15]. Since the mid-1980s, the concept of the Electronic Nose has been discussed by many authors, and several prototypes have been created and tested for different types of chemical sensors [16]. These devices have been used in several areas, increasingly adopted as alternatives to traditional methods, with applications in the medical, agriculture, food quality, beverage quality, and air quality fields [17, 18, 19].

Usually, Electronic Noses are built with an array of chemical sensors based on metal oxide materials (MOS) that cannot identify the substances separately in each sample. The data obtained with such sensors may be analogously compared to a fingerprint since it is challenging to find two different substances with the same pattern read by the sensor array. In other words, it is possible to classify substances according to their olfactory pattern [20, 18]. These devices usually have three parts: sensor array, signal processing unit, and pattern recognition. Such three parts simulate, respectively, the acquisition of information by sensory neurons of the human olfactory receptor, the encoding of the olfactory nerve (bulb), brain memory, and information processing by the human olfactory system [17, 18].

The use of AI methods to recognizing patterns has been used in diverse areas with robust results [14]. From data or observations, AI methods can learn to recognize (discover)

an existing pattern. In this way, it is possible to build an automated computer system to recognize patterns about a given domain. Considering the *Candida* infection diagnostic confirmation domain, it is possible to train (develop) AI models to recognize patterns related to each species and build computer systems that provide greater efficacy to help such diagnoses. Data gathering associated with the diagnosis of *Candida* infection can proceed by analyzing VOCs of different species.

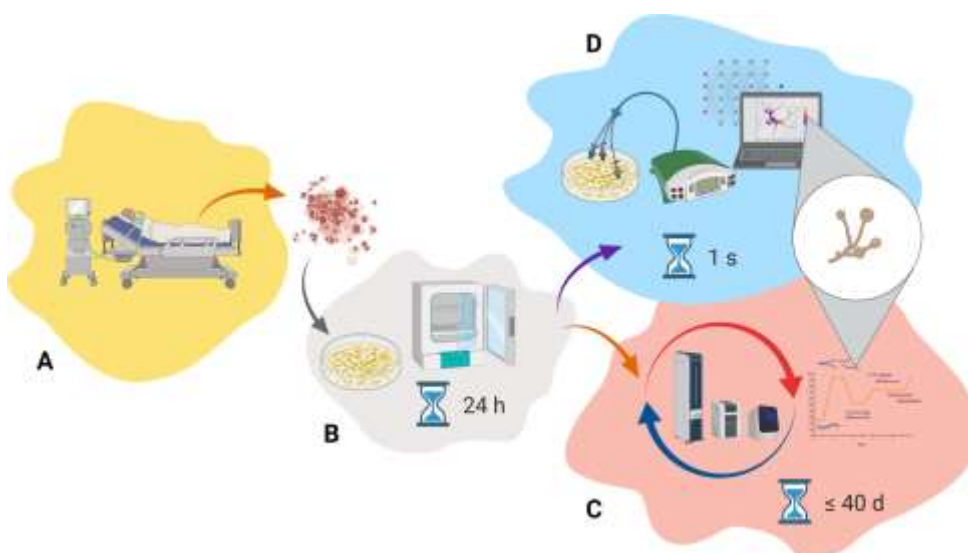


Figure 1. **Illustration of the fungal infection diagnosis.** The process starts collecting a sample from the patient (panel A). The sample is seeded in Petri dishes with a Sabouraud agar medium kept at a 37° C temperature for 24 hours (panel B). The standard approach uses biochemical methods to evaluate the prepared sample in a process that can take up to 40 days of analysis to diagnose. Another recent hi-tech approach is based on mass spectrometry by MALDI-TOF techniques that achieve *Candida* identification within 24 hours, but it is still very expensive (panel C). The proposed approach analyzes the volatile organic compounds of the prepared samples acquired and interpreted using Electronic Nose and Artificial Intelligence methods, making a diagnosis in less than 1 second (panel D).

VOCs analysis requires a device with specific sensors that have advantages over traditional techniques. These devices can be cheaper, easy to use, and with quick responses,

leading to the implementation of early treatment leading to faster recovery of the patient [21, 13]. From *Candida* species culture, it is possible to use sensors that convert the VOCs into digital signals over time. The digital signals represent the data to AI methods to learn the dynamics of each *Candida* species' released volatile or VOCs digital signature.

In Figure 1 we present an illustration of the fungal infection diagnosis considering the standard approach that commonly uses mass spectrometry techniques in a quantitative approach to diagnosing the type of infection in a repetitive process that can last days depending on the case. This study aims to present a quick, simple, and accurate way to changes the diagnosis approach to obtain accurate results in minutes using sensors for VOCs analysis with advanced Artificial Intelligence methods.

We built a new electronic nose composed of sensors and Artificial Intelligence software for rapid VOCs analysis. To evaluate the proposed approach, we create two new datasets. The first one is composed of standards *Candida* samples manufactured by ATCC¹. The second dataset comprises culture samples from patients diagnosed with candidemia who stayed for a long time in intensive care units.

To evaluate the performance of the proposed pipeline combining hardware and software, we present different strategies for data analysis, data visualization, and classification approaches to deal with the rapid *Candida* species classification. The following sections explain the used Materials and Methods, the Experiments, Results, and Discussions.

2. Materials and Methods

The methodology used in this study can be divided into five stages: electronic nose construction, execution of the experimental protocol, data analysis, and development of AI methods to recognizing the patterns.

2.1. Electronic nose construction

Electronic nose construction was divided into the following parts: materials and sensors definitions, assembly and organization of components, development of software for data collection, and development of the protocol for collecting data from fungal cultures. The choice of materials prioritized those with low interference in the air samples to be collected.

Since the domain involves VOCs analysis, it is essential to guarantee low adsorption, that is, the non-adherence of the molecules to the solid surfaces. Thus, the equipment consists of components made of PTFE, glass, and stainless steel. The sensor array consists of sensors for humidity, temperature, and the detection of organic solvent vapors. The TGS 822 sensor manufactured by Figaro Inc. was adopted, which has high sensitivity, reliability, and stability for organic solvent vapors with operation up to 5000ppm. Several sensors on the market can be applied to VOCs. However, we prioritized the construction of low-cost equipment with few sensors.

The physical components of the electronic nose are shown in Figure 2. The proposed approach considers an arrangement to sample analysis without external interference or interference between samples.

The hardware for acquiring data from the sensors is an AVR Atmega328 microcontroller with a 12 bits signal converter and oversampling algorithm. The data generated by the sensors are represented in resistance values in Ohm (ω). The software developed is responsible for collecting the data during a specified time interval or throughout the entire experiment. For the domain of *Candida* VOCs signature recognition, we carried out different experiments to define the data collection protocol. The experimental protocol establishes disposable syringes and PTFE filters for each sample in a Petri dish. The needle and the PTFE filter are at the top of the Petri dish and are used to draw approximately 40mL of air volume from the sample. The syringe contents are then injected into the sensor chamber, sealed by activating the valves, remaining for 60 seconds. The electronic nose software collects data during the entire air suction process with the syringe and injection into the sensor chamber for further analysis. After 60 seconds, the internal atmosphere of the sensor chamber is aspirated, and the filtered air is simultaneously injected until the electrical signal from the sensors returns to the operating baseline.

2.2. Experimental protocol execution

We follow the created experimental protocol and the previous preparation of standard samples of *C. albicans* **ATCC 90028**, *C. parapsilosis* **ATCC 22019** and *C. krusei*

ATCC 6258 in Petri dishes with Sabouraud **dextrose** agar medium (DIFCO), kept at a 37° C temperature for 24 hours. The device requires a clean environment with a 27° C temperature for operation. The disinfection of the environment where the device is used occurred 12 hours before its operation, and, afterward, the device was calibrated. After 20 minutes of operation, the electronic nose is ready to operate. The materials used to collect air samples and the PTFE filter are disposable to prevent inaccurate results. The air sample was collected from the inside of the Petri dish by aspiration and injected into the sensor chamber, remaining there for 60 seconds to capture the digital signals. The sensors used are Taguchi gas sensors (TGS) series with a tin dioxide (SnO₂) semiconductor as a sensing element. Moreover, sensors for temperature and humidity were also used.

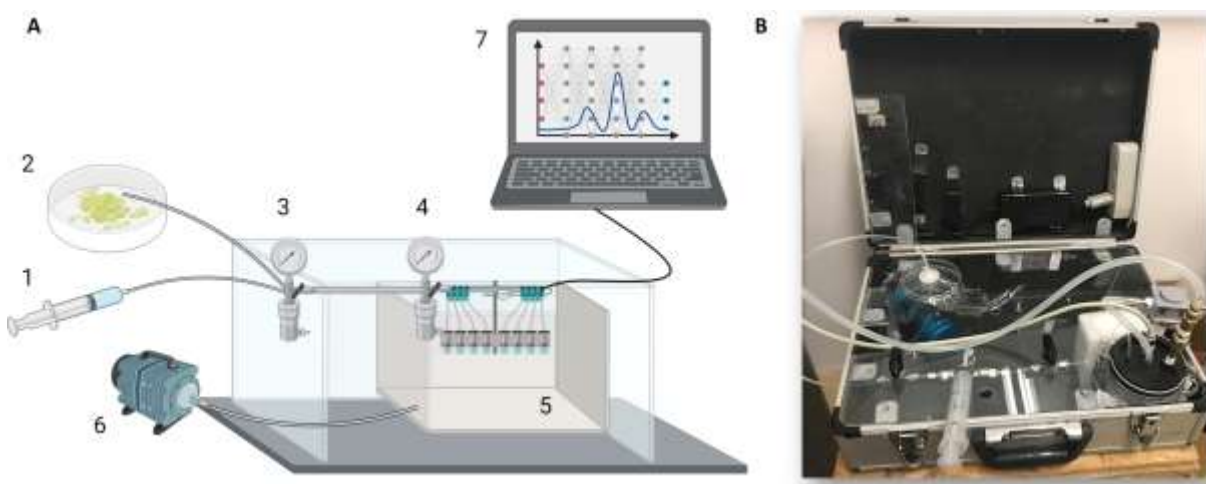


Figure 2. **A) Items of the electronic nose.** The electronic nose has a manual suction and injection device (item 1) of a certain air volume from a sample presented in a Petri dish (item 3). Items 2.1 and 2.2 are control valves for the collection and injection of air volume through item 1. The sample collection starts with the opening of valve 2.1 and aspiration of the air volume of item 3. Afterward, valve 2.1 is closed, followed by the opening of valve 2.2 to inject the air sample in the VOC analysis chamber (item 4). Once the air volume is injected into the VOC analysis chamber, the sensors (installed in the chamber, item 4) generated data through the interaction on its surface with molecules converting them to digital signals sending to a computer system, item 5. Finally, item 6 is activated, representing a chamber cleaning device by removing the stored air and injecting filtered air without VOCs. **B) Photography of the real electronic nose in the transportation case.**

In this study, we first create a dataset from *Candida* samples standards manufactured by ATCC² to develop a fast recognition process of the fungi. The dataset, called standard, is composed of signals collected from ten strains of each species (*Candida albicans*, *C. krusei* and *C. parapsilosis*). For each of the 30 cultures, 12 digital signals were collected and stored

with the corresponding *Candida* species labels. A digital signal is composed of 60 points exposed over 60 seconds to the sensors. In other words, with air from the sample injected into the chamber, we measure and store the interaction of molecules with the sensor for over 60 seconds. In this way, the standard dataset has 360 digital signals or observations with 60 points each and three labels representing the *Candida* species.

A second dataset was created using culture samples from patients diagnosed with candidemia who stayed for a long time in intensive care units. All samples used in this study were released with the authorization of the Ethical Committee of the Federal University of Pernambuco (UFPE), and all personal data were preserved. The second dataset, called non-standard, has the same *Candida* species as the standard dataset. We create the dataset with 519 digital signals following the same protocol as the standard dataset. The non-standard dataset has 201 signals from *Candida albicans*, 198 from *C. parapsilosis*, and 120 from *C. krusei*. Our primary aim is to create a fast *Candida* species identification method using the standard dataset and assess it on the non-standard dataset.

2.3. Machine Learning approaches

We perform an exploratory data analysis to summarize the main characteristics of the created datasets using statistical graphics and other data visualization methods. First, we used the t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) method [22] for visualizing the high-dimensional data by giving each data point in a two-dimensional map. Second, we used the Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP), a dimension reduction technique that can be used for visualization similarly to t-SNE, but also for general nonlinear dimension reduction [23].

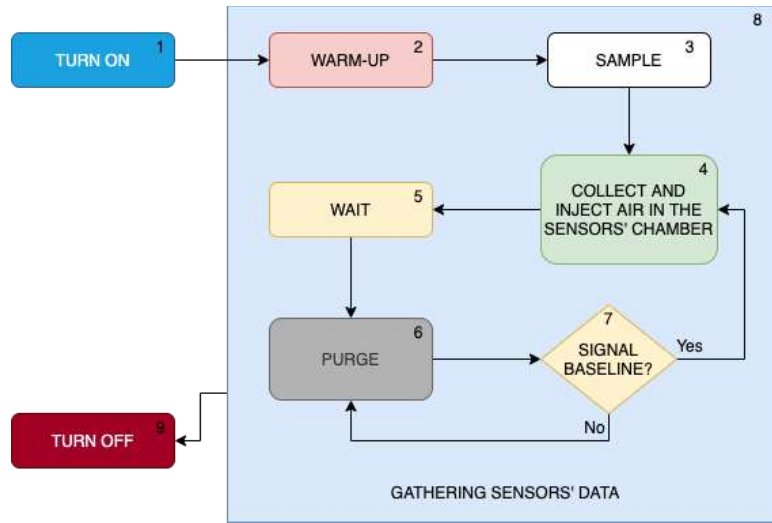


Figure 3. **Data acquisition flowchart from a sample presented to the electronic nose** First step (1) is to turn on the device and (2) wait until the sensor's signals reach a baseline that usually occurs within 20 minutes. With the sample presented in a Petri dish (3), approximately 40 milliliter of air is aspirated and injected into the sensors' chamber (4). The air mass aspirated remains for 60 seconds (5) in the sensors' chamber to promote the VOCs' interaction with the sensor's surface. After wait (5), the chamber is purged for more than 60 seconds (6) or until the signals reach the baseline (7). If the signals reach the baseline, a new air mass could aspire from the sample dish again. The data gathering occurs continually from steps two until seven. All the time windows and the air volumes are defined based on many tests performed to calibrate the electronic nose for the fungi identification problem domain.

To build a classification pipeline for identifying *Candida* species, we evaluate different Machine Learning approaches: Naive Bayes, Gaussian Processes, Nearest Neighbors, Semi-Supervised Learning, Linear Models, Probability Calibration, Support Vector Machines, Neural network, Discriminant Analysis, Decision Trees and Ensemble Methods.

We also investigate the Automated Machine Learning (AutoML) method [24], which is the process of automating the tasks of applying machine learning to real-world problems. AutoML covers the complete pipeline from the raw dataset to the deployable Machine Learning model. We used Google Colab³ to perform the experiments in a computer with Intel(R) Xeon(R) CPU@2.00GHz, 26GB of Memory, and GPU Tesla V100-SXM2 with 16GB of Memory.

3. Experiments and Results

3.1. Data analysis

The created datasets are related to *Candida* cultures from standards and non-standards samples of three species. The first dataset has 360 signals and the second 519 signals. Each signal corresponds to 60 points and labels of *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, and *C. krusei*. The signals captured the molecule's interaction levels with the TGS surface expressed in Ohm. The magnitudes present in signals over time are inversely proportional to the interaction levels. The operation baseline of the developed equipment occurs when the TGS signal magnitude reaches 34k Ohm. In this study, signals from temperature and humidity sensors were considered irrelevant due to remain stable over the culture samples time analyses.

Figure 4 presents some basic statistics of the collected data. From panels A and B, it is possible to verify the difference in the variance among the three *Candida* species between the standard and non-standard samples. Besides the samples are from the same class, the distribution is different based on the origin of the data. Panel C) combines the standard and non-standard and shows the variation of the readings concerning the response variable. It is possible to verify that the sensors are sensitive to small variations or noise and demand robust classifiers.

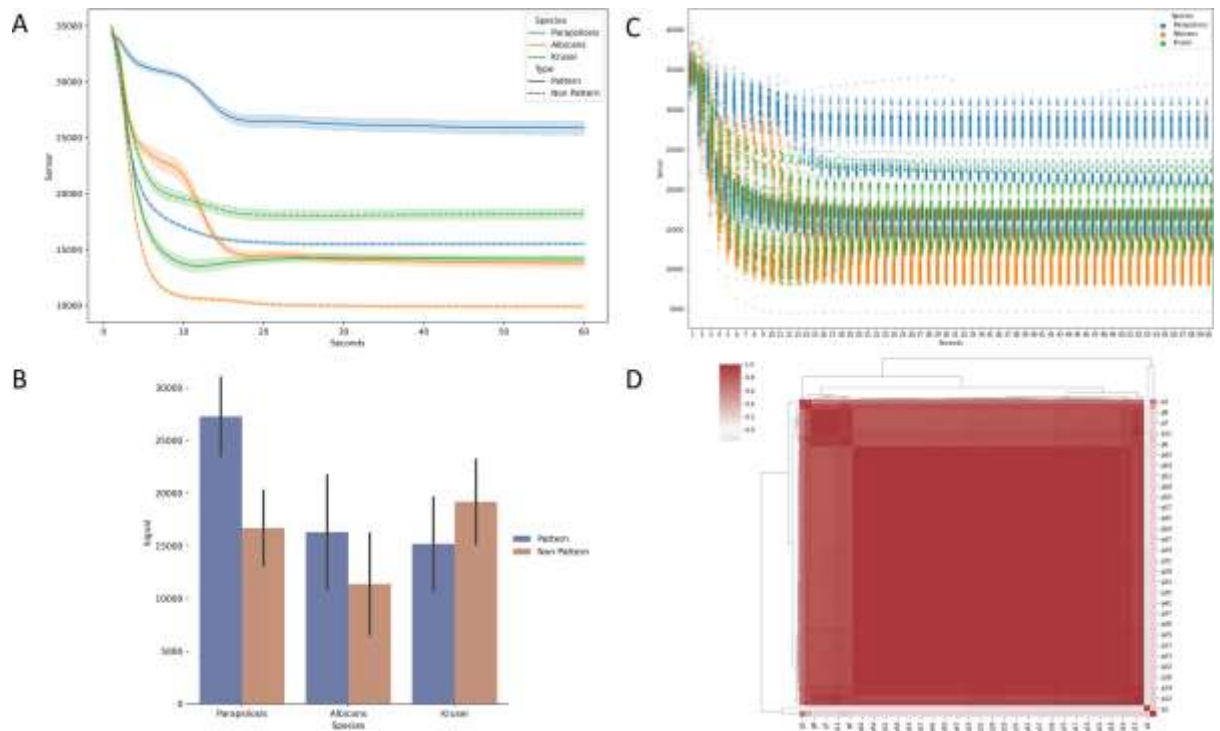


Figure 4. **Statistics of the collected data.** **A)** Time variance of the sensors. **B)** Variance of the data from standard and non-standard samples of three species. **C)** Variation of the readings in relation to the response variable in the combined dataset (standard and non-standard). **D)** Correlation between signals of the combined dataset (standard + non-standard).

Panel D presents the hierarchically clustered heatmap between the signals of all sensors over time. Some sensors as P1 and P3 are more correlated. It is possible to verify five significant groups of sensors among the 60 existing sensors from the dendrogram. Figure 5 explores the visualization of the sensors using the UMAP and t-SNE approaches.

Dimensionality reduction helps to visualize and understand large and high dimensional datasets. One of those algorithms is called t-SNE (t-distributed Stochastic Neighbor Embedding). The t-SNE is an approach for nonlinear dimensionality reduction. It is an iterative method, so unlike PCA, you cannot apply it to another dataset. PCA uses the global covariance matrix does reduce data. You can get that matrix and apply it to a new set of data with the same result. That's helpful to reduce the feature list and reuse the matrix created from train data. t-SNE is mainly used to understand high-dimensional data and project it into low-dimensional space.

The t-SNE separates groups quite well but does not preserve the global structure of information. As a sample, you cannot take three data points and say two are closer than the other two. It does not preserve distance. Local structures may make sense. Furthermore, its performance degrades with large datasets and fine-tuning the method can be challenging.

The UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction) approach, on the other hand, notably increased speed and better preservation of the data's global structure. UMAP constructs a high-dimensional graph representation of the data then optimizes a low-dimensional graph as structurally similar. While the mathematics UMAP uses to build the high-dimensional graph is advanced, the intuition behind them is remarkably simple.

In order to construct the initial high-dimensional graph, UMAP builds a representation of a weighted graph, with edge weights representing the likelihood that two

points are connected. UMAP extends a radius outwards from each point to determine connectedness, connecting points when those radii overlap. Choosing this radius is critical - too small a choice will lead to small, isolated clusters, while too wide a choice will connect everything. UMAP overcomes this challenge by choosing a radius locally, based on the distance to each point's n th nearest neighbor. UMAP then makes the graph by decreasing the likelihood of connection as the radius grows. Finally, by stipulating that each point must

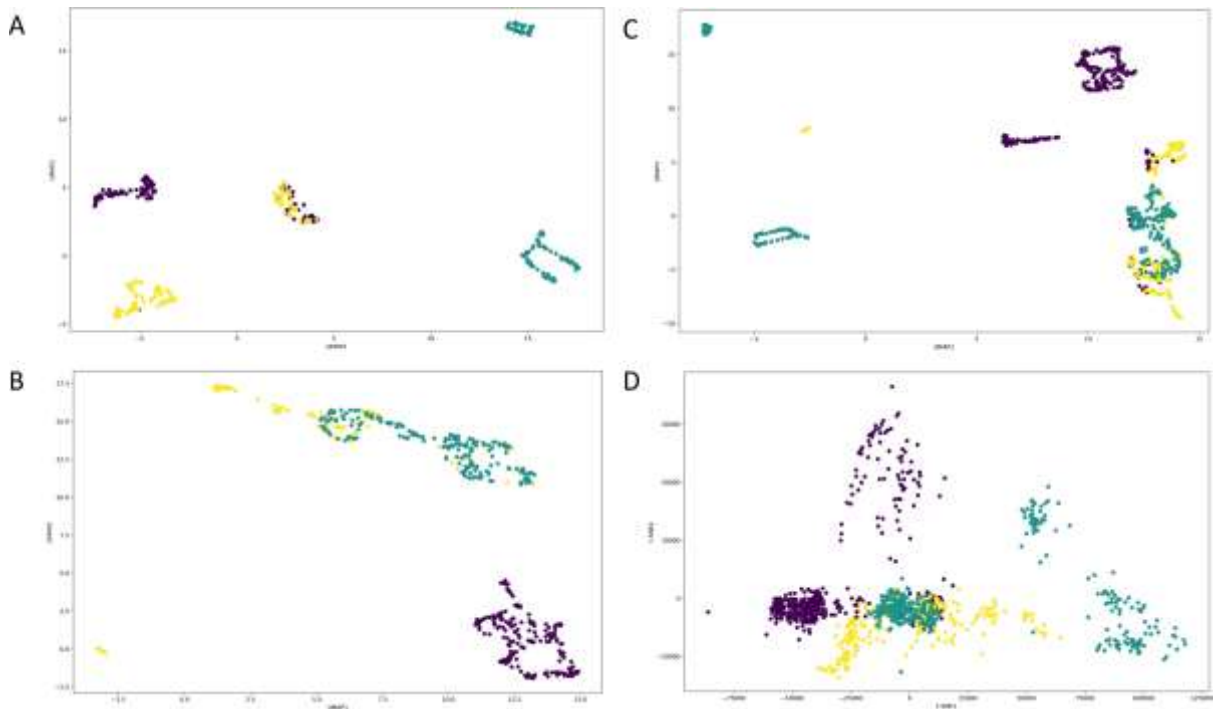


Figure 5. Data visualization of the Standard and Non-Standard datasets. **A)** Visualisation of the Standard dataset through dimension reduction using the UMAP technique. **B)** Visualisation of the Non-Standard dataset through dimension reduction using UMAP. **C)** Visualisation of the combination of Standard and Non-Standard datasets through dimension reduction using UMAP. **D)** Visualisation of the combination of Standard and Non-Standard datasets through dimension reduction using the t-SNE technique. The difference between the data distribution from Standard and Non-Standard datasets is evident in this visualization. Even nonlinear dimension reduction approaches have difficulty separating the data clusters. The performance of UMAP is better than t-SNE when considering the complexity of the combined datasets.

be connected to at least its closest neighbor, UMAP ensures that local structure is preserved in balance with global structure. makes the graph by decreasing the likelihood of connection as the radius grows. Finally, by stipulating that each point must be connected to at least its closest neighbor, UMAP ensures that local structure is preserved in balance with global structure.

Figure 5 presents the data visualization of the Standard and Non-Standard datasets. Panels A, B, and C show the data visualization using UMAP for Standard, Non-Standard, and combined datasets. Panel D the visualization of the combined dataset using t-SNE.

3.2. Classification results and discussions

We evaluate different machine learning approaches for identifying *Candida* species. Panel A presents the performance of the models using five cross-validations. We evaluated 28 classifiers divided between the categories of Naive Bayes, Gaussian Processes, Nearest Neighbors, Semi-Supervised Learning, Linear Models, Probability Calibration, Support Vector Machines, Neural network, Discriminant Analysis, Decision Trees and Ensemble Methods.

Figure 6 - Panel A.1 presents the performance of the models trained and tested on the standard dataset. Panel A.2 shows the performance of the models on the non-standard dataset. In Panel A.3, the models were trained and tested in the combined version of the standard and non-standard datasets. Panel A.4 evaluates the strategy of training the models using the standard dataset and testing using the non-Standard dataset.

The performance of the models in the Standard dataset (Panel A.1) is promising in most approaches, with an average accuracy of $74\% \pm 19$. The variation of the results is high, primarily because of some methods as Gaussian Mixture with low performance in all datasets. The median of these results is 82% of accuracy and better reflects the model's performance.

Panel A.2 shows the performance of the methods on the Non-Standard dataset. The distribution of results was quite the same as using the Standard dataset, with an average of $73\% \pm 18$ and a median of 83% of accuracy. Combining the datasets (Panel A.3), the perfor

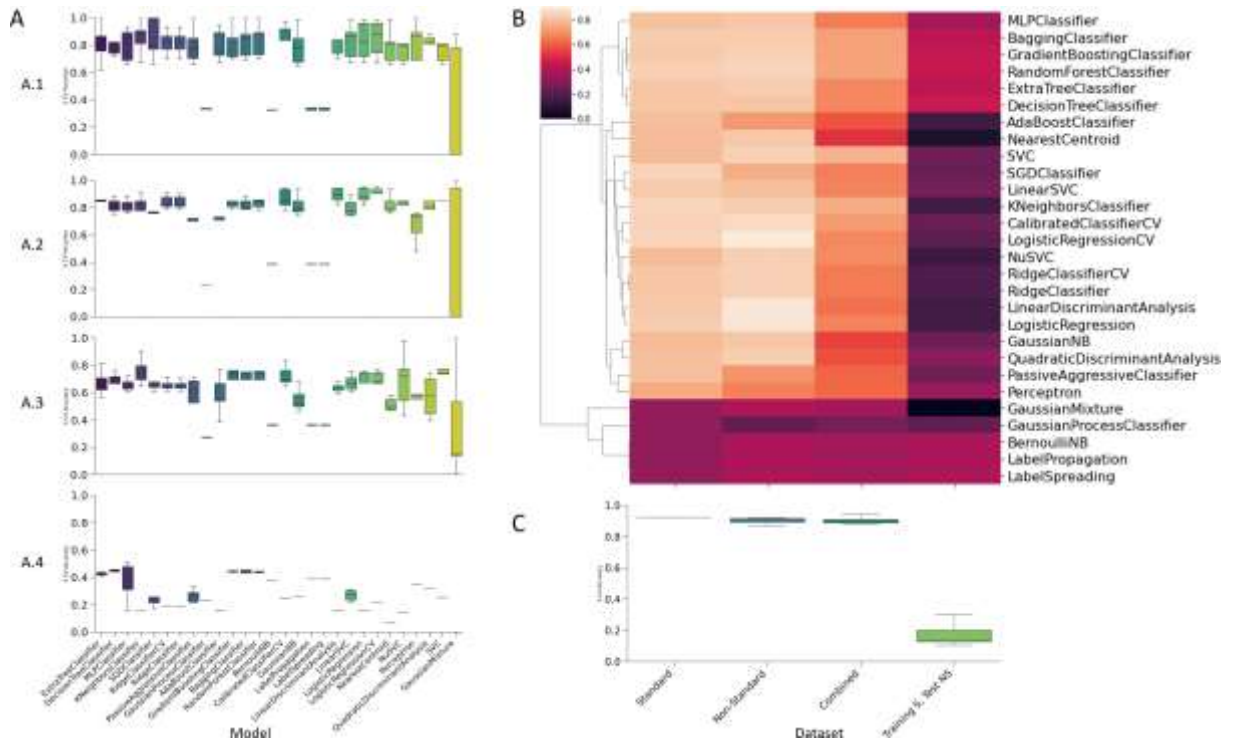


Figure 6. **Experiment results.** **A)** Performance of the classifiers considering different partitions of the datasets: A.1) Training and Testing on Standard dataset; A.2) Training and Testing on Non-Standard dataset; A.3) Training and Testing in the combined version of Standard and Non-Standard datasets; A.4) Training using the Standard dataset and Testing using Non-Standard dataset. **B)** Performance of the classifiers grouped by classification error considering the different datasets. Multilayer Perceptron, ensemble methods, and Decision Trees presented the best performances. **C)** Performance of AutoML approach on the different datasets.

mance of the classifiers decreased, as the distribution of the signals is different for the same classes among the Standard and Non-Standard datasets. The average performance for the combined dataset is $60\% \pm 14$ and a median of 65% of accuracy.

The last experiment considers using the Standard dataset as training samples and the Non-Standard dataset as testing. As Standard samples are more accessible to obtain and more trustable than the samples from patients, the idea is to use the Standard data to create the solution. The Non-Standard data is used as validation data to verify the performance of the device in real data. However, the difference in the data distribution among Standard and Non-Standard samples compromised the performance of the classifiers. The average, in this case, is $26\% \pm 12$ and a median of 25% of accuracy. The mean performance of the classifiers

is inadequate because the chance for a random guess for this problem is 33%. Although, some classifiers still find interesting results as MLP and Ensemble methods.

Figure 6 in Panel B presents a visualization of the performance of the classifiers in the four datasets using a heatmap. It is possible to verify the groups of classifiers with better performance. The ensemble classifiers and Multilayer Perceptron classifier are more robust than other approaches. The Gaussian, Semi-Supervised and Naive Bayes presented the worst performance.

Panel C presents the average results of the Automated Machine Learning - AutoML approach applied to the different datasets. AutoML provides methods and processes to make Machine Learning available for non-Machine Learning experts, improve Machine Learning efficiency, and accelerate research on Machine Learning. The AutoML pipeline allows automating the preprocess, cleaning the data, selecting and constructing appropriate features, selecting a proper model family, optimizing model hyperparameters, post-process machine learning models, and critically analyzing the results.

The AutoML presented the best results considering all datasets. Different from previous approaches, AutoML obtained similar results in the Standard, Non-Standard and Combined datasets. The average performance for the Standard dataset is $92\% \pm 2$ and a median of 92% of accuracy. The average performance for the Non-Standard dataset is $90\% \pm 2$ and a median of 92% of accuracy. In the Combined dataset, the average performance is $90\% \pm 2$ and a median of 89% of accuracy.

The performance training in the Standard dataset and testing in the Non-Standard dataset is still not good, with an average performance of $17\% \pm 7$ and a median of 13% of accuracy. Based on the outstanding performance of AutoML in the previous datasets, these results suggest it is a challenging problem.

Figure 7 presents a visualization of the pipeline built by the AutoML approach for the Standard dataset. The best model is class balancing using a weighting strategy. The second-best approach uses numerical transformations and Random Forest as a classifier. Combining

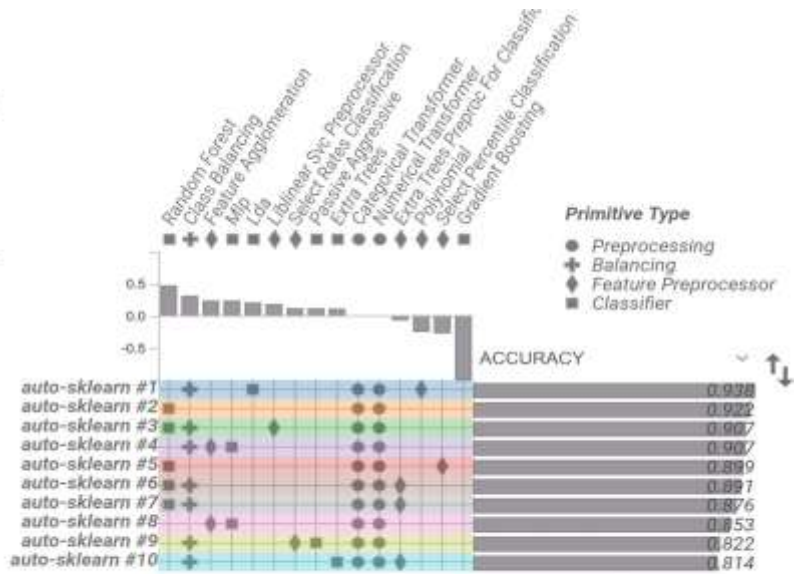
numeric transformation, class balancing, random forest, selected rules, and passive-aggressive strategies obtained the best average performances for all datasets.

1) Primitive Contribution

2) Pipeline Matrix

Rows: pipelines

Columns: primitives / params



3) Pipeline Comparison

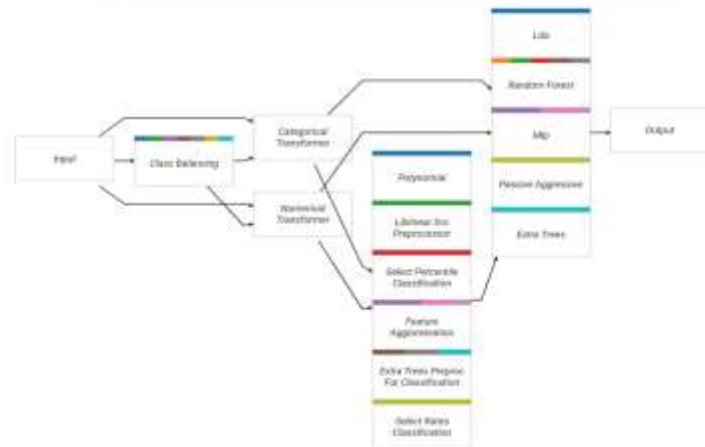


Figure 7. **PipelineProfiler applied to analyze the classification pipelines generated by AutoML on the Non-Standard dataset.** The pipeline has three parts. 1) The primitive contribution, showing the correlation of primitive usage with the pipeline scores. 2) The Pipeline Matrix, presenting a summary of the pipelines, the primitives used, and the hyperparameters. 3) The Pipeline Comparison view, highlighting the differences among selected pipelines.

The results showed that using the AutoML approach can achieve good performances to classify fungi species considering all datasets. On the other hand, using the standard dataset to create machine learning methods to classify the non-standard dataset is challenging, mainly due to the available data. Furthermore, the data acquisition is a manual process of managing the hardware components to aspire, waiting, and purge, then, a hard task to be performed. Therefore, manual data acquisition contributes to not getting enough data to train the machine learning methods to perform better than presented. Nevertheless, the results achieved with the presented approach encouraging the continuity of the research focusing on increasing the fungi species number, improve the data acquisition process to get more data, and using the recent advances of machine learning methods as deep learning models.

4 Conclusion

The electronic nose technology has enabled the use of this tool for the early and invasive diagnosis of diseases[21]. This paper presented a study for the fungi species identification through VOCs analysis using an electronic nose and Artificial Intelligence methods. Three *Candida* species were considered in this study *C. albicans*, *C. parapsilosis*, and *C. krusei*. An electronic nose was developed with sensors for data acquisition of VOCs, temperature, and humidity from the samples. The data acquisition was performed from the cultures of *Candida* species mentioned considered standard and non-standard samples. In an overall results analysis, we can establish that it is possible to perform the fungi species identification with the presented methodology, which achieved a high accuracy rate of 92%.

The proposed methodology can be used with a new method to help fungi species identification in faster, accurate, and automatic ways compared to existing identification methods. This would be possible because a new sample with no species identification could be presented to the electronic nose generating a set of data sent to the machine learning method, which would respond with the right species in seconds. This methodology could help the fungi species identification fast to help the appropriate clinical decision to handle intensive care units. In addition to being a low- cost, easy-to-handle, and moving device, once data is presented to the learning algorithms and trained with samples from several different *Candida* cultures, it will distinguish the species. What does not happen in some conventional techniques, identifying only the yeast. Hence, denoting the importance of improving this robust technique for the *Candida* species identification, which is important for diagnosis and the epidemiological control of these fungi of worldwide relevance. The presented results encouraging the research continuity to improve the whole methodology due to some drawbacks related to the manual data acquisition process, the number of fungi species and samples of them and, more sensors for different purposes to be integrated into the electronic nose.

References

- [1]C. Silva, A. Carvalho-Parahym, D. Macêdo, R. Lima-Neto, E. Francisco, M. Melo, A.S.A.; Silva, M. Jucá, L. Mello, R. Amorim, R. Neves, Neonatal candidemia caused by *candida haemulonii*: Case report and review of literature, *Mycopathologia* 180 (1) (2015) 1573–0832.
- [2]A. Doi, A. Pignatari, M. Edmond, A. Marra, L. Camargo, R. Siqueira, V. da Mota, A. L. Colombo, Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a brazilian national surveillance program., *PLoS One* 11 (1) (2016) .
- [3]P. Pappas, M. Lionakis, M. Arendrup, L. Ostrosky-Zeichner, B. Kullberg, Invasive candidiasis, *Nature reviews. Disease primers* 11 (4) (2018).
- [4]J. Peixoto, M. Rocha, R. Nascimento, V. Moreira, T. Kashiwabara, *Candidíase: uma revisão de literatura*, *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research* 8 (2) (2014) 75–82.

- [5]M. Pfaller, D. Wolk, T. Lowery, T2mr and t2candida: novel technology for the rapid diagnosis of candidemia and invasive candidiasis, *Future microbiology* 11 (1) (2016) 103–117.
- [6]J. Guinea, Global trends in the distribution of candida species causing candidemia, *Clinical Microbiology and Infection* 20 (2014) 5–10.
- [7]D. Li, R. Xia, Q. Zhang, C. Bai, Z. Li, P. Zhang, Evaluation of candidemia in epidemiology and risk factors among cancer patients in a cancer center of china: an 8-year case-control study, *BMC Infectious Diseases* 17 (1) (2017) 536.
- [8]H. Pinhati, L. Casulari, A. Souza, R. Siqueira, C. Damasceno, A. Colombo, Outbreak of candidemia caused by fluconazole resistant *Candida parapsilosis* strains in an intensive care unit, *BMC Infectious Disease* 16 (1) (2016) 433.
- [9]D. S.C., R. Shahriar, Identification of *candida* species: Conventional methods in the era of molecular diagnosis, *Annals of Microbiology and Immunology* 150 (16) (2018) 1–6.
- [10] K. Merseguel, A. Nishikaku, A. Rodrigues, A. Padovan, R. Ferreira, A. Melo, M. Briones, A. Colombo, Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 15 (1) (2015) 57.
- [11] A. Colombo, M. Garnica, L. Aranha Camargo, C. Da Cunha, A. Bandeira, *Candida glabrata*: an emerging pathogen in brazilian tertiary care hospitals, *Medical Mycology* 51 (1) (2012) 38–44.
- [12] E. Kucukates, N. Gultekin, Z. Alisan, N. Hondur, R. Ozturk, Identification of *Candida* species and susceptibility testing with sensititre yeastone microdilution panel to 9 antifungal agents, *Saudi medical journal* 37 (7) (2016) 750–757.
- [13] Z. Suchorab, M. Frąc, L. Guz, K. Oszust, G. Łagód, A. Gryta, N. Bilińska-Wielgus, J. Czerwiński, A method for early detection and identification of fungal contamination of building materials using e-nose, *PloS one* 14 (4) (1963) .
- [14] S. Russell, P. Norvig, *Artificial Intelligence: a modern approach*, 4th Edition, Prentice Hall Press, 2020.
- [15] H. Lisboa, T. Page, C. Guy, *Odor management: fundamentals of electronic nose*,

- Engenharia Sanitaria e Ambiental 14 (1) (2009) 9–18.
- [16] G. Martins, identificação de plásticos comerciais por meio de um nariz eletrônico baseado em polímeros condutores, Master's thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo, BRA (2011).
- [17] C. Huang, C. Zeng, Y. Wang, H. Peng, C. Lin, C. Chang, H. Yang, A study of diagnostic accuracy using a chemical sensor array and a machine learning technique to detect lung cancer, *Sensors* 18 (9) (2018).
- [18] H. Voss, L. Stevan, R. Ayub, Peach growth cycle monitoring using an electronic nose, *Computers and Electronics in Agriculture* 163 (2019) 104–118.
- [19] J. Zhang, Y. Xue, Q. Sun, T. Zhang, Y. Chen, W. Yu, Y. Xiong, X. Wei, G. Yu, H. Wan, P. Wang, A miniaturized electronic nose with artificial neural network for anti-interference detection of mixed indoor hazardous gases, *Sensors and Actuators B: Chemical* 326 (2021) 128–222.
- [20] D. M. Pineda, J. C. Pérez, Senose: An under u\$50 electronic nose for the monitoring of soil gas emissions, *Computers and Electronics in Agriculture* 133 (2017) 15–21.
- [21] A. Wilson, Advances in electronic-nose technologies for the detection of volatile biomarker metabolites in the human breath, *Metabolites* 5 (1) (2015) 140–163.
- [22] L. van der Maaten, G. Hinton, Visualizing data using t-SNE, *Journal of Machine Learning Research* 9 (2008) 2579–2605. URL <http://www.jmlr.org/papers/v9/vandermaaten08a.html>.
- [23] L. McInnes, J. Healy, N. Saul, L. Großberger, Umap: Uniform manifold approximation and projection, *Journal of Open Source Software* 3 (29) (2018) 861. doi:10.21105/joss.00861. URL <https://doi.org/10.21105/joss.00861>.
- [24] F. Hutter, L. Kotthoff, J. Vanschoren (Eds.), *Automated Machine Learning: Methods, Systems, Challenges*, Springer, 2018, in press, available at <http://automl.org/book>.

6 CONCLUSÕES

- Entre as espécies de *Candida* identificadas nesse estudo, *C. albicans* e *C. tropicalis* foram as mais prevalentes, sendo *C. albicans* também o principal agente responsável pela mortalidade.
- As principais condições predisponentes ao surgimento da candidemia na UTI foram idade juvenil, antibioticoterapia de largo espectro, imunossupressão, doenças de base preexistentes e neutropenia.
- Mais de 80% dos isolados de *Candida* foram sensíveis ou suscetíveis dose-dependente a anfotericina B, fluconazol, voriconazol e as equinocandinas. Mas identificamos cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* resistentes a este fármaco e resistência de isolados de *C. parapsilosis* e *C. krusei* a anidulafungina.
- Apesar dos avanços clínicos no suporte de paciente crítico, a candidemia ainda é de difícil diagnóstico, sendo a identificação das espécies crípticas de *Candida* em nosso estudo realizada de forma satisfatória pela espectrometria de massas (MALDI-TOF MS).
- Foi desenvolvido um dispositivo (Nariz Eletrônico) composto por um sensor, associado a métodos de Inteligência Artificial, capaz de captar os compostos orgânicos voláteis presentes nas amostras de ar de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, distinguindo estas espécies.
- A metodologia proposta com o nariz eletrônico pode ser usada como um novo método para auxiliar na identificação de espécies de fungos de forma mais rápida, precisa e automática em comparação aos métodos de identificação existentes. Uma vez que os dados são apresentados aos algoritmos de aprendizagem e treinados com amostras de diversas culturas de *Candida*, ele vai diferenciar as espécies. Além de ser um dispositivo de baixo custo, fácil de manusear e móvel.
- Estes dados mostram a importância de dar continuidade nas pesquisas para aumentar o número de espécies de fungos, melhorar o processo de aquisição de dados para obter

mais dados e usar os avanços recentes dos métodos de aprendizado de máquina como modelos de aprendizado profundo integrados ao nariz eletrônico.

REFERÊNCIAS

- Alburquenque, C., Beltrán, S., Olivares, R., Falconer, M.A., Amaro, J., Fuentes, M., Tapia, C.V. 2013. Distribución de especies y perfil de susceptibilidad de aislados de *Candida* spp: la importancia de vigilar también cepas de la comunidad. *Revista Chilena de Infectologia* 30(3):244–251.
- Alcazar-Fuoli, L., Mellado, E. 2014. Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice. *British Journal of Haematology*, 166 (4):471–484.
- Andrade, A.L.S.S., Zicker, F. 1997. Métodos de investigação epodemiológicas em doenças transmissíveis. Organização Pan-Americana de Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 1 ed., Brasília.
- Azoulay E, Dupont H, Tabah A, Lortholary O, Stahl JP, Francais A, et al. Terapia antifúngica sistêmica em pacientes criticamente enfermos sem infecção fúngica invasiva *. *Crit Care Med*. 2012; 40: 813–822.
- Barbedo, L.S., Sgarbi, D.B.G. 2010. Candidíase. *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis* 22(1):22–38.
- Bagagli, E., Marques, S.A. Micologia médica molecular: Impacto na epidemiologia e ecologia dos fungos. In: *Compêndio de Micologia Médica*. ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.v.2. p.123-137. 2010.
- Barberino, M.G., Silva, N., Rebouças, C., Barreiro, K., Alcântara, A.P., Netto, E.M., Albuquerque, L., Brites, C. 2006. Evaluation of blood stream infections by *Candida* in three tertiary hospitals in Salvador, Brazil: a case-control study. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 10(1): 36-40.
- Bassetti, M., Taramasso, L., Nicco, E., Molinari, M.P., Mussap, M., Viscoli, C. 2011. Epidemiology, Species Distribution, Antifungal Susceptibility and Outcome of Nosocomial Candidemia in a Tertiary Care Hospital in Italy. *Biosearch* 9:241-8.

De Bedout, C., Gomez, B.L. 2010. Candida and candidiasis: the challenge continues for an early diagnosis. *Infection* 14(S2): S159-S171.

Brasil, 2012. Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. Disponível em: <http://www.conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012>. Acesso em: 02 setembro 2016.

Brilhante, R.S.N., Rodriques, T.J.S., Castelo-Branco, D.S.C.M., Teixeira, C.E.C., Macedo, R.M., Bandeira, S.P., Alencar, L.P., Momceiro, A.J., Cordeiro, R.A., Bandeira, T.J.P.G., Moreira, J.L.B., Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G. 2014. Antifungal susceptibility and virulence attributes of animal-derived isolates of *Candida parapsilosis* complex. *Journal of Medical Microbiology* 63: 1568-1572.

Castro, M.C.A. Ocorrência de espécies do Complexo *Candida parapsilosis* em amostras biológicas de pacientes e profissionais de hospitais do Natal/RN. 2017. 77f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária.

Carolis, E., Vella, A., Florio, A.R., Posteraro, P., Perlin, D.S., Sanguinetti, M., Posteraro, B. 2012. Aspergillus Species Susceptibility Testing of *Candida* and Spectrometry for Caspofungin Ionization–Time of Flight Mass Use of Matrix-Assisted Laser Desorption. *Journal of Clinical Microbiology* 50(7):2479.

Cleveland, A.A., Farley, M.M., Harrison, L.H., Stein, B., Hollick, R., Lockhart, S.R., Magill, S.S., Derado, G., Park, B.J., Chiller, T.M. 2012. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population- based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008–2011. *Clinical Infectious Diseases* 55(10):1352-61.

Chakrabarti A, Sood P, Rudramurthy SM, Chen S, Jillwin J, Iyer J, Sharma A, Harish BN, Roy I, Kindo AJ, Chhina D, Savio J, Mendiratta D, Capoor MR, Das S, Arora A, Chander J, Xess I, Boppe A, Ray U, Rao R, Eshwara VK, Joshi S, Pate A, Sardana R, Shetty A, Pamidimukkala U. Characteristics, outcome and risk factors for mortality of paediatric

patients with ICU-acquired candidemia in India: A multicentre prospective study. *Mycoses*. 2020; 00:1-15.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2008. Reference method for broth dilution testing of yeasts: Approved standard third edition M27-A3. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informational supplement. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012 (Document M27-S4).

Colombo, A.L., Guimarães, T. 2003. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36(5):599-607.

Colombo, A.L., Garnica, M., Aranha Camargo, L.F., Da Cunha, C.A., Bandeira, A.C. 2012. *Candida glabrata*: an emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. *Medical Mycology* 51:38–44.

Colombo, A.L., Guimarães, T., Camargo, L.F.A., Richtmann, R., de Queiroz-Telles, F., Salles, M.J.C., Cunha, C.A., Yasuda, M.A., Moretti, M.L., Nucci, M. 2013. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Brazil Journal Infectious Diseases* 17(3), 283–312.

Cowen LE, Sanglard D., Howard SJ, Rogers PD, Perli DS (2015). Mecanismos de resistência aos antifúngicos. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5 : a019752 .

Cuenca-Estrella, M. 2010. Antifungal agents in the treatment of systemic infections: Relevance of mechanism of action, activity profile and resistances. *Revista Espanola de Quimioterapia*: Publicacion Oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia 23(4):169–176.

- Deconinck, L., Meybeck, A., Pradier, M., Patoz, P., Melliez, H., Senneville, E. (2016). Community acquired fungemia caused by *Candida pulcherrima*: diagnostic contribution of MALDI-TOF mass spectrometry. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 15:14. doi: 10.1186/s12941-016-0129-1.
- Degand, N., Carbonnelle, E., Dauphin, B., Beretti, J.L., Le Bourgeois, M., Sermet-Gaudelus, I., Segonds, C., Berche, P., Nassif, X., Ferroni, A. 2008. 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* 46:3361–3367.
- De Groot, P.W.J., Bader, O., Boer, A.D., Weig, W., Chauhan, N. 2013. Adhesins in human fungal pathogens: Glue with plenty of stick. *Eukaryotic Cell* 12:470–481.
- Déry, M., Hasbun, R. 2011. Fluconazole-resistant *Candida*: mechanisms and risk factor identification. *Current Fungal Infection Reports* 5:23–28.
- Doi, A.M., Pignatari, A.C.C., Edmond, M., Marra, A.R., Camargo, L.F.A., Siqueira, R.A., Mota, V.P., Colombo, A.L. 2016. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *Journal Plos One* 11(1): e0146909.
- Doria, A.C.O.C., Santos, T.B., Figueira, F.R., Sorge, C.P.C., Bernardes, R.C., Batista, A.C.S., Khouri, S. 2015. Estudo Comparativo de hemoculturas e cateteres positivos para leveduras do gênero *Candida* de origem hospitalar. *Univap* 21(38): 2237-1753.
- Elaine, R.G.L., Analy, C.F. 2015. Neonatal Candidemia Caused by *Candida haemulonii*: Case Report and Review of Literature. *Mycopathologia* 180(1-2):69-73.
- Faceli, K., Lorena, A.C., Gama, J., Carvalho, A.C.P.L.F. 2011. Inteligência artificial: Uma abordagem de aprendizado de máquina.

- Fahami, S., Kordbacheh, P., Moazeni, M., Mahmoodi, M., Mirhendi, H. 2010. Species identification and strain typing of candida isolates by PCR-RFLP and RAPD-PCR analysis for determining the probable sources of nosocomial infections. *Iranian Red Crescent Medical Journal* 12(5):539–547.
- Fernandes, J.A.L., Prandidni, T.H.R., Castro, M.C.A., Arantes, T.D., Giacobino, J., Bagagli, E., Theodoro, R.C. 2016. Evolution and application of Inteins in *Candida* species: A Review. *Frontiers in Microbiology* 7:1585.
- Fornari, G., Herket, P.F., Redivo, D.D.B., Benedetti, V.P., Glienke, C. 2013. Epidemiologia da colonização de leveduras *Candida* da cavidade bucal em pacientes diabéticos. *Saúde e Biologia* 8(2):1-6.
- Fortún, J., Gioia, F. 2017. Invasive Candidiasis in the neutropenic patient. *Revista Especialista em Quimioterapia* 30 (Supl. 1):22-25.
- Gago, S., Rosas, R.G., Cuesta, I., Mellado, E., Izquierdo, A.A. 2014. *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* virulence in the non-conventional host *Galleria mellonella*. *Virulence* 5(2):278-85.
- Gioia, M.P., Svidzinski, T.I.E. 2010. Phisiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 46(3):225-234.
- Gonçalves, S.S., Amorim, C.S., Nucci, M., Padovam, A.C., Briones, M.R., Melo, A.S., Colombo, A.L. 2010. 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* 16(7):885-7.
- Gonçalves, S.S., Souza, A.C.R., Chowdhary, A., Meis, J.F., Colombo, A.L. 2016. Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. *Mycoses* 59:198–219.
- Gonzalez, L.A. 2018. Regressão logística e suas aplicações. Universidade Federal do Maranhão.

- Grossman, N.T., Chiller, T.M., Lockhart, S.R. 2014. Epidemiology of Echinocandin Resistance in *Candida*. *Current Fungal Infection Reports* 8(4):243–248.
- Guimarães, T., Nucci, M., Mendonça, J.S., Martinez, R., Brito, L.R., Silva, N., Moretti, M.L., Salomão, R., Colombo, A.L. 2012. Epidemiology and predictors of a poor outcome in elderly patients with candidemia. *International Journal of Infectious Diseases* 6:442–447.
- Guinea, J. 2014. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clinical Microbiology and Infection* 20(6):5–10.
- Gutiérrez, J., Horrillo, M. 2014. Advances in artificial olfaction: Sensors and applications. *Talanta*, Elsevier, 124:95–105.
- Higashi, C.M., Takashina, F.H., Zandrini, D., Stipp-abe, A.T., Vespero, E.C., Mariuza, R. 2015. Comparison of Vitek-2 automated identification system and PCR-ITS for species characterization of clinical isolates. *Semina- Ciências Biológicas e da Saúde* 36(1):233–242.
- Hinrichsen, S.L., Falcão, E., Vilella, T.A.S., Colombo, A.L., Nucci, M., Moura, L., Rêgo, L., Lira, C., Almeida, L. 2008. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41(4):394-398.
- Hirai, Y., Asahata, S., Ainoda, Y., Goto, A., Fujita, F., Totsuka, K. 2014. Nosocomial *Candida* parapsilosis candidaemia: Risk factors, antifungal susceptibility and outcome. *Journal of Hospital Infection* 87(1):54–58.
- Horn, F., Heinekamp, T., Knemeyer, O., Pollmacher, J., Valiante, V., Brakhage, A.A. 2012. Systems biology of fungal infection. *Frontiers in Microbiology* 3: 1-20.
- Hu, B., Du, Z., Kang, Y., Zang, B., Cui, W., Qin, B., Fang, Q., Qiu, H., Li, J. 2014. Catheter-related *Candida* bloodstream infection in intensive care unit patients : a subgroup analysis of the China-SCAN study. *BMC Infectious Diseases* 14:594.
- Koehler, P., Tacke, D., Cornely, O.A. 2014. Our 2014 approach to candidaemia. *Mycoses* 57:581–583.

- Kucukates, E., Gultekin, N.N., Alisan, Z., Hondur, N., Ozturk, R. 2016. Identification of *Candida* species and susceptibility testing with Sensititre YeastOne microdilution panel to 9 antifungal agentes. *Saudi Medical Journal* 37(7):750–757.
- Li, D., Xia, R., Zhang, Q., Bai, C., Li, Z., Zhang, P. 2017. Evaluation of candidemia in epidemiology and risk factors among cancer patients in a cancer center of China: an 8-year case-control study. *BMC Infectious Diseases* 17:536.
- Lima-Neto, R., Santos, C., Lima, N., Sampaio, P., Pais, C., Neves, R.P. 2014. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolates culture collection. *Brazilian Journal of Microbiology* 45, 2: 515-522.
- Lockhart, S.R., Iqbal, N., Clevand, A.A., Farley, M.M., Harrison, L.H., Bolden, C.B., Baughmam, W., Stein, B., Hollick, R., Park, B.J., Chiller, T. 2012. Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two US cities from 2008 to 2011. *Journal of Clinical Microbiology* 50(11):3435–3442.
- Lockhart, S.R. 2014. Current Epidemiology of *Candida* Infection. *Clinical Microbiology Newsletter* 36(17):132-136.
- López-Martínez, R. 2010. Candidosis, a new challenge. *Clinics in Dermatology* 28(2):178–184.
- Magan, N., Evans, P. 2000. Volatiles as an indicator of fungal activity and differentiation between species, and the potential use of electronic nose technology for early detection of grain spoilage. *Journal of Stored Products Research*, Elsevier, 36(4):319–340.
- Marinach, C., Alanio, A., Palous, M., Kwasek, S., Fekkar, A., Brossas, j., Brun, S., Snounou, G., Hennequin, C., Sanglard, D., Datry, A., Golmard, J., Mazier. 2009. MALDI-TOF MS based drug susceptibility testing of pathogens: The example of *Candida albicans* and fluconazole. *Proteomics* 9:4627-4631.

Maubon, D., Garnaud, C., Calandra, T., Sanglard, D., Cornet, M. 2014. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? *Intensive Care Medicine* 40(9):1241-55.

Medrano, D.J.S., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Rocha, M.F.G., Rabenhorst, S.H.B., Sidrim, J.J.C. 2006. CANDIDEMIA IN A BRAZILIAN HOSPITAL: THE IMPORTANCE OF *Candida parapsilosis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 48(1):17-20.

Menezes, E.A., Vasconcelos Júnior, A.A., Cunha, F.A., Cunha, M.C.S.O., Braz, B.H.L., Capelo, L.G., Silva, CL.F. 2012. Identificação molecular e suscetibilidade antifúngica de *Candida parapsilosis* isoladas no Ceará, Brasil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 48(6):415–420.

Merseguel, K.B., Nishikaku, A.S., Rodrigues, A.M., Padovan, A.C., Ferreira, R.C., Melo, A.S.A., Briones, M.R., Colombo, A.L. 2015. Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. *BMC Infectious Diseases* 15:57.

Mimica, M.J., Martino, M.D.V., Pasternak, J. 2013. MALDI-TOF MS in the clinical microbiology laboratory. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 49(4): 256-259.

Nucci, M., Telles, F.Q., Tobón, A.M., Restrepo, A., Colombo, A.L. 2010. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latina America. *Clinical Infectious Diseases* 51(5):561–570.

Pammi, M., Zhong, D., Johnson, Y., Revell, P., Versalovic, J. 2014. Polymicrobial blood stream infections in the neonatal intensive care unit are associated with increased mortality: a case-control study. *BMC Infectious Diseases* 14:390.

Pappas PG, Lionarkis MS, Arendruo MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Candidiase invsiva. *Nat Ver Dis Primers*. 2018; 4:18026.

Paramythiotou, E., Frantzeskaki, F., Flevari, A., Armaganidis, A., Dimopoulos, G. 2014.

Department. Invasive fungal infections in the icu: How to approach, how to treat. *Molecules* 19:1085–1119.

Passos, X.S., Costa, C.R., Araujo, C.R., Nascimento, E.S., Souza, L.K., Fernandes, O.F., Sales, W.S., Sailva, M.R. 2007. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp. Blood stream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. *Mycopathologia* 163:145–151.

Paul, S., Singh, P., Rudramurthy, S.M., Chakrabarti, A., Ghosh A.K. 2017. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry: protocol standardization and database expansion for rapid identification of clinically important molds. *Future Microbiology* 12:1457-1466.

Peixoto, J.V., Rocha, M.V., Nascimento, R.T.L., Moreira, V.L., Kashiwabara, T.G.B. 2014. Candidíase: uma revisão de literatura. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research* 8(2):75-82.

Pfaller, M.A., Diekema, D.J. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews* 20(1):133–163.

Pinhati, H.M., Casulari, L.A., Souza, A.C., Siqueira, R.A., Damasceno, C.M., Colombo, A.L. 2016. Outbreak of candidemia caused by fluconazole resistant *Candida parapsilosis* strains in an intensive care unit. *BMC Infectious Diseases* 16(1):433.

Polit D.F, Hungler B.P, 1995, Nursing Research, Principles and methods, Philadelphia PA, *JB Lippincott*.

Pope, C., Mays, N. 2006. Qualitative research in health care. *Blackwell Publishing Ltd*, 3 ed.

Pulcrano, G., Iula, D.V., Vollaro, A., Tucci, A., Cerullo, M., Esposito, M., Rossano, F., Catania, M.R. 2013. Rapid and reliable MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Candida non-albicans* isolates from bloodstream infections. *Journal of Microbiological Methods* 94:262-266.

Ramos, L.S., Figueiredo-Carvalho, M.H., Barbedo, L.S., Ziccardi, M., Chaves, A.L., Zancopé-Oliveira, R.M., Pinto, M.R., Sgarbi, D.B., Dornelas-Ribeiro, M., Branquinha, M.H., Santos, A.L. 2015. *Candida haemulonii* complex: species identification and antifungal susceptibility profiles of clinical isolates from Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70(1):111-5.

Ruiz, L.S., Khouri, S., Hahn, R.C., Silva, E.G., Oliveira, V.K.P., Gandra, R.F., Paula, C.R. 2013. Candidemia by Species of the *Candida parapsilosis* Complex in Children's Hospital: Prevalence, Biofilm Production and Antifungal Susceptibility. *Mycopathologia* 175:231-9.

Sabino, R., Sampaio, P., Veríssimo, C., Pais, C. 2014. Genotipagem de *Candida parapsilosis* com marcadores de DNA microssatélite: uma ferramenta para o estudo e controle das infecções hospitalares. *Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge* 3(Supl 3):30-33.

Sardi, J.C., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco, A. M., Mendes, G.M.J. 2013. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology* 62:10-24.

Silva, L.B., De Oliveira, D.B., Da Silva, B.V., De Souza, R.A., Da Silva, P.R, Ferreira-Paim, K., .Andrade-Silva, L.E., Silva-Vergara, M.L., Andrade, A.A. 2014. Identification and antifungal susceptibility of fungi isolated from dermatomycoses. *Journal Eur Acad Dermatol Venereol* 28:633-40.

Singaravelu, K., Gácsér, A., Nosanchuk, J.D. 2014. Genetic determinants of virulence - *Candida parapsilosis*. *Revista Iberoamericana de Micologia* 31(1):16–21.

Singh, R., Parija, S.C. 2012. *Candida parapsilosis*: An emerging fungal pathogen. *Indian Journal of Medical Research* 136(4):671–673.

Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P.K., Viridi, J.S. 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology* 5;6:791.

Suchorab, Z., França, M., Guz, L., Oszust, K., Lagod, G., Gryta, A., Bilińska-Wielgus, N., Czerwiński, J. 2019. A method for early detection and identification of fungal contamination of building materials using e-nose, *PloS one* 14 (4).

Spreghini, E., Orlando, F., Tavanti, A., Senesi, S., Giannini, D., Manso, E., Barchiesi, F. 2012. In vitro and in vivo effects of echinocandins against *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67(9):2195–2202.

Tamura, N.K., Negri, M.F.N., Bonasseli, L.A., Svidzinski, T.I.E. 2007. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40(1):91-93.

Toro, M., Torres, M.J., Maite, R., Axnar, J. 2011. Caracterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. *Clinical Microbiology Infection* 17:418-424.

Trofa, D., Gácsér, A., Nosanchuk, J.D. 2008. *Candida parapsilosis*, naemerging fungal pathogen. *Clinical Microbiology* 21: 606-625.

Vella, A., Carolis, E., Vaccaro, L., Posterano, P., Perlin, D.S., Kostrzewa, M., Posterano, B., Sanguinetti, M. 2013. Rapid antifungal susceptibility testing by Matrix- Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 51:2964-2969.

Xiao, Z., Wang, Q., Zhu, F., An, Y. (2019). Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and mortality risk factors of candidemia among critically ill patients: a retrospective study from 2011 to 2017 in a teaching hospital in China. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 8:89. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0534-2>

- Wilson, A. 2015. Advances in electronic-nose technologies for the detection of volatile biomarker metabolites in the human breath. *Metabolites*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 5(1):140–163.
- Wu, P.F., Liu, W.L., Hsieh, M.H., Hii, I.M., Lee, Y.L., Lin, Y.T., Ho, M.W., Liu, C.E., Chen, Y.H., Wang, F.D. 2017. Epidemiology and antifungal susceptibility of candidemia isolates of non-*albicans Candida* species from cancer patients. *Emerging Microbes & Infections* 11;6(10):e87.
- Yapar, N. 2014. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 10: 95–105.
- Zarrin, M., Mahmoudabadi, A.Z. 2009. Invasive candidiasis ; a review article. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2(1):1-6.
- Ziccardi, M., Souza, L.O.P., Gandra, R.M., Galdino, A.C.M., Baptista, A.R.S., Nunes, A.P.F., Ribeiro, M.A., Branquinha, M.H., Santos, A.L.S. 2015. *Candida parapsilosis* (sensu lato) isolated from hospitals located in the Southeast of Brazil: Species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes. *International Journal of Medical Microbiology* 305(8):848–859.

APÊNDICE – FICHA DE COLETA DE DADOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Pesquisa de Doutorado: Candidemia nosocomial: diagnóstico com proteômica aplicada na identificação e resistência das leveduras

Pesquisadora: Maria da Conceição Alexandre Castro

FICHA DE COLETA DE DADOS

HOSPITAL:	
NOME:	
IDADE:	SEXO () F () M
PRONTUÁRIO:	Nº ATENDIMENTO:

DATAS	
ADMISSÃO:	UNIDADE:
ALTA / TRANSFERÊNCIA / ÓBITO:	

TEMPO DE INTERNAMENTO:	
-------------------------------	--

HISTÓRIA CLÍNICA		
HIPÓTESE DIAGNÓSTICA:		
PROCEDIMENTOS INVASIVOS:		
TRATAMENTO MEDICAMENTOSO:	Prévio:	Atual:
ESPÉCIE FÚNGICA ISOLADA:		
OUTROS MICROORGANISMOS:		

FATORES PREDISPOONENTES	
() Cateter Venoso Central	() Tempo prolongado de internação
() Ventilação Mecânica	() Doença Cardíaca
() Antibiótico de largo espectro	() Doença Hematológica
() Nutrição Parenteral	() Doença Oncológica
() Sonda Vesical	() Diabetes
() Corticoterapia	() Hipertensão
() Cirurgia Prévia / Abdominal ()S ()N	() Neutropenia
() Hemodiálise	() Químio/Radioterapia
() Idade Extrema	() Imunossupressão

Observações:

**ANEXO A – COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO A REVISTA
RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT**

Research, Society and Development, v. 10, n. 7, e54710716731, 2021
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16731>

**Distribuição, fatores de risco e suscetibilidade antifúngica de espécies *Candida*
isoladas da corrente sanguínea de pacientes críticos**

Distribution, risk factors and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from the
bloodstream of critically ill patients

Distribución, factores de riesgo y susceptibilidad antifúngica de especies de *Candida* aisladas del
torrente sanguíneo de pacientes críticamente enfermos

Recebido: 02/06/2021 | Revisado: 13/06/2021 | Aceito: 17/06/2021 | Publicado: 02/07/2021

Maria da Conceição Alexandre Castro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4908-4415>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: conceicaoalexandre.esf@hotmail.com

Cícero Pinheiro Inácio

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5975-4382>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: cicero.inacio@ufpe.br

Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8846-877X>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: gondalves_reginaldo@hotmail.com

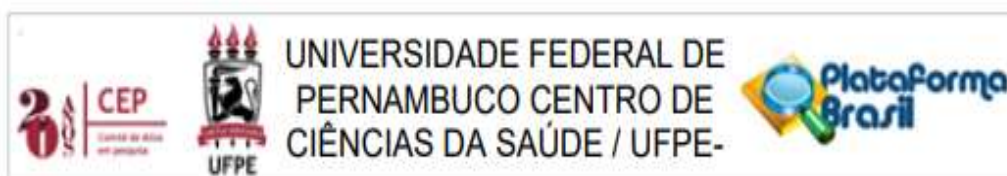
Rejane Pereira Neves

**ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO A REVISTA
SENSORS AND ACTUATORS B: CHEMICAL**

Sensors and Actuators B: Chemical
BREAKTHROUGH OF CLINICAL Candida CULTURES IDENTIFICATION USING THE
ANALYSIS OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS AND ARTIFICIAL
INTELLIGENCE METHODS
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Biosensors
Keywords:	Fungi species identification; Volatile Organic Compounds; Artificial Intelligence; Pattern Recognition; Electronic Nose
Corresponding Author:	Rejane Pereira Neves, Ph.D. Universidade Federal de Pernambuco Recife, Pernambuco BRAZIL
First Author:	Maria da Conceição Alexandre Castro
Order of Authors:	Maria da Conceição Alexandre Castro
	Leandro Maciel Almeida
	Cleber Zanchettin
	Renan Williams Marques Ferreira
	Clayton Augusto Benevides
	Frederico Duarte de Menezes
	Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto, Ph.D.
	Cícero Pinheiro Inácio, Ph.D.
	José Gilson de Almeida Teixeira Filho, Ph.D.
	Rejane Pereira Neves, Ph.D.

	Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto, Ph.D.
	Cicero Pinheiro Inácio, Ph.D.
	José Gilson de Almeida Teixeira Filho, Ph.D.
	Rejane Pereira Neves, Ph.D.
Abstract:	Infections triggered by fungi of the genus <i>Candida</i> are widely known, although the high incidence and mortality factors still unclear. The classic methods of identifying <i>Candida</i> species are subject to errors, requiring new techniques with faster and more accurate performance. We present a study for identifying fungi species by analyzing volatile organic compounds of cultures acquired and interpreted using Electronic Nose and Artificial Intelligence methods. The proposed approach contributes to establishing an agile and appropriate treatment, reducing the complications in the disease and deaths. We perform experiments with three species of <i>Candida</i> obtaining accuracy above 90% in the fungi identification. Therefore, future works are encouraged to deal with more fungus to help create a new identification methodology faster and reliable using artificial intelligence methods.
Suggested Reviewers:	Guilherme Chaves, Ph.D. Professor, Universidade Federal do Rio Grande do Norte guilherme.chaves@ufrnet.br José Júlio Sidrim, Ph.D. Professor, Universidade Federal do Ceara sidrim@ufc.br Nelson Manuel Lima, Ph.D. Professor, Universidade do Minho nelson@ie.uminho.pt Cledir Santos, Ph.D. Professor, Universidad de La Frontera cledir.santos@ufrontera.cl Patrice Lê Pape, Ph.D.

ANEXO C – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: CANDIDEMIA NOSOCOMIAL: DIAGNÓSTICO COM PROTEÔMICA APLICADA NA IDENTIFICAÇÃO E RESISTÊNCIA DAS LEVEDURAS

Pesquisador: MARIA DA CONCEIÇÃO ALEXANDRE CASTRO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 81413517.4.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

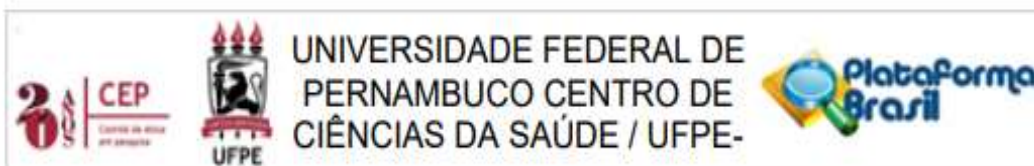
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.556.418

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de Doutorado pertencente ao Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical – UFPE, da aluna Maria da Conceição Alexandre Castro, sob orientação da Profa. Dra. Rejane Pereira Neves e co-orientação do Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto. O projeto propõe um estudo que pretende diagnosticar e caracterizar a epidemiologia das candidemias nosocomiais, determinar a sensibilidade antifúngica dos isolados e propor nova metodologia para detecção rápida de alterações espectrais que determinam resistência antifúngica. Para isso, pretende utilizar amostras sanguíneas de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva de três Hospitais Públicos Terciários da Região Metropolitana de Natal-RN. Os testes laboratoriais parecem ser realizados no Laboratório de Microbiologia de cada unidade hospitalar ou no Laboratório Central de Saúde Pública do Rio Grande do Norte Dr. Almino Fernandes, LACEN-RN. Dados dos prontuários médicos também serão coletados através de uma ficha



Continuação do Parecer: 2.556.418

clínica. Os dados sobre a evolução dos pacientes e suas informações clínicas serão acompanhados até o momento da alta hospitalar, transferência para outra unidade ou óbito.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL

Diagnosticar e caracterizar a epidemiologia das candidemias nosocomiais, determinar a sensibilidade antifúngica dos isolados e propor nova metodologia para detecção rápida de alterações espectrais que determinam resistência antifúngica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Diagnosticar os casos de candidemia a partir de hemoculturas de pacientes internados em UTI de três Unidades de Saúde Públicas do Rio Grande do Norte;
- Realizar identificação proteômica pela técnica de MALDI-TOF MS dos isolados de *Candida* diretamente a partir de amostras sanguíneas e isolados em cultura;
- Determinar a incidência de candidemia nosocomial nas diferentes Unidades de Saúde e as espécies prevalentes de *Candida*;
- Explorar os fatores de risco e a mortalidade associada, para cada espécie de *Candida*, em pacientes críticos das três Unidades de Saúde Públicas do Rio Grande do Norte;
- Determinar a concentração inibitória mínima de todas as leveduras através de testes de sensibilidade antifúngica padronizados pelo documento M27-A3 e M27-S4 do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), frente anfotericina B, fluconazol, voriconazol, anidulafungina, caspofungina e micafungina;
- Caracterizar espectralmente por MALDI-TOF MS a mudança mínima no perfil proteico de cada isolado resistente in vitro a anfotericina B, fluconazol, voriconazol, anidulafungina, caspofungina e micafungina;
- Correlacionar a concentração inibitória mínima com a mudança mínima no perfil proteico de cada isolado;
- Caracterizar o perfil proteômico de biofilmes fúngicos monomicrobiano e polimicrobiano por

MALDI-TOF;

- Estabelecer o perfil de sensibilidade antifúngica in vitro de células de leveduras planctônicas e de biofilme monomicrobiano e polimicrobiano;
- Caracterizar o perfil proteômico dos biofilmes fúngicos, após tratamento, por MALDI-TOF;
- Determinar diferenças ultraestruturais dos biofilmes antes e pós-tratamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:**RISCO E BENEFÍCIOS**

Os prováveis riscos nesta pesquisa serão possível identificação do paciente ou quebra de sigilo das informações colhidas no prontuário. Como forma de amenizar a pesquisadora se compromete com a confidencialidade e sigilo dos dados obtidos. As pessoas envolvidas na pesquisa serão beneficiadas diretamente com a pesquisa, através do diagnóstico micológico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta uma boa delimitação do tema, com bom embasamento científico e metodologia experimental objetiva. Além disso, o estudo apresenta uma excelente viabilidade financeira.

As pendências apresentadas foram devidamente respondidas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A documentação exigida foi anexada ao projeto.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Continuação do Parecer: 2.556.418

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1043887.pdf	28/02/2018 11:01:53		Aceito
Outros	CARTADERESPOTAASPENDENCIAS.pdf	28/02/2018 11:00:37	MARIA DA CONCEIÇÃO ALEXANDRE CASTRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetodoutoradoplataforma.pdf	28/02/2018 11:00:10	MARIA DA CONCEIÇÃO ALEXANDRE CASTRO	Aceito
Outros	DECLARACAOVINCULO.pdf	21/12/2017 11:55:21	MARIA DA CONCEIÇÃO ALEXANDRE CASTRO	Aceito
Outros	CARTAAUENCIAGISELDANOVA.pdf	21/12/2017 11:52:32	MARIA DA CONCEIÇÃO ALEXANDRE CASTRO	Aceito
Outros	TERMODECONCESSAOWALFREDONOVA.pdf	21/12/2017 11:51:49	MARIA DA CONCEIÇÃO ALEXANDRE CASTRO	Aceito
Outros	TERMODECOMPROMISSO.pdf	21/12/2017 11:50:53	MARIA DA CONCEIÇÃO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 22 de Março de 2018

Assinado por:

LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

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