



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

ANA EMÍLIA DE MEDEIROS ROBERTO

**CANDIDEMIA NA REGIÃO NORDESTE: PRIMEIRO ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO
MOLECULAR POR PCR ASSOCIADO A RÁPIDA DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA
ANTIFÚNGICA POR MALDI-TOF MS**

RECIFE

2021

ANA EMÍLIA DE MEDEIROS ROBERTO

**CANDIDEMIA NA REGIÃO NORDESTE: PRIMEIRO ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO
MOLECULAR POR PCR ASSOCIADO A RÁPIDA DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA
ANTIFÚNGICA POR MALDI-TOF MS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Biologia de Fungos.

Micologia Aplicada

Orientador Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto
Co-orientadores Dr. Danilo Elias Xavier
Dr. Esteban Espinosa Vidal

RECIFE

2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Roberto, Ana Emília de Medeiros.

Candidemia na região nordeste: primeiro estudo epidemiológico molecular por PCR associado a rápida detecção de resistência antifúngica por MALDI-TOF MS. / Ana Emília de Medeiros Roberto. – 2021.

62 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Reginaldo Gonçalves de Lima Neto.

Coorientador: Danilo Elias Xavier.

Coorientador: Esteban Espinosa Vidal.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia de fungos, 2021.

Inclui referências.

1. Equinocandinas. 2. Resistência antifúngica. 3. Leveduras. I. Lima Neto, Reginaldo Gonçalves de. (Orient.). II. Xavier, Danilo Elias. (Coorient.). III. Vidal, Esteban Espinosa. (Coorient.). IV. Título.

ANA EMÍLIA DE MEDEIROS ROBERTO

**CANDIDEMIA NA REGIÃO NORDESTE: PRIMEIRO ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO
MOLECULAR POR PCR ASSOCIADO A RÁPIDA DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA
ANTIFÚNGICA POR MALDI-TOF MS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biologia de Fungos. Área de concentração: Micologia Aplicada.

Aprovado em: 08/03/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dra. Rejane Pereira Neves (Examinador Interno)
Departamento de Micologia - Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dra. Sylvia Lemos Hinrichesen (Examinador Externo)
Hospital das Clínicas - Universidade Federal do Pernambuco – UFPE

Prof. Dra. Danielle Patricia Cerqueira Macêdo (Examinador Externo)
Departamento de Farmácia - Universidade Federal do Pernambuco – UFPE

Dr. Cicero Pinheiro Inácio (Examinador Externo)
PNPD - Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães (Suplente Interno)
Departamento de Micologia - Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dra. Maria Daniela da Silva Buonafina Paz (Suplente Externo)
PNPD - Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Agradecimentos

Meu agradecimento especial,

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

A virgem Maria pela força nos momentos difíceis.

A minha família, pais, avós, irmãos, sobrinhos, tios e primos que souberam entender a minha ausência nos muitos momentos.

As minhas filhas Maria Valentina e Aurora, por serem a luz de minha vida.

A minha irmã Ana Alice, por ter dedicado seu tempo em cuidar de minha filha em meus momentos ausentes.

A minha prima Clara por todo apoio e carinho para que tudo pudesse ficar bem.

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

A Universidade Federal do Pernambuco pela oportunidade e aprendizado.

A FACEPE pelo apoio financeiro.

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

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

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

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

Ao meu orientador Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves, pela oportunidade de ter me conduzido desde a graduação, pelos ensinamentos que foram valiosos para meu crescimento científico e intelectual.

Aos colegas da Micologia pelas boas conversas, amizade, pelos momentos de distração e pelos ensinamentos que foram tão valiosos.

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

“Às vezes estamos presos a um lugar a qual não pertencemos”. Rainha de Katwe

RESUMO

Ao longo dos anos, observamos um aumento notável na incidência de candidemia, sendo esta uma infecção fúngica invasiva associada a morbidez substancial, mortalidade e custos de saúde elevados. As espécies de *Candida* estão entre os dez principais agentes patogênicos que causam infecções sanguíneas. O surgimento de espécies de *Candida* está relacionado a fatores bem definidos, como um aumento contínuo em condições imunossupressoras como a AIDS e outras doenças predisponentes, fatores incluindo transplante de órgãos, leucemia, antibióticos de largo espectro, cateteres internos, diabetes e uso indevido de drogas intravenosas. Dessa maneira, a gravidade da candidemia está associada a uma interação entre a resistência aos medicamentos antifúngicos, a virulência e os traços de evasão imune. O trabalho objetiva diagnosticar os casos de candidemia em pacientes críticos da Unidade de Saúde Pública Terciária, propor nova metodologia para detecção rápida de alterações espectrais que determinam resistência antifúngica. Durante o estudo foram isoladas 59 leveduras advindas de pacientes internados em UTIs da Unidade de Saúde, onde os isolados mais frequentes foram, vinte (33,8%) leveduras do complexo *C. parapsilosis*, sendo dezessete (28,8%) *C. parapsilosis stricto sensu*, duas (3,3%) *C. orthopsilosis* e uma (1,6%) de *C. metapsilosis*. As demais leveduras isoladas foram, dezesseis (27,1%) de *Candida albicans*, treze (22%) *C. glabrata*, dez (16,9%) de *C. tropicalis*, todas as leveduras foram identificadas através da espectrometria de massas pela técnica MALDI-TOF MS. Todas as 20 leveduras do complexo *Candida parapsilosis* foram testadas frente a 11 diferentes concentrações de cada uma das três equinocandinas (Anidulafungina, Caspofungina e Micafungina), totalizando 33 condições experimentais distintas por levedura e 660 análises em toda população avaliada. O TSA pelo MALDI-TOF MS pode fornecer uma alternativa adequada e pode ser usado para selecionar isolados sensíveis ou resistentes, além reduzir o tempo de incubação para algumas horas.

Palavras-chave: Equinocandinas; Resistência antifúngica; Leveduras.

ABSTRACT

Over the years, we have seen a resulting increase in the incidence of candidemia, which is an invasive fungal infection associated with substantial morbidity, mortality and high health costs. *Candida* species are among the top ten pathogens that cause blood infections. The emergence of *Candida* species is related to well-defined factors, such as a continuous increase in immunosuppressive conditions such as AIDS and other predisposing diseases, factors including organ transplantation, leukemia, broad-spectrum antibiotics, internal catheters, diabetes and drug misuse intravenous. Thus, the severity of candidemia is associated with an interaction between resistance to antifungal drugs, virulence and traits of immune evasion. The work aims to diagnose candidemia cases in obliged patients from the Tertiary Public Health Unit, to proposing a new methodology for rapid detection of changes spectral factors that determine antifungal resistance. During the study, 59 yeasts from patients admitted to the ICU of the Health Unit were examined, where the most frequent checks were twenty (33.8%) yeasts of the *C. parapsilosis* complex, of which seventeen (28.8%) were *C. parapsilosis* stricto sensu, two (3.3%) *C. orthopsilosis* and one (1.6%) of *C. metapsilosis*. The remaining yeasts were, sixteen (27.1%) of *Candida albicans*, thirteen (22%) *C. glabrata*, ten (16.9%) of *C. tropicalis*, all yeasts were identified through mass spectrometry using the MALDI technique -TOF MS. All 20 yeasts of the *Candida parapsilosis* complex were tested against 11 different debtors of each of the three echinocandins (Anidulafungina, Caspofungina and Micafungina), totaling 33 different experimental conditions for yeast and 660 analyzes in the entire evaluated population. TSA by MALDI-TOF MS can provide a suitable alternative and can be used to select choose or resistant, in addition to reducing the incubation time to a few hours.

Key-words: Echinocandins; Antifungal resistance; Yeasts.

Lista de abreviaturas

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

SIDA-	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SIMS-	Secondary Ion Mass Spectrometry
SES/PE-	Secretária Estadual de Saúde do Pernambuco
TAFE	Eletroforese Alternado de Campo TransversalCHEF
TCTH-	Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas
TSA-	Teste de Sensibilidade Antifúngica
UFPE-	Universidade Federal do Pernambuco
UV-	Ultravioleta
UTI-	Unidade de Terapia Intensiva
YEPD-	Dextrose Peptona Extrato de Levedura
z-	Carga

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1. INFECÇÕES RELACIONADAS COM ASSISTÊNCIA A SAÚDE POR LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i>	14
2.2. COMPLEXO <i>Candida parapsilosis</i>	16
2.3. DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO.....	18
2.4. IDENTIFICAÇÃO POR MALDI-TOF MS.....	19
2.5. SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA.....	23
2.6. EQUINOCANDINAS	26
2.7. DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA POR MALDI-TOF MS.....	28
3. ARTIGO 2: Candidemia in pediatric patient with microcephaly: first description in Brazil	32
The authors agree to make the images and data described in the manuscript freely available for use.....	36
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
REFERÊNCIAS	40
APÊNDICE: Artigo Aceito	46
ANEXO A (Comprovante de Aprovação do Comitê de Ética).....	59
ANEXO B (Comprovante de Submissão do Artigo 2)	60

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 30 anos, observamos um aumento notável na incidência de candidemia, sendo esta uma infecção fúngica invasiva associada a morbidez substancial, mortalidade e custos de saúde elevados. As espécies de *Candida* estão entre os dez principais agentes patogênicos que causam infecções sanguíneas. As mudanças na distribuição das espécies e a mudança para isolados mais resistentes são cada vez mais descritas (Pulcrano et al., 2013).

Apesar da introdução de novos agentes antifúngicos, esta infecção continua a ser uma doença grave associada à mortalidade. Por isso, as mudanças nas práticas clínicas já ocorrem com terapias antimicóticas profiláticas e empíricas em pacientes de alto risco. No entanto, essas estratégias podem estar vinculadas para uma mudança nas espécies de *Candida não-albicans* e o surgimento de isolados com susceptibilidade a fluconazol reduzida, razão pela qual se faz necessário conhecer epidemiologia em nosso ambiente (Vella et al., 2013).

O surgimento de espécies de *Candida* está relacionado a fatores bem definidos, como um aumento contínuo em condições imunossupressoras como a AIDS e outras doenças predisponentes, fatores incluindo transplante de órgãos, leucemia, uso de antibióticos de largo espectro, catéteres vasculares internos, diabetes e uso indevido de drogas intravenosas. As infecções fúngicas causadas por leveduras do gênero *Candida* são mais frequentes em pacientes imunocomprometidos, devido as manifestações clínicas requererem um tratamento de acordo com o sítio de infecção e as características dos pacientes. Dessa maneira, a gravidade da candidemia está associada a uma interação entre a resistência aos medicamentos antifúngicos, à virulência e aos traços de evasão imune (Vella et al., 2013).

Dentre as espécies isoladas em infecções fúngicas a mais incidente aos seres humanos é a *Candida albicans*; no entanto, na América Latina vem sendo relatado aumento na incidência de candidemia por espécies de *Candida não-albicans*, tendo como principal isolado clínico o complexo *C. parapsilosis*. As infecções por *C. parapsilosis* estão relacionadas ao uso de dispositivos médico-hospitalares, como catéteres, próteses e sondas uma vez que os isolados desta espécie possuem grande capacidade de aderir a essas superfícies e em conjunto com outros

microrganismos se agrupam e formam o biofilme (Lanternier; Lortholary, 2010; Romeo et al., 2013). Demais espécies como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, entre outras, estão relacionadas a candidemia (Giolo; Svidzinski, 2010).

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

Além da necessidade de identificação de isolados de *Candida* a nível de espécie, devido a resistência intraespecífica a um ou múltiplos medicamentos, torna-se necessário determinar os padrões de sensibilidade/resistência deste patógeno aos agentes antifúngicos. Desta forma, isolamento e identificação de espécies *Candida* causadoras de candidemia e determinação de suas susceptibilidades a drogas antifúngicas se faz importante para garantir a eficácia das estratégias terapêuticas norteadas por vigilância epidemiológica. Apesar de muitos estudos, ainda existe a falta do conhecimento de fatores de risco para espécies associadas a resistência antifúngica em diferentes locais, o que permitiria definir melhor o tratamento em pacientes susceptíveis há fármacos menos tóxicos e com maior eficácia (Pfaller et al., 2013).

Dessa maneira, o diagnóstico laboratorial desempenha um papel fundamental no diagnóstico de infecções fúngicas. A rápida disponibilidade de resultados deve permitir administração precoce de tratamento antimicrobiano direcionado e também redução do tempo de internamento e custos associados. Uma terapia adequada também limita o uso de antifúngicos e o desenvolvimento de resistência. Vários estudos mostraram que o uso de MALDI-TOF MS diminui o tempo para a identificação do organismo associado a uma terapia antibiótica efetiva (Pfaller et al., 2013).

Com isso, estudos vêm empregando a investigação epidemiológica combinada com a epidemiologia molecular, sendo útil para a identificação de comunidade ou Infecções Relacionadas com Assistência a Saúde (IRAS) a fim de encontrar a fonte de transmissão e surtos. Dessa maneira, o método de genotipagem que tem sido empregado para estudar a epidemiologia molecular de espécies de *Candida* (Pfaller et al., 2013).

Observa-se que a disseminação dos determinantes de resistência antifúngica, vem sendo considerada uma ameaça para a população e uma prioridade entre os desafios da saúde mundial. Diante disso, se faz necessário investimentos em educação, saúde pública e saneamento. Com a mudança da epidemiologia e o aparecimento da resistência antifúngica essas informações, podem planejar estratégias para a prevenção de infecções e prevenção da disseminação da resistência (Vella et al., 2013).

Diante disso, o trabalho objetiva diagnosticar os casos de candidemia em pacientes críticos da Unidade de Saúde Pública Terciária e propor nova metodologia para detecção rápida de alterações espectrais que determinam resistência antifúngica

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. INFECÇÕES RELACIONADAS COM ASSISTÊNCIA A SAÚDE POR LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*

Ao longo dos anos, observa-se uma crescente incidência de infecções por gênero *Candida*, tendo como um dos principais fatores o aumento de pacientes imunodeprimidos graves. Epidemias de aquisição Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS), transplante de órgãos, quimioterapia e outros fatores iatrogênicos contribuíram para criar uma população de indivíduos extremamente vulneráveis a infecções fúngicas em particular. A previsão do resultado clínico de uma infecção fúngica sistêmica é quase sempre uma tarefa muito difícil e a resistência a drogas antifúngicas é apenas um dos muitos fatores que contribuem para o fracasso terapêutico (Pfaller et al., 2013; Silva et al., 2015).

Na verdade, em adição aos fatores relacionados ao hospedeiro (por exemplo, estado imune, local e gravidade de infecção), a identificação adequada do agente causador da doença se torna um fator muito importante. No entanto, como muitas vezes acontece em laboratórios de microbiologia clínica, algumas espécies de fungos são incorretamente identificadas, especialmente quando são utilizados

sistemas fenotípicos automatizados (Ghannoum et al., 2009; Idelevich et al., 2014; Lima-Neto et al., 2014; Wang et al., 2014).

Com isso, nos últimos anos, observa-se uma importante mudança na etiologia da candidíase invasiva em diferentes grupos de pacientes e condições hospitalares distintas. Os motivos desta mudança não estão completamente compreendidos, mas vários fatores foram associados à candidemia dependendo das espécies envolvidas. *Candida albicans* ainda é a principal espécie patogênica do gênero. Entre as espécies de *Candida* não-*albicans* isolada, destaca-se a *Candida glabrata* que surgiu como um dos agentes patogênicos oportunistas mais importantes, capaz de infectar uma variedade de locais do corpo. Enquanto *Candida parapsilosis* representa muitas vezes a segunda espécie de *Candida* mais comumente isolada das culturas de sangue em muitas áreas do mundo, especialmente nos Países sul americanos, europeus e países mediterrânicos da África (Pfaller et al., 2013).

Outras espécies como *Candida kefyr*, *Candida rugosa*, *Candida guilliermondii* e *Candida famata* raramente são encontrados em amostras clínicas, embora se tenha vários casos clínicos que descrevem as infecções causadas por essas espécies incomuns de *Candida*. Uma característica importante de algumas espécies, como *C. glabrata* e *C. krusei*, é a sua menor susceptibilidade a fluconazol e outros agentes antifúngicos, o que pode dificultar a abordagem terapêutica da candidemia (Xiao et al., 2014).

Além disso, a candidemia não só aumenta a mortalidade do paciente, mas também estende o período de permanência hospitalar e aumenta o custo dos cuidados médicos. Apesar da introdução de novos agentes antifúngicos, a infecção continua a ser uma doença grave associada a mortalidade. Por isso, as mudanças nas práticas clínicas ocorrem com terapias antimicóticas profiláticas e empíricas em pacientes de alto risco (Pfaller et al., 2013).

É notória a preocupação de médicos e profissionais da saúde com o quadro clínico dos pacientes com Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde (IRAS) por alguma espécie do gênero *Candida*, já que são agentes comensais, causadores de infecções oportunistas principalmente em recém-nascidos, como também adultos internados em UTI. Segundo Silva et al. (2015), espécies de *Candida* tem sido o terceiro microrganismo isolado de sangue responsável por causar sepsis em neonatos.

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

2.2. COMPLEXO *Candida parapsilosis*

A *Candida parapsilosis* foi isolada pela primeira vez por Ashford como uma espécie de *Monilia* que era incapaz de fermentar maltose a partir das fezes de um paciente com diarreia em Porto Rico em 1928 (ASHFORD et al., 1928). A espécie foi nomeada *Monilia parapsilosis* para distingui-lo do isolado mais comum, *Monilia psilosis*, conhecido na atualidade como *C. albicans*. Inicialmente *C. parapsilosis* foi identificada como o agente de um caso fatal de endocardite em um usuário de drogas intravenosas em 1940 (Joachim; Polayes, 1940).

C. parapsilosis é um patógeno humano oportunista, cuja incidência em candidíase clinicamente diagnosticada aumentou dramaticamente no passado. Devido à sua distribuição mundial e seu papel relevante como agente etiológico de candidíase invasiva, atualmente surgiram muitos estudos relacionando essa levedura para esclarecer sua ecologia, epidemiologia, mecanismos virulência e biologia molecular. No passado, as características genéticas de *C. parapsilosis* foram amplamente investigadas por causa da heterogeneidade intrínseca e incomum frequentemente demonstrados por isolados clínicos que há muito tempo foram

classificados em três biótipos diferentes chamados grupos I, II e III (Tavanti et al., 2005).

No entanto, o uso da sequência de multilocus (MLST) mostrou que as diferenças genéticas entre esses grupos estavam marcadas demais para continuar a considerar este fungo e seus biótipos como uma única e homogênea espécie de *Candida*. Foi, portanto, decidido para tratá-los como um complexo crítico ao qual as duas novas propostas espécies pertencentes a *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis* (Tavanti et al., 2005).

Por ser um agente comensal, infecções por *C. parapsilosis* estão relacionadas com a capacidade que esse microrganismo possui de crescer na nutrição parenteral, formar biofilmes em catéteres e outros dispositivos implantados, para propagação nosocomial por transporte de mãos e persistência no ambiente hospitalar. (Hinrichsen et al., 2018).

As espécies do complexo *C. parapsilosis* demonstram semelhanças fenotípicas, no entanto, possuem diferenças em relação à virulência, sendo correlacionada com características epidemiológicas. Dessa maneira, o complexo *C. parapsilosis* tem sido uma das principais espécies em estudos epidemiológicos e análises baseadas em DNA, os quais mostram que 1-10 % das infecções e colonizações são causadas por *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*. Dentre os estudos que avaliam a virulência do complexo *C. parapsilosis*, observa-se que a *C. metapsilosis* tem sido a espécie que possui menor invasão e a menor prevalência em infecções humanas, enquanto que *C. orthopsilosis* e a *C. parapsilosis strictu sensu* são capazes de invadir, colonizar e de infectar de forma mais grave o hospedeiro. Das três espécies, a *C. parapsilosis* é o patógeno mais frequente isolado em infecções invasivas. É importante ressaltar que o complexo *C. parapsilosis* é considerado o segundo agente de candidemia mais importante na América Latina (Gonçalves et al., 2010; Bertini et al., 2013; Cordeiro et al., 2014).

A literatura atual contém poucos dados relativos às distribuições e susceptibilidades aos antifúngicos destas espécies de *Candida*. O surgimento de cepas de *C. parapsilosis* com sensibilidade reduzida aos azólicos e que podem ser transmitidas por todo o ambiente hospitalar pode estar relacionada com a utilização extensiva de fluconazol em combinação com a higiene das mãos inadequadas e cuidados com o cateter venoso central em uma população de pacientes internados em UTIs. Além disso, sabe-se que a formação do biofilme apresenta níveis elevados

de resistência aos antifúngicos mais comumente utilizados. Cerca de 60% das infecções hospitalares estão associadas a microrganismos oportunistas que possuem capacidade de adesão e formação de biofilme em dispositivos médicos e implantes cirúrgicos (Pires et al., 2011; Silva et al., 2013; Xiao et al., 2014).

2.3. DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO

O diagnóstico clínico e laboratorial deve ser rápido e confiável, tendo em vista a gravidade de uma candidemia, para que o tratamento possa ser iniciado oportunamente na tentativa de minimizar as elevadas taxas de mortalidade. (Hinrichsen et al., 2008; Mikulska et al., 2010; Dannaoui, 2013; Hazen, 2013).

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

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

A completa identificação taxonômica e fenotípica é demorada, podem levar vários dias para que o laudo laboratorial seja liberado, e devido a essa morosidade nos últimos anos se incorporou a espectrometria de massas para identificação de isolados clínicos, possibilitando um resultado rápido e confiável (Yaman et al., 2012).

2.4. IDENTIFICAÇÃO POR MALDI-TOF MS

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

O princípio do MALDI-TOF MS era que moléculas de massas com cerca de 500-1000 Da não pudessem ser isoladas fora dos ambientes naturais, nem utilizar análises á vácuo em um espectrômetro de massas, sem excessiva fragmentação. A primeira tentativa de identificar microorganismos usando a espectrometria massa foi realizada em 1975 por Anhalt e Fenselau . No entanto, essas experiências sofreram resultados irreproduzidos devido às variabilidades causadas por condições de crescimento. Durante o final da década de 1960, Beckey introduziu a primeira técnica a Field Desorption (FD) abrindo o início da *Mass Spectrometry* (MS) ou espectrometria de massas de moléculas biorgânicas. Vastola e Pirone em 1966, já tinham demonstrado espectros de compostos orgânicos, através do *Time of Flight* (TOF) espectrômetro de massa de tempo de voo.

Assim, no ano de 1974 R. Marcfarlane publicou o princípio da dessorção, através de um bombardeamento de moléculas orgânicas com fissão de produtos do *Plasma Desorption* (PD). Surgiram assim, as primeiras tentativas de utilizar radiação a laser a fim de gerar íons para a espectrometria de massa, essas análises foram publicadas apenas alguns anos após a invenção do laser. Posteriormente, A.

Benninghoven em 1975 propôs o *Secondary Ion Mass Spectrometry* (SIMS). A tentativa mais antiga de identificação foi relatada por Anhalt e Fenselau no ano de 1975, eles fizeram uma combinação de pirólise e espectrometria de massas, a fim de identificar bactérias Gram-negativas, sendo analisadas apenas moléculas de baixo peso. Em 1981, M. Barber introduziu o SIMS de compostos orgânicos dissolvidos em glicerol, através do *Fast Atom Bombardment* (FAB). Com as primeiras tentativas de dessorver amostras orgânicas através da irradiação a laser foi que surgiu o conceito de uma matriz, a fim de facilitar a dessorção e o surgimento da nuvem de íons (Marvin et al., 2003; Hillenkamp e Peter-Katalinic, 2007).

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

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

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

Os fundamentos da técnica de MALDI-TOF MS são a desabsorção/ionização de moléculas orgânicas intermediadas por uma matriz química. A matriz é um composto orgânico capaz de absorver radiação na região do espectro onde o laser opera. Após a cristalização da matriz junto a amostra, a placa é introduzida no espectrômetro de massas, onde é bombardeada com breves pulsos de laser, forma íons na fase gasosa com a fragmentação mínima e uma ionização suave, seguido de aceleração de partículas em um vácuo através de um campo eletromagnético. Os íons são separados de acordo com a "massa", onde a quantidade de tempo que cada partícula demora a atingir o detector "voando" através de um tubo, depende da razão entre a massa e a carga, ou o chamado "*Time of Flight*", e os resultados são exibidos como uma série de linhas (espectro), que correspondem a diferentes fragmentos que se fragmentam da molécula original (Tanaka, 2002; Nomura, 2015; Suarez et al., 2015).

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

Ao analisar o padrão de fragmentos é possível deduzir a massa molecular da molécula. Após a análise das proteínas constituintes das cepas, o espectro de massa é gerado e interpretado como um fingerprint celular ou impressão digital de peptídeos e proteínas, os quais são únicos para o organismo a ser analisado e também pode ser denominado como mapeamento de massa dos peptídeos. Esta

abordagem se tornou bastante eficaz na identificação de proteínas, e se baseia na medição precisa da massa de um grupo peptídico derivado de uma proteína específica seguida por proteólise. O espectro de massas de peptídeos identificados é exclusivo para cada tipo de microrganismo (Yaman et al., 2012; Hrabáček et al., 2013; Panda et al., 2015).

Esta técnica vem sendo empregada para identificação de leveduras onde, quantifica em segundos com precisão proteínas em abundância com massa entre 2.000 a 20.000 Da (valores definidos pelo operador) presente na amostra como exemplo para identificação de leveduras. As proteínas detectadas correspondem às proteínas celulares fúngicas, nomeadamente as proteínas ribossomais, embora outras proteínas citosólicas altamente abundantes também podem ser detectadas (Marvin et al., 2003; Martínez-Lamas et al., 2011; Alanio, 2013; Nomura, 2015; Suarez et al., 2015).

Com sistemas comercialmente disponíveis a identificação é então determinada usando o software desenvolvido que compara o perfil espectral do microrganismo com uma base de dados de referência. Atualmente existem quatro sistemas de MALDI-TOF MS comercialmente disponíveis para a identificação microbiana: Bruker MALDI Biotyper (Bruker Daltonics), bioMérieux VITEK MS (bioMérieux), Ettan MALDI-TOF (Amersham Biosciences) e ASTA MicroIDSys system (ASTA Inc., Suwon, South Korea). Uma vez que o espectro obtido por MALDI-TOF MS geralmente não é completamente idêntico aos da base de dados, um "valor score" (Bruker) ou "valor confiança" é atribuído com base nas semelhanças do organismo de testado com os espectros de referência (Hrabáček et al., 2013).

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

têm sido identificadas com sucesso por essa técnica (Yaman et al., 2012; Hrabáček et al., 2013; Panda et al., 2015).

2.5. SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA

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

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

A partir do conhecimento sobre a patogenicidade da levedura, novas terapêuticas têm sido estudadas para auxiliar o tratamento das infecções. Os antifúngicos de escolha para o tratamento das candidíases podem ser administrados na forma oral e intravenosa, dependendo do fármaco escolhido para a terapêutica. Sendo assim, a escolha de um fármaco para o tratamento é instituída pelo clínico,

que avaliará a resposta imunológica do paciente frente à infecção (Pfaller et al., 2008; Ramesh et al., 2011; Fu et al., 2012; Shibata et al., 2012).

Portanto, o diagnóstico rápido e preciso indica o melhor antifúngico a ser utilizado no tratamento dessas infecções oportunistas. A determinação da melhor terapêutica é dada a partir da realização de testes de sensibilidade antifúngica *in vitro*, o que irá determinar a resistência ou sensibilidade do fungo frente a um painel de moléculas bioativas, que propiciará uma terapia antifúngica eficaz (Seghir et al., 2014). O desenvolvimento de um agente antifúngico é um desafio porque há poucos alvos potenciais de ação que não sejam compartilhados entre os fungos e a espécie humana. O antifúngico ideal deve ter um amplo espectro de atividade, ter ação fungicida ao invés de fungistática, estar disponível em formulações oral e parenteral, causar poucas interações medicamentosas, ser seguro em doses eficazes, ter baixo custo-efetivo e ser estável à resistência microbiana. Além disso, as terapias antifúngicas atualmente disponíveis dependem da melhora da deficiência imunológica, o que em muitos pacientes não acontece (Seghir et al., 2014; Shibata et al., 2012).

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

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

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

Devido o elevado número Infecções Fúngicas Invasivas (IFIs), e o aumento da resistência antifúngica, a realização de testes de susceptibilidade in vitro têm se tornado um teste preditivo de grande valor terapêutico, já que tais testes possibilitam à seleção de agentes eficazes a fim de combater os fungos causadores de IFIs. Os testes de susceptibilidade antifúngica são padronizados internacionalmente pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e são baseados na medição do crescimento fúngico em diferentes concentrações do fármaco, de modo a determinar faixas de referências para a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de um determinado isolado clínico. Dessa maneira, o valor in vitro é determinado a fim de prever a eficácia terapêutica. Esses valores in vitro foram definidos a partir de correlações in vivo, os quais determinam os pontos de corte (*breakpoints*) para a interpretação dos resultados dos isolados clínicos, fornecendo um indicador útil a fim de orientar uma escolha terapêutica adequada (CLSI, 2008; Marinach et al., 2009; Pfaller; Diekema, 2012).

De acordo com o documento M27-A3, a CIM é definida como a menor concentração do antifúngico capaz de promover aproximadamente 50% de inibição do crescimento para as equinocandinas em relação ao inóculo não exposto. O documento M27-A3 recomenda que a leitura do teste para espécies de *Candida* seja realizada após 24 horas frente as equinocandinas, porém após 48 horas frente aos azólicos, devido ao crescimento indefinido (denominado *trailing*) que seria uma inibição parcial promovida pelo fármaco ao decorrer das primeiras horas do teste em todas as concentrações estabelecidas. Esse tipo de ocorrência pode ser observado em alguns isolados clínicos, que com 24 horas parecem sensíveis e com 48 horas apresentam-se como resistentes.

Portanto, pesquisas apontaram que isolados com esse tipo de comportamento devem ser classificados como sensíveis ao invés de resistentes devido ao crescimento indefinido dos mesmos. No ano de 2012 foi determinado através do quarto suplemento do documento M27-A3, denominado M27-S4, que os valores dos resultados para leitura dos testes com as equinocandinas serão categorizados como sensível (S), resistente (R) ou intermediário (I). Além dessa mudança, o suplemento M27-S4 estabeleceu breakpoints espécie-específicos para cada espécie de *Candida* (Eschenauer et al., 2007; CLSI, 2008; CLSI, 2012; Pfaller e Diekema 2012; Pfaller et al., 2013).

2.6. EQUINOCANDINAS

O surgimento das equinocandinas veio a propor um mecanismo de ação único, tendo uma grande eficácia *in vivo*. A identificação dessa classe de antifúngicos deu-se no ano de 1974 com a anidulafungina. Investigações posteriores levaram em 1979 a descoberta da caspofungina, e a última molécula a ser sintetizada foi a micafungina em 1990, a partir do composto FK463. Esses fármacos só foram aprovados no ano de 2001 pelo *Food and Drug Administration* (FDA), sendo a caspofungina o primeiro comercialmente disponível, seguido em 2005 pela micafungina e em 2006 a anidulafungina (Eschenauer et al., 2007; Cortés e Russi, 2011; Wilke, 2011).

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

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

agentes antifúngicos mais utilizados, os quais têm como alvo celular o ergosterol sendo esse, um esterol predominante dentro das membranas das células dos fungos (Aderiyé e Oluwole, 2015; Montagna et al., 2015).

A caspofungina foi à primeira equinocandina licenciada, sendo indicada para candidíase esofágica, candidemia, candidíase invasiva e terapia empírica em pacientes com neutropenia febril, a resposta terapêutica geralmente é comparada com a anfotericina B e fluconazol. A micafungina foi aprovada para o uso em candidíase esofágica, candidíase invasiva incluindo candidemia e para profilaxia de infecções por *Candida* em pacientes submetidos a Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH). Atualmente as indicações para o uso da anidulafungina são candidíase esofágica, candidemia e candidíase invasiva (Perlin, 2007; Cortés e Russi, 2011; Wilke, 2011; Carolis et al., 2012).

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

Atividade das equinocandinas frente *Candida* spp. mostra que as CIMs são bem mais baixas que anfotericina B e fluconazol, com exceção de *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*, contra o qual eles são semelhantes. O CLSI (2012) estabeleceu no suplemento M27-S4 orientações para a interpretação da CIM para cada espécie de *Candida*. Portanto, os testes de susceptibilidade antifúngica in vitro de *Candida parapsilosis* frente às equinocandinas é dita como sensível com o valor $\leq 2 \mu\text{g/mL}$,

intermediária com o valor de 4 µg/mL e resistente com o valor ≥ 8 µg/mL, estabelecendo então breakpoints para diferenciar mutantes resistentes de isolados sensíveis (Pfaller et al., 2008; CLSI, 2012; Cordeiro et al., 2014; Idelevich et al., 2014).

2.7. DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA POR MALDI-TOF MS

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

Griffin et al. (2012), mostra alterações nos espectros de massa de cepas de *Staphylococcus aureus* no teste de susceptibilidade a meticilina. Além disso, MALDI-TOF MS foi capaz de detectar a resistência a teicoplanina glicopéptido. No ano seguinte, a técnica também foi usada para a análise genética determinando resistência *Streptococcus pneumoniae* a fluoroquinolonas, através da detecção de mutações nas estruturas alvo, antes isso só era capaz de ser detectado fenotipicamente (Saracli et al., 2015). Em 2013, Hrabák et al. utilizaram o MALDI-TOF MS para monitorizar a atividade in vitro de carbapenemases, isto é, o produto de degradação do carbapenem hidrolisado e descarboxilado.

Pesquisas atuais mostram a possibilidade de utilizar sistemas de espectrometria de massa (MS), especificamente MALDI-TOF a fim de identificar certos mecanismos de resistência enfatizando as vantagens na utilização. Com isso deve ser destacado que o custo de cada determinação é claramente menor do que as técnicas moleculares clássicas para a detecção de genes envolvidos na resistência. Além disso, a detecção de resistência por MALDI-TOF reduz o tempo de

obtenção de resultados em comparação com métodos de rotina utilizados com mais frequência (Hrabák et al., 2013; Zboromyrska et al., 2014).

Em contraponto ao uso do MALDI-TOF, estudos evidenciam uma falta de correlação dos testes de sensibilidade antifúngica *in vitro* e a clínica *in vivo*, contudo sabe-se que para uma terapêutica eficaz em pacientes com infecções fúngicas é necessária a realização de testes laboratoriais *in vitro*, a fim de determinar a concentração do antifúngico a ser utilizado no tratamento. Dentro desse contexto, existe a discordância dos testes de susceptibilidade, que pode conter um erro de classificação de uma cepa resistente categorizada como sensível ou vice-versa. A partir disso, emerge a ideia do desenvolvimento de um teste preciso e confiável possibilitando benefícios econômicos significativos, bem como melhoria na qualidade da assistência ao paciente (Marinach et al., 2009; Carolis et al., 2012; Saracli et al., 2015).

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

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

No ano de 2012, Carolis e colaboradores avaliaram 44 isolados fúngicos com e sem resistência associada a mutações FKS1. No teste foram incluídas 34 espécies do gênero *Candida* incluindo, 14 espécies de *Candida albicans*, quatro *Candida parapsilosis*, quatro *C. krusei* e dez isolados de *Aspergillus* incluindo, seis *Aspergillus fumigatus* e quatro *Aspergillus flavus*, para o teste também foram incluídas cepas controle *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258. As

leveduras foram expostas em concentrações de 64-0.008 µg/mL frente a caspofungina e incubadas por 37°C sob agitação por 15 horas. Em seguida foi observada a Mudança mínima no Perfil Proteico e a partir desse, foi criada uma Matriz através dos Índices de Correlação dos Compostos (ICC). Com isso, eles confirmaram as descobertas anteriores, que mostram que o TSA pelo MALDI-TOF MS é uma ferramenta reprodutível e confiável para teste de susceptibilidade antifúngica.

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

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

No geral, a concordância essencial entre MALDI-TOF MS e CLSI variou entre 54% e 97%, e foi maior para posaconazol contra *C. glabrata*. A reprodutibilidade de o ensaio de MALDI-TOF MS variou entre 54,3 e 82,9% e foi melhor para o fluconazol contra *C. albicans* e posaconazol contra *C. glabrata*. A reprodutibilidade também foi mais elevada para isolados de *C. glabrata* em comparação com *C. albicans* e *C. tropicalis*. Estes resultados demonstram que a MALDI-TOF MS ser usado para determinar simultaneamente as espécies de *Candida* e classificação como sensíveis

ou resistentes aos antifúngicos triazólicos. Assim, eles concluíram que os resultados demonstram que o Teste de Susceptibilidade Antifúngica pelo MALDI-TOF MS pode ser usado para determinar a classificação de sensibilidade ou resistência frente as espécies de *Candida* (Saracli et al., 2015).

Recentemente, o TSA pelo MALDI-TOF MS baseado na detecção de alterações no espectrais após uma incubação de 3 horas com antifúngicos convencionais foi realizado para testar um painel de 80 isolados de *C. glabrata* anidulafungina e fluconazol. Em comparação com o método padronizado pelo CLSI para as leveduras testadas frente a anidulafungina 58/58 isolados foram sensíveis representando (100%), foram considerados como resistentes 11/22 isolados representando (50%). Das leveduras testadas frente ao fluconazol, 40/41 foram consideradas como sensíveis representando (97,6%) e 37/39 isolados foram considerados como resistentes, representando (94,9%). Os testes foram repetidos para os 11 isolados resistentes com diferentes tempos de incubação (6, 9 e 12 horas), no entanto, dois isolados permaneceram sem solução para anidulafungina. Além disso, observou-se que com 15 horas, houve uma maior concordância entre as duas metodologias. Assim com os padrões de análises, necessitam de mais estudos (Vella et al., 2013).

3. ARTIGO 2: Candidemia in pediatric patient with microcephaly: first description in Brazil

Abstract

Background: In 2015, the northeast of Brazil suffered an outbreak of microcephaly in newborns attributed to gestational infection caused by Zika virus (ZIKV). According to the Brazilian Ministry of Health, microcephaly may be accompanied by other disorders such as epilepsy, cerebral palsy, delays in cognitive, motor and speech development, vision and hearing problems. In the last two decades, the number of cases of opportunistic fungal infections, mainly caused by *Candida* species, has increased worldwide. Thus, candidemia is the main invasive fungal infection in critically ill patients, often caused by non-*Candida albicans* species.

Case presentation: A two-year-old male, 7,9 Kg patient with microcephaly and delayed neuropsychomotor development secondary to neonatal hypoxia, was admitted 16/05/2016 in tertiary public hospital with a low-grade fever for fifteen days and respiratory distress three days after admission associated with a respiratory tract infection. After twenty days, blood culture was positive for *Candida* sp., and fluconazole (12 mg/Kg/day) was administered for 15 days. Despite the antifungal regimen, there was a complication of the clinical picture, with thrombocytopenia and persistent blood culture for *Candida* sp. Thus, the antifungal treatment switched to Amphotericin B deoxycholate (3mg/Kg/day). On the twenty-seventh day, blood culture was negative. The patient persisted with a severe condition, using dobutamine 10mic/Kg and dopamine 3.5mic/Kg, keeping the heart rate between 100-115 bpm. Due to the severity of the patient, he was transferred in 27/05/2016 to another hospital referring to the assistance of patients with microcephaly.

Conclusion: It is known that in cases of severe microcephaly, babies need specific care and treatment to treat other health problems. This assistance includes speech therapy, occupational therapy and physical therapy exercises. Medications are also included to treat seizures or other symptoms.

Introduction

Microcephaly is a rare neurological disorder that can occur as an isolated finding or syndromic condition. Patients with primary genetic microcephaly are almost always born with below normal head circumference [1].

Syndromic microcephaly is often related to a large number of conditions, mainly facial dysmorphism, and can be diagnosed pre- or postnatally. Several genetic and environmental causes, including congenital infections, genetic syndromes and isolated malformations in the central nervous system characterize the heterogeneity of this disease [2].

In 2015, the northeast of Brazil suffered an outbreak of microcephaly in newborns attributed to gestational infection caused by Zika virus (ZIKV). In order to identify the causes of microcephaly, the Ministry of Health of Brazil implemented a public health surveillance system [3,4]. In 2016, the World Health Organization (WHO) declared a public health emergency of international impact associated with ZIKV infection in Latin America, and its possible association with microcephaly [5,2]. According to the Brazilian Ministry of Health, microcephaly may be accompanied by other disorders such as epilepsy, cerebral palsy, delays in cognitive, motor and speech development, vision and hearing problems. Therefore, it is necessary that treatments start as soon as possible, in order to improve pediatric patients development and quality of life. It is known that patients with microcephaly have a greater predisposition to muscle and respiratory problems that can lead to opportunistic infections [3].

In the last two decades, the number of cases of opportunistic fungal infections, mainly caused by *Candida* species, has increased worldwide. Thus, candidemia is the main invasive fungal infection in critically ill patients, often caused by non-*Candida albicans* species [6,7]. According to Soares et al. [8] and Zuza-Alves et al. [9], *Candida tropicalis* has been the second most isolated non-*Candida albicans* species in neonates with candidemia.

It is known that early diagnosis followed by control of fungal origin, such as removal of intravascular catheters, is essential. Similarly, the early initiation of antifungal therapy is extremely important [6]. Here in this study, we aimed to report a case of candidemia in a pediatric patient with microcephaly.

Case report

The draft of this report was approved by the Ethics Review Board of the Universidade Federal de Pernambuco, Brazil, under protocol number 1.979.057. In addition, written informed consent was given by the patient.

A two-year-old male, 7,9 Kg patient with microcephaly and delayed neuropsychomotor development secondary to neonatal hypoxia, was admitted 16/05/2016 in tertiary public hospital with a low-grade fever for fifteen days and respiratory distress three days after admission associated with a respiratory tract infection.

Therapy with ceftriaxone 100mg/kg was started, but with progressive worsening and a decline in general condition (persistent fever and episodes of generalized hypertonic seizure). Therefore, the antibiotic regimen was changed to meronem, vancomycin and metronidazole for 14 days. After twelve days, the patient progressed with a drop in general condition, clinical signs of septic shock, and volemic expansion with vasoactive drug (dopamine) was administered and clinical significant improvement was observed, with dopamine discontinued in 24 hours and clinical stability maintained.

After twenty days, blood culture was positive for *Candida* sp., and fluconazole (12 mg/Kg/day) was administered for 15 days. Despite the antifungal regimen, there was a complication of the clinical picture, with thrombocytopenia and persistent blood culture for *Candida* sp. Thus, the antifungal treatment switched to Amphotericin B deoxycholate (3mg/Kg/day). The patient evolved with worsening of the respiratory pattern, noninvasive ventilation was started, which it was progressively removed and the patient was kept in a Venturi mask after twenty-fifth days of hospitalization. However, he presented with hemodynamic instability and brachycardia on the twenty-sixth day, requiring vasoactive drugs: dobutamine (10 mic/Kg) and dopamine (3.5mic/Kg). Due to the worsening of the laboratory parameters (progressive thrombocytopenia), it was decided to change the scheme of Amphotericin B deoxycholate to liposomal Amphotericin B (3mg/Kg). On the twenty-seventh day, blood culture was negative. The patient persisted with a severe condition, using dobutamine 10mic/Kg and dopamine 3.5mic/Kg, keeping the heart rate between 100-115 bpm.

The patient's blood sample was sent to the Laboratory of Mycology from the Dermatology Service of Hospital of Clinics, where *Candida* clinical strain was isolated on Sabouraud-Dextrose agar and Brain-Heart Infusion agar, both kept at room

temperature and 37 °C for 24 hours. Proteomic identification using MALDI-TOF MS (MALDI Autoflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) was performed (Lima-Neto et al., 2014). The spectra, obtained in triplicate, identified the isolate as *Candida tropicalis* with a score above 2,000, according to Biotyper™ software database (Biotyper system, 3.1 version, Bruker Daltonics, USA/Germany). *In vitro* antifungal susceptibility test was carried out with amphotericin B, fluconazole, anidulafungin, caspofungin and micafungin, by the M27-A3 protocol (CLSI, 2008) [10] and M24-S4 supplement (CLSI 2012) [11], where by the clinical yeast was classified as susceptible to the five antifungal drugs. Due to the severity of the patient, he was transferred in 27/05/2016 to another hospital referring to the assistance of patients with microcephaly.

Discussion

Vargas et al. [5] reported that between 2010 and 2014 the Brazilian Live Birth Information System registered an average of 156 annual cases of microcephaly in Brazil. In 2015, this number rose to 1,247 registered cases, with the state of Pernambuco being the largest number of records with 646 cases. Microcephaly is related to genetic and chromosomal factors, environmental exposures in the prenatal or perinatal period, especially alcohol consumption, illicit drugs or teratogenic drugs, contact with chemical substances or ionizing radiation, metabolic disorders, and infectious diseases such as toxoplasmosis, rubella, cytomegalovirus, herpes and syphilis [2].

Vargas et al. [5] demonstrated in their study that among patients with microcephaly, only one was diagnosed with sepsis. In addition, it was observed other infectious associations such as bacterial conjunctivitis and syphilis with microcephaly. It is known that patients with microcephaly have a greater predisposition to acquire other diseases, which worsens the clinical picture.

It is observed that due to the lack of a rapid diagnosis for candidemia, most medical staff rely on routine cultures with low sensitivity. Thus, they begin the empirical treatment with previous exposure to antibacterials in patients admitted in ICU who have unexplained fever or sepsis, before establishing the correct diagnosis. Therefore, misdiagnosis or delays in diagnosis hinder effective antifungal therapy for treatment [6].

It is known that in cases of severe microcephaly, babies need specific care and treatment to treat other health problems. Early intervention helps in the development of babies with microcephaly from the first years of life, in order to maximize their physical and intellectual capacities. This assistance includes speech therapy, occupational therapy and physical therapy exercises. Medications are also included to treat seizures or other symptoms [3,6].

Conclusions

In October 2015, there was an unexpected increase in cases of microcephaly, mainly in the State of Pernambuco. Children with microcephaly have a greater predisposition to acquire infections, in addition to physiological disorders such as heart, respiratory, kidney problems, among others.

Candidemia because it is an opportunistic infection affects patients in hospitals, as well as patients who have other underlying diseases. It is known that late diagnosis and inadequate therapy are associated with a high mortality rate. Thus, a fast and accurate diagnosis can assist in patient survival, associated with a susceptibility test that will lead to the best treatment. Therefore, patients with microcephaly need specific care and treatment.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Written informed consent was obtained from the patient for publication of this case report.

Availability of data and materials

The authors agree to make the images and data described in the manuscript freely available for use.

Competing interests

All the authors declare they have no conflict of interests for this work.

Funding

The authors declare that this study received no financial support.

Authors' contributions

Laboratorial practice: AE, CI and RL-N. Concept: AE, CV, RN, and RL-N. Data collection and processing: AE, CI and RL-N. Analysis or interpretation: AE, RN and RL-N. Literature search: AE, CI, CV, RN and RL-N. Writing: AE, CI, RN and RL-N. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

The authors wish to thank the FACEPE/Brazil for the scholarship of Ana Emília de Medeiros Roberto (IBPG-1444-2.12/15). The authors also would like to thank the Center for Strategic Technologies Northeastern (CETENE, MCTI, Brazil) for MALDI-TOF MS analyses and Hospital das Clínicas de Pernambuco (UFPE, Brazil) for providing patients' biological sample.

Reference:

- 1 Chan, MY, Smith, MA. Infections in Pregnancy. *Comprehensive Toxicology*. 2018. 5: 232–249.
- 2 Leibovitz, Z. Lerman-Sagie, T. Diagnostic approach to fetal microcephaly. *European Journal of Paediatric Neurology*. 2018. 22: 935-943.
- 3 BRASIL. Ministério da Saúde. Microcefalia: causas, sintomas, tratamento e prevenção. Brasília: (Ministério da Saúde), 2016. O6
- 4 Araújo, TVB, Ximenes, RAA, Miranda-Filho, DB, Souza, WV, Montarroyos, UR, Melo, APL, Valongueiro, S, Albuquerque, MFPM, Braga, C, Filho, SPB, Cordeiro, MT, Vazquez, E, Cruz, DDCS, Henriques, CMP, Bezerra, LCA, Castanha, PM DS, Dhalia, R, Marques-Júnior, ETA, Martelli, CMT, Rodrigues, LC. Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: final report of a case-control study. *Lancet. Infect. Dis*. 2018. 18: 328-336.
- 5 Vargas, A, Saad, E, Dimech, GS, Santos, RH, Sivini, MAVC, Albuquerque, LC, Lima, PMS, Barreto, IC, Andrade, ME, Estima, NM, Carvalho, PI, Azevedo, RSA, Vasconcelos, RCO, Assunção, RS, Frutuoso, LCV, Carmo, GMI, Souza, PB,

Wada, MY, Oliveira, WK, Henriques, CMP, Percio, J. Características dos primeiros casos de microcefalia possivelmente relacionados ao vírus Zika notificados na Região Metropolitana de Recife, Pernambuco. *Epidemiol. Serv. Saúde*. 2016. 25: 1-10.

6 Pappas, P, Lionakis, M, Arendrup, M, Ostrosky-Zeichner, L, Kullberg, BJ. Invasive candidiasis. **Nat. Rev. Dis. Primers**. 2018. v. 4. n.18026.

7 Soares, L. P. M. A.; Carneiro, J. C. R. S.; Oliveira, R. T. Infecções da corrente sanguínea por *Candida* spp. em unidade neonatal de hospital de ensino da Região Norte do Brasil: estudo dos fatores de risco. **Rev Pan-Amaz Saúde**. 2013. v.4. n.3. doi: 10.5123/S2176-62232013000300003.

8 Zuza-Alves DL, Silva-Rocha WP and Chaves GM (2017) An Update on *Candida tropicalis* Based on Basic and Clinical Approaches. *Front. Microbiol.* 8:1927. doi: 10.3389/fmicb.2017.01927

9 da Silva RB, Neves RP, Hinrichsen SL, de Lima-Neto RG. Candidemia in a public hospital in Northeastern Brazil: Epidemiological features and risk factors in critically ill patients. *Rev Iberoam Micol.* 2019 Oct-Dec;36(4):181-185. doi: 10.1016/j.riam.2019.06.003. Epub 2019 Nov 20. PMID: 31759839.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A incidência de candidemia por *Candida albicans* ainda é alta, no entanto, outras espécies de *Candida* não- *albicans* também tem sido frequente.
- Mesmo com novos diagnósticos e antifúngicos eficazes os casos de candidemia ainda persistem em âmbito hospitalar.
- Em relação ao tempo de incubação do TSA por MALDI-TOF MS é de três horas enquanto pelo CLSI é de quarenta e oito horas.
- A candidemia, por ser uma infecção oportunista, afeta pacientes hospitalizados, assim como pacientes portadores de outras doenças de base.
- Sabe-se que o diagnóstico tardio e a terapia inadequada estão associados a uma alta taxa de mortalidade.

- O diagnóstico rápido e preciso indica o melhor antifúngico a ser utilizado no tratamento de infecções oportunistas.
- Sabe-se que nos casos de microcefalia grave, os bebês precisam de cuidados e tratamentos específicos para tratar outros problemas de saúde. A intervenção precoce auxilia no desenvolvimento dos bebês com microcefalia desde os primeiros anos de vida, de forma a maximizar suas capacidades físicas e intelectuais.

REFERÊNCIAS

- ADERIYE, B. I., OLUWOLE, O. A. Antifungal Agents That Target Fungal Cell Wall Components: A Review. *Agricultural and Biological Sciences Journal* 1: 206-216. 2015.
- ALANIO, A. 2013. La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en mycologie clinique: avantages réels, écueils potentiels. *Journal des Anti-infectieux* 2013: 71-82.
- ANDRADE, J. G., FREITAS, H. F., CASTILHO, M. S. 2012. Estudos de QSAR 2D baseados em descritores topológicos e fragmentos moleculares para uma série de derivados azólicos ativos contra *Candida albicans*. *Química Nova* 35: 466-472.
- BERTINI, A., BERNARDIS, F.; HENSGENS, L. A.M.; SANDINI, S., SENESI, S., TAVANTI, A. Comparison of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* adhesive properties and pathogenicity. *International Journal of Medical Microbiology* 303: 98– 103. 2013.
- BOFF, E., LOPES, P. G. M., SPADER, T., SCHEID, L. A., LORETO, E., DAL FORNO, N. F., AQUINO, V., SEVERO, L. C., SANTURIO, J. M., ALVES, S. H.. Reavaliação da suscetibilidade de *Candida* à anfotericina B: estudo comparativo com isolados de três hospitais do Estado do Rio Grande do Sul. *Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41: 36-40. 2008
- BOUGNOUX, M., ANGEBAULT, C., LETO, J., BERETTI, J. Identification des levures par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. *Revue Francophone des Laboratoires* 2013: 63-69. 2013.
- CAROLIS, E., VELLA, A., FLORIO, A. R.; POSTERARO, P., PERLIN, DAVID S., SANGUINETTI, M., POSTERARO, B. Use of matrix-assisted laser desorption ionization- time of flight mass spectrometry for caspofungin susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology* 50: 2479-2483. 2012.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Testing of Yeasts Approved standard document M27-A3, Wayne, PA, USA: CLSI 28: 1-25. 2008.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2012; Reference Method for Broth Dilution Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement, Wayne, PA, USA: CLSI 32: 1-23, dez. 2012.
- CORDEIRO, R. A., MACEDO, R. B., TEIXEIRA, C. E. C.; MARQUES, F. J. F., BANDEIRA, T. J. P. G., MOREIRA, J. L. B., BRILHANTE, R. S. N., ROCHA, M. F. G., SIDRIM, J. J. C. The calcineurin inhibitor cyclosporin A exhibits synergism with antifungals against *Candida parapsilosis* species complex. *Journal of Medical Microbiology* 63: 963-944. 2014.

CORTÉS, J. A. L.; RUSSI, J. A. N. Equinocandinas. *Rev. Chil. Infect.* 28: 529-536. 2011.

DANNAOUI, E.. Résistance des *Candida* aux antifongiques : détection et mécanismes. *Revue Francophone des Laboratoires* 43: 71-77. 2013

EL-MASHAD, N., MAHMOUD, M. T.. Commercial tests for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida* species compared to standard (NCCLS) broth microdilution. *International Journal of Medicine and Medical Sciences* 3: 100-104. 2011

ESCHENAUER, G., DEPESTEL, D. D., CARVER, P. L. Comparison of echinocandin antifungals. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 3: 71-97. 2007.

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

FU, M., SORDI, L., MÜHLSCHLEGEL, F. A. Functional characterization of the small heat shock protein Hsp12p from *Candida albicans*. *PLOS ONE*, 7:1-10. 2012.

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

GIOLO, M. P., SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial* 46: 225-234. 2014.

GONÇALVES, S. S., AMORIM, C. S., NUCCI, M., PADOVAN, A. C. B., BRIONES, M. R. S., MELO, A. S. A., COLOMBO, A. L. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. *Clinical Microbiology and Infection* 16: 885-887. 2010.

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

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

HINRICHSEN, S. L., FALCÃO, E., VILELLA, T. A. S., COLOMBO, A. L., NUCCI, M., MOURA, L., RÉGO, L., LIRA, C., ALMEIDA, L. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41: 394-398. 2008.

IDELEVICH, E. A., GRUNEWALD, C. M., LLENWEBER, J. W., BECKER, K. Rapid Identification and Susceptibility Testing of *Candida* spp. from Positive Blood Cultures by Combination of Direct MALDI-TOF Mass Spectrometry and Direct Inoculation of Vitek 2. *PLOS ONE* 9: 12. 2014.

JOACHIM H., POLAYES S. Subacute endocarditis and systemic mycosis (monilia). *Systemic Mycosis* 115: 205-208. 1940.

LANTERNIER, F.; LORTHOLARY, O. 2010. Anidulafungine une nouvelle option thérapeutique dans les candidoses systémiques. *Médecine et maladies infectieuses* 40: 440-448.

MARINACH, C., ALANIO, A., PALOUS, M., KWASEK, S., FEKKAR, A., BROSSAS, J., BRUN, S., SNOUNU, G., HENNEQUIN, C., SANGLAND, D., DATRY, A., GOLMARD, J., MAZIER, D. MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: the example of *Candida albicans* and fluconazole. *Proteomics* 9: 4627-4631. 2009.

MARTÍNEZ-LAMAS, L., MOLINO, M. L. P., PARDO, F., VARELA, E., REGUEIRO, B. J. Espectrometría de masas matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight vs. metodología convencional en la identificación de *Candida no-albicans*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 29: 568–572. 2011.

MARVIN, L. F., ROBERTS, M. A., FAY, L. B. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*. 337: 11-21. 2003.

MIKULSKA, M., CALANDRA, T., SANGUINETTI, M., POULAIN, D., VISCOLI, C. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Critical Care* 14: 1-14. 2010.

MONTAGNA, M. T., LOVERO, G., CORETTI, C., MARTINELLI, D., GIGLIO, O., IATTA, R., BALBINO, S., ROSATO, A., CAGGIANO, G. Susceptibility to echinocandins of *Candida* spp. strains isolated in Italy assessed by European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing and Clinical Laboratory Standards Institute broth microdilution methods. *BMC Microbiology* 15: 1-6. 2015.

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

PANDA, A., GHOSH, A. K.; MIRDHA, B. R., XESS, I., PAUL, S., SAMANTARAY, J. C., SRINIVASAN, A., KHALIL, S., RASTOGI, N., DABAS, Y. MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of clinical fungal isolates based on ribosomal protein biomarkers. *Journal of Microbiological Methods* 109: 93–105. 2015.

PERLIN, D. S. Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance. *Annals of The New York Academy of Sciences*, Newark, p. 1-11, 2015, ISSN 0077-8923. 2015.

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

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; KROEGER, J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. In Vitro Susceptibility of Invasive Isolates of *Candida* spp. to Anidulafungin, Caspofungin, and Micafungin: Six Years of Global Surveillance. *Journal Of Clinical Microbiology*, Iowa, v.46, n.1, p. 150–156, jan. 2008.
PFALLER, M. A., DIEKEMA, D. J. Progress in Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* spp. by Use of Clinical and Laboratory Standards Institute Broth Microdilution Methods, 2010 to 2012. *Journal of Clinical Microbiology* 50: 2846-2856. 2012.

PIRES, R. H. SANTOS, J. M., ZAIA, J. E., MARTINS, C. H. G., MENDES-GIANNINI, M. J. S. *Candida parapsilosis* complex water isolates from a haemodialysis unit: biofilm production and *in vitro* evaluation of the use of clinical antifungals. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 646-654. 2011.

POSTERARO, B., SANGUINETTI, M. The future of fungal susceptibility testing. *Future Microbiology* 9: 947–967. 2014.

PULCRANO, G., IULA, D. V., VOLLARO, A., TUCCI, A.; CERULLO, M., ESPOSITO, M., ROSSANO, F., CATANIA, M. R. Rapid and reliable MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Candida non-albicans* isolates from bloodstream infections. *Journal of Microbiological Methods* 94: 262-266. 2013.

RAMESH, N., PRIYADHARSINI, M., SUMATHI, C. S., BALASUBRAMANIAN, V., HEMAPRIYA, J., KANNAN, R. Virulence Factors and Anti Fungal Sensitivity Pattern of *Candida* sp. Isolated from HIV and TB Patients. *Indian J Microbiol.* 51: 273–278. 2011.

RODRIGUES, D., MEZZARI, A., FUENTEFRIA, A. M. Candidúria: Revisão Atual. *Revista Brasileira em Promoção da Saúde* 24: 142-150. 2011.

ROMEO, O., DEFINO, D., CASCIO, A., PASSO, C., AMORINI, M., ROMEO, D., PERNICE, I. Microsatellite-based genotyping of *Candida parapsilosis* sensu stricto isolates reveals dominance and persistence of a particular epidemiological clone among neonatal intensive care unit patients. *Infection, Genetics and Evolution* 13: 105-108. 2013.

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

SEGHIR, A., BOUCHERIT-OTMANI, Z., BELKHERROUBI-SARI, L., BOUCHERIT, K. Cathétérisme et risque infectieux fongique au centre hospitalo-universitaire de

Tlemcen: épidémiologie et sensibilité aux antifongiques. *Journal de Mycologie Médicale* 24: e179-e184. 2014.

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

SIDRIM, J. J. C., ROCHA, M. F. G. Micologia Médica a Luz dos Autores Contemporâneos; Edição 1, Rio de Janeiro; Editora Guanabara, 2004, p. 265-274. 2004.

SILVA, C. M., CARVALHO-PARAHY, A. M. R., MACÊDO, D. P. C., LIMA-NETO, R. G., FRANCISCO, E. C., MELO, A. S. A., SILVA, M. C. M., JUCÁ, M. B., MELLO, L. R. B., AMORIM, R. M. J., NEVES, R. P. Neonatal Candidemia Caused by *Candida haemulonii*: Case Report and Review of Literature. *Mycopathologia*. 2015.

SOARES, U. J. O., SOUZA, G. R., BARBOSA, A. H., MARTINS, C. H. G. PIRES, R. H. Detecção e identificação de leveduras em sucos de laranja natural comercializados. *Alimentos e Nutrição* 22: 663-668. 2011.

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

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

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

VELLA, A., CAROLIS, E., VACCARO, L., POSTERARO, P., PERLIN, D. S., KOSTRZEWA, M., POSTERARO, B., Sanguinetti, M. Rapid antifungal susceptibility testing by Matrix- Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 51: 2964-2969. 2013.

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

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

XIAO, M., FAN, X., CHEN, S. C. A., WANG, H., SUN, Z., LIAO, K., CHEN, S., YAN, Y., KANG, M., HU, Z., CHU, Y., HU, T., NI, Y., ZOU, G., KONG, F., XU, Y. Antifungal susceptibilities of *Candida glabrata* species complex, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* species complex and *Candida tropicalis*. causing invasive candidiasis in China: 3 year national surveillance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1-9. 2014.

YAMAN, G., AKYAR, I., CAN, S. Evaluation of the MALDI TOF-MS method for identification of *Candida* strains isolated from blood cultures. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 73: 65–67. 2012.

ZBOROMYRSKA, Y., FERRER-NAVARRO, M., MARCO, F., VILA, J. Detección de resistencia a agentes antibacterianos mediante MALDI-TOF espectrometría de masas. *Rev Esp Quimioter* 27: 87-92. 2014.

APÊNDICE: Artigo Aceito



microorganisms



Article

Rapid Detection of Echinocandins Resistance by MALDI-TOF MS in *Candida parapsilosis* Complex

Ana Emília M. Roberto ¹, Danilo E. Xavier ² , Esteban E. Vidal ³, Cláudia Fernanda de L. Vidal ⁴, Rejane P. Neves ^{1,*} and Reginaldo G. de Lima-Neto ^{1,*}

¹ Graduate Program in Fungal Biology, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife-PE 50740-600, Brazil; rianamedeiros@hotmail.com

² Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Recife-PE 50670-420, Brazil; danilo.xavier@cpqam.fiocruz.br

³ Center for Strategic Technologies Northeastern (CETENE), Recife-PE 50740-545, Brazil; estebanespinosa.vidal@gmail.com

⁴ Hospital of Clinics, Recife-PE 50670-901, Brazil; vidal.claudia@gmail.com

* Correspondence: rejadel@yahoo.com.br (R.P.N.); reginaldolimaneto@pq.cnpq.br (R.G.d.L.-N.)

Received: 13 December 2019; Accepted: 6 January 2020; Published: 13 January 2020



Abstract: Mass spectrometry by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) was used to identify and differentiate the pattern of susceptibility of clinical isolates of *Candida parapsilosis* complex. 17 *C. parapsilosis sensu stricto*, 2 *C. orthopsilosis*, and 1 *C. metapsilosis* strains were obtained from blood cultures, and three different inocula (10^3 , 10^5 , and 10^7 CFU/mL) were evaluated against three echinocandins at concentrations ranging from 0.03 to 16 μ g/mL after incubation of 1 h, 2 h, and 3 h. Drug-free control was used. The spectra obtained at these concentrations were applied to generate composite correlation index (CCI) matrices for each yeast individually. After cross correlations and autocorrelations of each spectra with null (zero) and maximal (16) concentrations, the CCI was used as separation parameter among spectra. Incubation time and inoculum were critical factors to reach higher precision and reliability of this trial. With an incubation time of 3 h and inoculum of 10^7 CFU/mL, it was possible to determine the breakpoint of the clinical yeasts by MALDI-TOF that presented high agreement with the clinical laboratory standard institute (CLSI) reference method. Herein, we show that mass spectrometry using the MALDI-TOF technique is powerful when it exploits antifungal susceptibility testing assays.

Keywords: mass spectrometry; susceptibility testing; candidemia; resistance

1. Introduction

Incidence of invasive fungal infections (IFIs) has tragically increased during the last twenty years, despite advances in methods of diagnosis [1,2]. *Candida*-related IFIs are linked to elevated morbidity and mortality, as well as a high cost of healthcare [1,2]. *Candida albicans* is still the major species related to candidemia worldwide; however, the diversity of other *Candida* species differs according geographical location. Thus, Brazilian distribution displays a high frequency of *C. parapsilosis* as the typical etiologic species [3–5].

Invasive candidiasis presents unspecific clinical symptoms, which make early diagnosis difficult, requiring blood cultures that are time-consuming and have little sensitivity [6]. Therefore, in a substantial number of cases, the diagnosis of candidemia is usually established late or even at autopsy [7]. In this sense, the general consensus assigns earlier initiation with precise antifungal treatments, proportionally increasing the patient survival. Thus, it is crucial to develop new rapid diagnostic methods capable of efficiently detecting IFIs at the beginning of the course of the disease, with high sensitivity and specificity [8]. At the same time, the susceptibility profiles against antifungal

drugs vary greatly between species, being equally necessary to the implementation of a rapid antifungal susceptibility test.

Few developments in microbiological diagnostics have had a rapid impact on the identification of microorganism species as the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) technique. Spectra generated are analyzed as a fingerprint where ribosomal proteins appear with molecular mass ranging from 2000–20,000 Da, which is an advantage due to the fact they may be easily employed as biomarkers. After spectra acquisition, MALDI-TOF MS-based microorganism identifications are reached by comparing their protein fingerprints with super spectra and reference spectra included in database of well-characterized isolates from renowned culture collections from around the world [9,10].

This approach has been applied to the detection of *Candida* yeasts that have acquired resistance to antifungal therapy [9,11,12]. Proteomics changes that occur in yeasts after exposition to antifungal drugs enable the determination of the minimal profile change concentration (MPCC), a breakpoint that may become a more accurate preference method rather than usual minimum inhibitory concentration (MIC) obtained by clinical laboratory standard institute (CLSI) [13–15].

Considering the aforementioned, the objective of this study was to development an ultra-fast and high accuracy echinocandins-susceptibility diagnosis method for *Candida parapsilosis* complex clinical strains based on the MALDI-TOF MS system; comparing the results with the current CLSI protocol.

2. Materials and Methods

2.1. Specimen, Diagnosis and Storage

Blood samples were collected after Human Ethics Committee approval of the Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil, under identification number CAAE 58601316.5.0000.5208. Approval was granted on 13 June 2016, under number 1,586,343. Venous blood samples were aseptically collected three times on consecutive days and incubated at 37 °C in bottles with brain heart infusion media for isolation of the clinical strains. Fifty-nine *Candida*-positive blood samples were obtained from inpatients of the intensive care unit (ICU) of public hospital at the Northeast from the Brazil among June 2016 to September 2018.

Spectra of clinical strains were obtained according to Lima-Neto et al. [10] with modifications. The MALDI TOF Autoflex III Mass Spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) set up with a 1064 nm laser of neodymium crystal (Nd:Y₃Al₅O₁₂) to 66% power was used. The linear mode with a 104 ns pulsed laser and an acceleration voltage of +20 kV was used to register the mass range between 2000 to 20,000 Da. The peak lists obtained were exported to the software package MALDI Biotyper™ 3.0 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany), where identifications were achieved.

A representative of each species of the complex was stocked in URM Culture Collection at the UFPE. This collection is registered in the WDCM of the WFCC as “604” under the acronym URM (University Recife Mycology).

2.2. Antifungal Susceptibility Testing (AFST) by CLSI Method

Reference microdilution trials M27-A3 and M27-S4 guidelines [13,14] were used. The standard RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was buffered to pH 7.0 ± 0.1 with 0.165 M of morpholino propane sulfonic acid (MOPS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). RPMI 1640 medium sterilization by filtration with membrane 0.22 (Millipore, Darmstadt, Germany) was performed. Antifungal drugs were dissolved and stored in dimethyl sulfoxide (DMSO, Synth, Diadema, São Paulo, Brazil) at 1600 µg/mL. For testing, caspofungin (MSD, Riom, France), anidulafungin (Pfizer NY, EUA), and micafungin (Astellas Pharma Inc, Tokyo, Japan) were diluted and used at concentrations among 0.03 to 16 µg/mL.

Candida parapsilosis complex isolates were subcultured on sabouraud dextrose agar (SDA) with yeast extract, and incubated at 35 °C for 24-h. One to three single colonies were suspended in 0.85 g/L

NaCl, and inoculum containing 1.0 to 5.0×10^6 CFU/mL was adjusted in a spectrophotometer at 530 nm to obtain 90% transmittance. Each inoculum was two-fold diluted to reach 10^3 CFU/mL.

Microtiter plates of flat 96-well (TPP, Trasadingen, Switzerland) were used. After inoculum was added to the wells containing the serial dilutions of antifungal agents, the plates were incubated at 35 °C for 24 h to define the minimum inhibitory concentration (MIC). The test was carried out in duplicate. The antifungal testing according to CLSI classifies the strains of *C. parapsilosis* complex against anidulafungin, caspofungin, and micafungin as susceptible with MIC ≤ 2 µg/mL, intermediate at 4 µg/mL, and resistant at ≥ 8 µg/mL [14].

Candida parapsilosis ATCC 22019 was used as quality control as recommended by CLSI.

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

The AFST-MS was carried out in accordance with Marinach et al. [11] and modifications by De Carolis et al. [16]. Protein extraction of the yeasts was performed from three different concentrations of inoculum suspensions of 10^3 , 10^5 , and 10^7 CFU/mL, cultivated in RPMI containing serial dilutions (0.03125 to 16 µg/mL) of the three echinocandins, separately in microtiter plates under stirring for 1 h, 2 h, and 3 h of incubation maintained at 37 °C. Each suspension was centrifuged twice to 12,000×g for 2 min with posterior washing in deionized water. After third washing, the cell pellet was resuspended in 10% formic acid and centrifuged. One µL of this supernatant was directly spotted in duplicate on target plate, and then 1 µL of absolute ethanol was added along with 1 µL of a saturated solution acid α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile–2.5% trifluoroacetic acid, allowing for complete drying.

Protein spectra were acquired with the same MALDI equipment described above; however, mass range used was 2000–10,000 Da. For each assay, spectrum was analyzed with the software FlexControl™ (Bruker Daltonick GmbH, Bremen, Germany).

2.4. Data Analysis

Statistical software composite correlation index (CCI) from the Biotyper™ (Bruker Daltonick GmbH, Bremen, Germany) was used to examine the relationship among each spectra according to reported by Marinach et al. [11] and modified by De Carolis et al. [16].

Compositions of cross correlations and autocorrelations of the yeasts were used as a separation parameter among the spectra. CCI values near 1 represent a high similarity conformance of spectra profile, while CCI values around 0 indicate low similarity. The results are displayed in a correlation matrix and posteriorly in a heat map. Proteins spectra closely related are marked in hot colors, while unrelated ones are in cold colors. This enables one to define the MPCC for anidulafungin, caspofungin, and micafungin, the value defined as the lowest drug concentration where a change detectable in the MALDI-TOF MS profile occurs.

3. Results

Among the 59 patients diagnosed with candidiasis, twenty were diagnosed as *Candida parapsilosis* complex by MALDI-TOF MS, and were selected for AFST by both microdilution method and mass spectrometry methodologies. Seventeen yeasts were *Candida parapsilosis sensu stricto*, two were *Candida orthopsilosis*, and one was *Candida metapsilosis*. The other yeasts isolates were 16 *Candida albicans*, 13 were *Candida glabrata*, and 10 were *Candida tropicalis*.

The CLSI-based AFST method showed that all 20 clinical isolates of *Candida parapsilosis* complex were susceptible against caspofungin and micafungin and one *Candida parapsilosis sensu stricto* was resistant against anidulafungin only. According to AFST-MS, all 20 clinical isolates were susceptible to anidulafungin and micafungin and one *Candida orthopsilosis* was intermediate against caspofungin with inoculum suspension of 10^7 CFU/mL after incubation time of 3 h. Inoculum suspensions of 10^3 and 10^5 CFU/mL, besides having an incubation time of 1 h or 2 h, did not produce detectable peaks on spectra. The breakpoints and their MIC or MPCC values obtained by antifungal susceptibility

testing carried out by CLSI or MALDI-TOF, respectively, are summarized in Table 1. The two main discrepancies are highlighted in green letters.

Table 1. Comparison between APST * from CLSI ** and APST from MALDI-TOF MS [†] performed after the exposure of 20 clinical isolates of the *Candida parapsilosis* complex against three echinocandins.

Isolated and Lab Number	Breakpoint (MIC in µg/mL)			Breakpoint (MPCC in µg/mL)		
	Anidula.	Caspo.	Mica.	Anidula.	Caspo.	Mica.
<i>C. parapsilosis</i> 346A	S (0.25)	S (0.25)	S (2)	S (0.5)	S (0.125)	S (0.5)
<i>C. parapsilosis</i> 346B	S (0.25)	S (0.25)	S (2)	S (0.25)	S (0.0625)	S (0.5)
<i>C. parapsilosis</i> 474	S (0.5)	S (0.5)	S (2)	S (0.125)	S (0.5)	S (0.5)
<i>C. parapsilosis</i> 505	S (0.25)	S (0.25)	S (1)	S (0.0625)	S (0.25)	S (0.25)
<i>C. parapsilosis</i> 506A	S (0.25)	S (0.25)	S (0.5)	S (0.0625)	S (0.125)	S (0.5)
<i>C. parapsilosis</i> 506B	S (0.25)	S (0.25)	S (0.5)	S (0.125)	S (0.0625)	S (2)
<i>C. parapsilosis</i> 5902	S (0.0625)	S (0.0625)	S (0.03125)	S (0.25)	S (0.25)	S (0.03125)
<i>C. parapsilosis</i> 12	S (0.125)	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.125)	S (0.06125)
<i>C. parapsilosis</i> 29	S (0.125)	S (0.0625)	S (0.0625)	S (0.0625)	S (0.25)	S (0.25)
<i>C. parapsilosis</i> 30	S (0.0625)	S (0.0625)	S (0.0625)	S (0.125)	S (0.25)	S (0.25)
<i>C. parapsilosis</i> 31	S (0.25)	S (0.125)	S (0.0625)	S (1)	S (0.5)	S (0.25)
<i>C. parapsilosis</i> 39	S (0.0625)	S (0.125)	S (0.0625)	S (0.03125)	S (0.5)	S (0.25)
<i>C. parapsilosis</i> 40	R (16)	S (0.25)	S (2)	S (1)	S (0.5)	S (2)
<i>C. parapsilosis</i> 44	S (0.03125)	S (0.0625)	S (0.0625)	S (0.03125)	S (0.25)	S (0.25)
<i>C. parapsilosis</i> 45	S (0.25)	S (0.0625)	S (0.0625)	S (0.125)	S (0.0625)	S (0.25)
<i>C. parapsilosis</i> 48	S (0.0625)	S (0.0625)	S (0.03125)	S (0.25)	S (0.25)	S (0.03125)
<i>C. parapsilosis</i> 49	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.06125)	S (0.03125)	S (0.125)	S (0.25)
<i>C. orthopsilosis</i> 03	S (0.0625)	S (0.125)	S (0.5)	S (0.25)	I * (4)	S (0.5)
<i>C. orthopsilosis</i> 07	S (2)	S (0.0625)	S (0.5)	S (0.03125)	S (0.03125)	S (0.03125)
<i>C. metapsilosis</i> 32	S (1)	S (1)	S (0.5)	S (0.25)	S (0.25)	S (0.5)
ATCC 22019	S (0.5)	S (0.5)	S (1)	S (0.5)	S (0.25)	S (0.5)

* APST—antifungal susceptibility testing; ** CLSI—clinical laboratory standard institute; [†] MALDI-TOF MS—matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. MIC—minimal inhibitory concentration obtained by CLSI method. MPCC—minimal profile change concentration obtained by MALDI-TOF MS technique. S—susceptible. R—resistant. I—intermediate.

Using the CLSI-based APST microdilution method as reference on antifungal evaluation, the breakpoints obtained with APST-MS showed concordance of 95%, 95%, and 100% for anidulafungin, caspofungin, and micafungin, respectively, among all isolates analyzed.

After correlation of every spectrum obtained after exposure to the concentrations 0.03–8 µg/mL with one of the two extreme concentrations, 16 (maximum) or 0 (null), the derived CCI matrices and their respective heat map for all yeasts of the *Candida parapsilosis* complex were generated. These results were expressed in tables for each echinocandin tested (data not entirely shown). For example, we displayed the results for *Candida parapsilosis sensu stricto* 31, which was classified for both methods as susceptible. The CCI matrix, their heat map, and spectra subset are presented, respectively, in Table 2, Figures 1 and 2 for caspofungin; Table 3, Figures 3 and 4 for anidulafungin; and Table 4, Figures 5 and 6 for micafungin.

Table 2. Composite correlation index (CCI) matrix created from the correlations of all spectral intervals values of the *Candida parapsilosis* 31 exposed to caspofungin. MPCC was quantitatively determined by statistical relation between whole data set obtained by acquired spectra.

MPCC ($\mu\text{g/mL}$)	CCI Null	CCI Maximum
0.0000	0.4662	1.0000
0.0313	0.4642	0.9289
0.0625	0.5150	0.9565
0.1250	0.5127	0.9429
0.2500	0.4868	0.9322
0.5000	0.4440	0.7534
1.0000	0.4857	0.7568
2.0000	0.4550	0.7452
4.0000	0.5634	0.5955
8.0000	0.6432	0.6587
16.0000	1.0000	0.4662

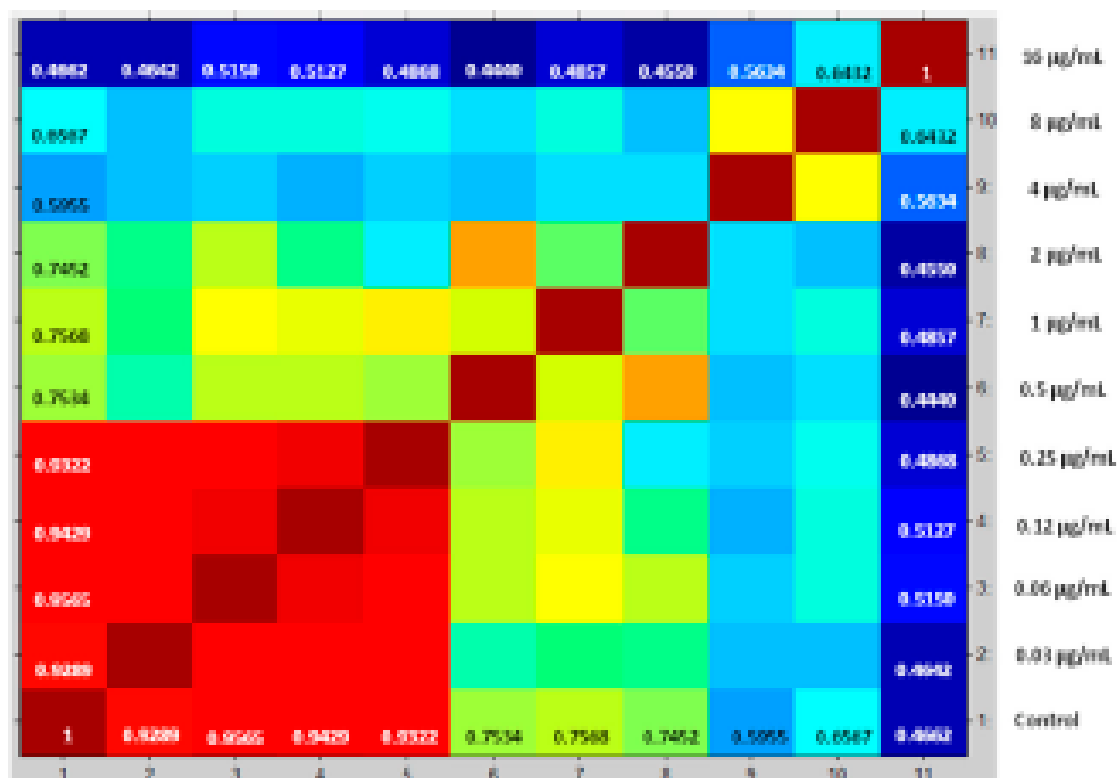


Figure 1. Heat map translated from mass spectra selected of *Candida parapsilosis* 31 exposed against caspofungin for 3h and used to generate CCI matrix. Red gradients coincide with strong associations and green to deep-blue gradients coincide with weak associations. Spectra obtained below MPCC showed higher similarity with the null drug treatment. Spectra obtained at and above MPCC are very similar to extreme drug concentration. X-axis numbers have the same drug concentration on the y-axis. MPCC = 0.5 $\mu\text{g/mL}$. Source: Maldi Biotyper 3.0.

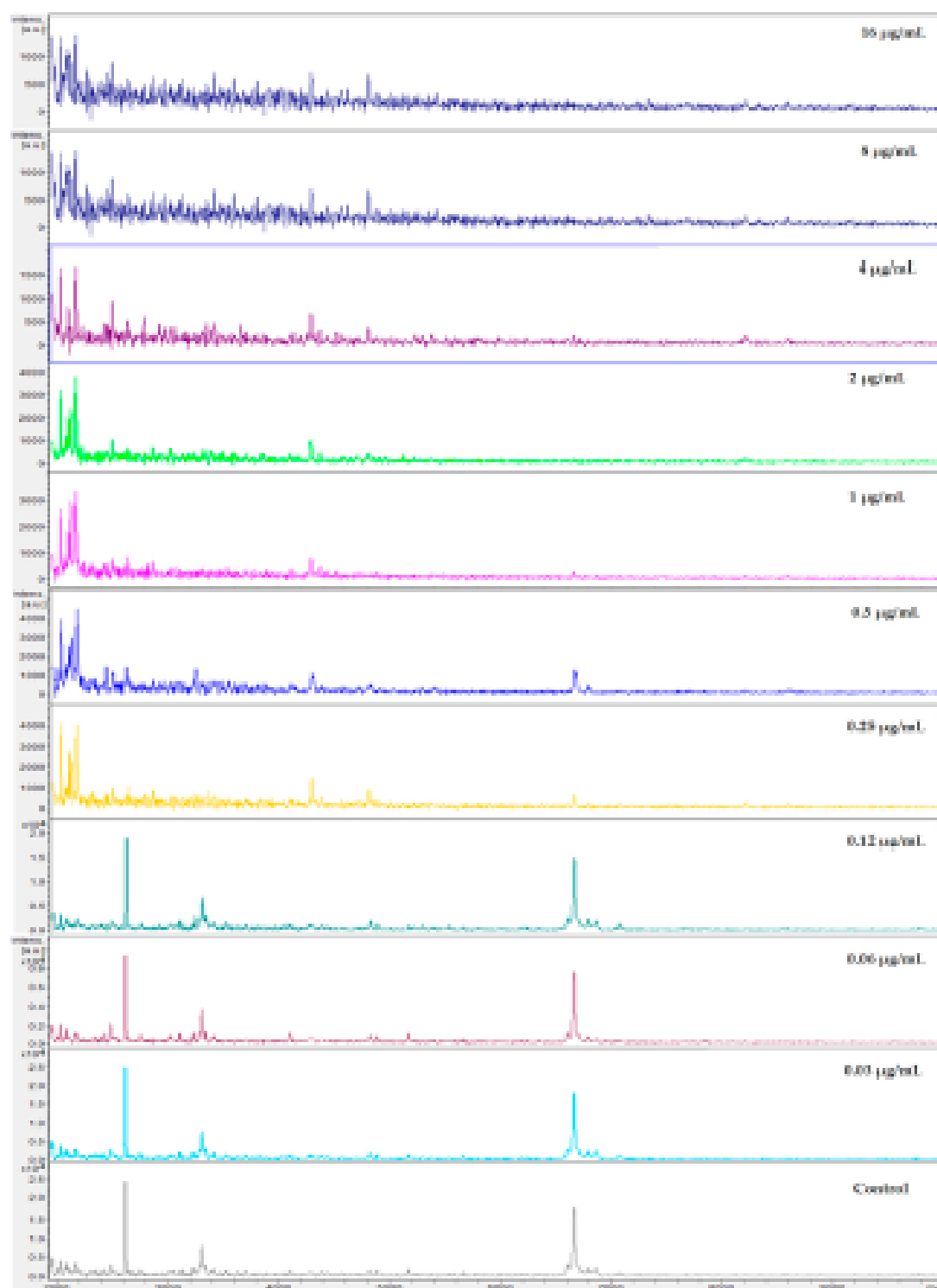


Figure 2. MALDI-TOF spectra profiles obtained from *Candida parapsilosis* 31 under ten different concentrations of caspofungin and control (no drug) after exposure of 3 h at 37 °C. Minimal spectra alterations are visible following exposure to 0.5 µg/mL. Source: MALDI FlexAnalysis™ (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

Table 3. CCI matrix created from the correlations of all spectral intervals values of the *Candida parapsilosis* 31 exposed to anidulafungin. MPCC was quantitatively determined by statistical relation between whole data set obtained by acquired spectra.

MPCC ($\mu\text{g/mL}$)	CCI Null	CCI Maximum
0.0000	0.4696	1.0000
0.0313	0.5124	0.9668
0.0625	0.5476	0.9094
0.1250	0.5786	0.8008
0.2500	0.5719	0.8825
0.5000	0.5591	0.8375
1.0000	0.4858	0.6288
2.0000	0.4773	0.6363
4.0000	0.5256	0.4936
8.0000	0.3273	0.6412
16.0000	1.0000	0.4696

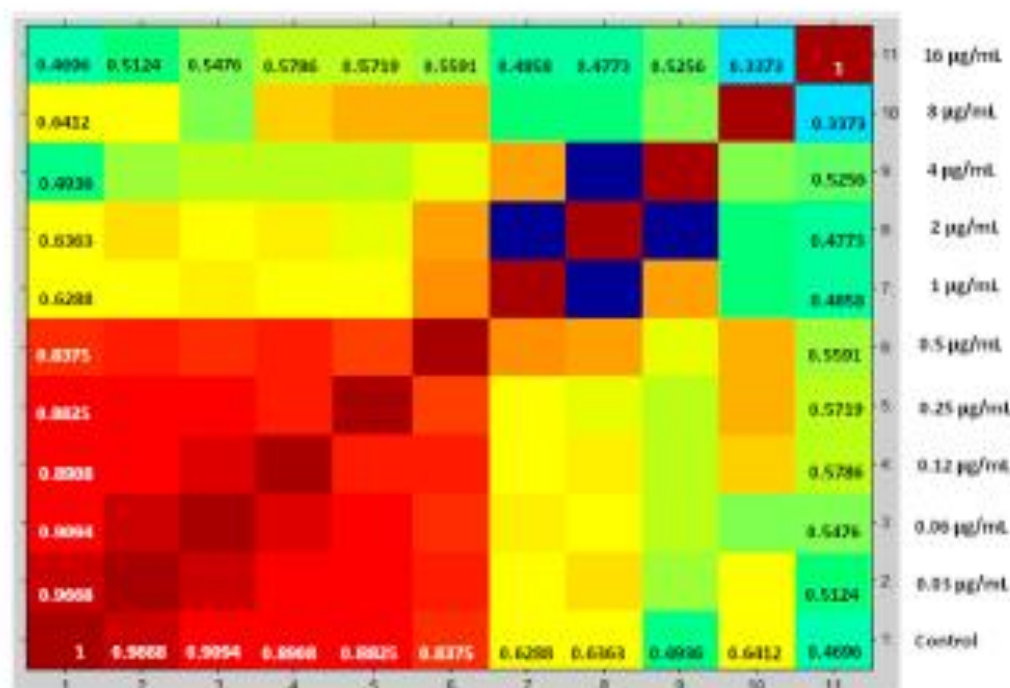


Figure 3. Heat map translated from mass spectra selected of *Candida parapsilosis* 31 exposed against anidulafungin for 3h and used to generate CCI Matrix. Red gradients coincide with strong associations and yellow to green gradients coincide with weak associations. Spectra obtained below MPCC showed higher similarity with the null drug treatment. Spectra obtained at and above MPCC showed significant similarity with the extreme drug concentration. X-axis numbers have the same drug concentration on the y-axis. MPCC = 1 $\mu\text{g/mL}$. Source: Maldi Biotyper 3.0.

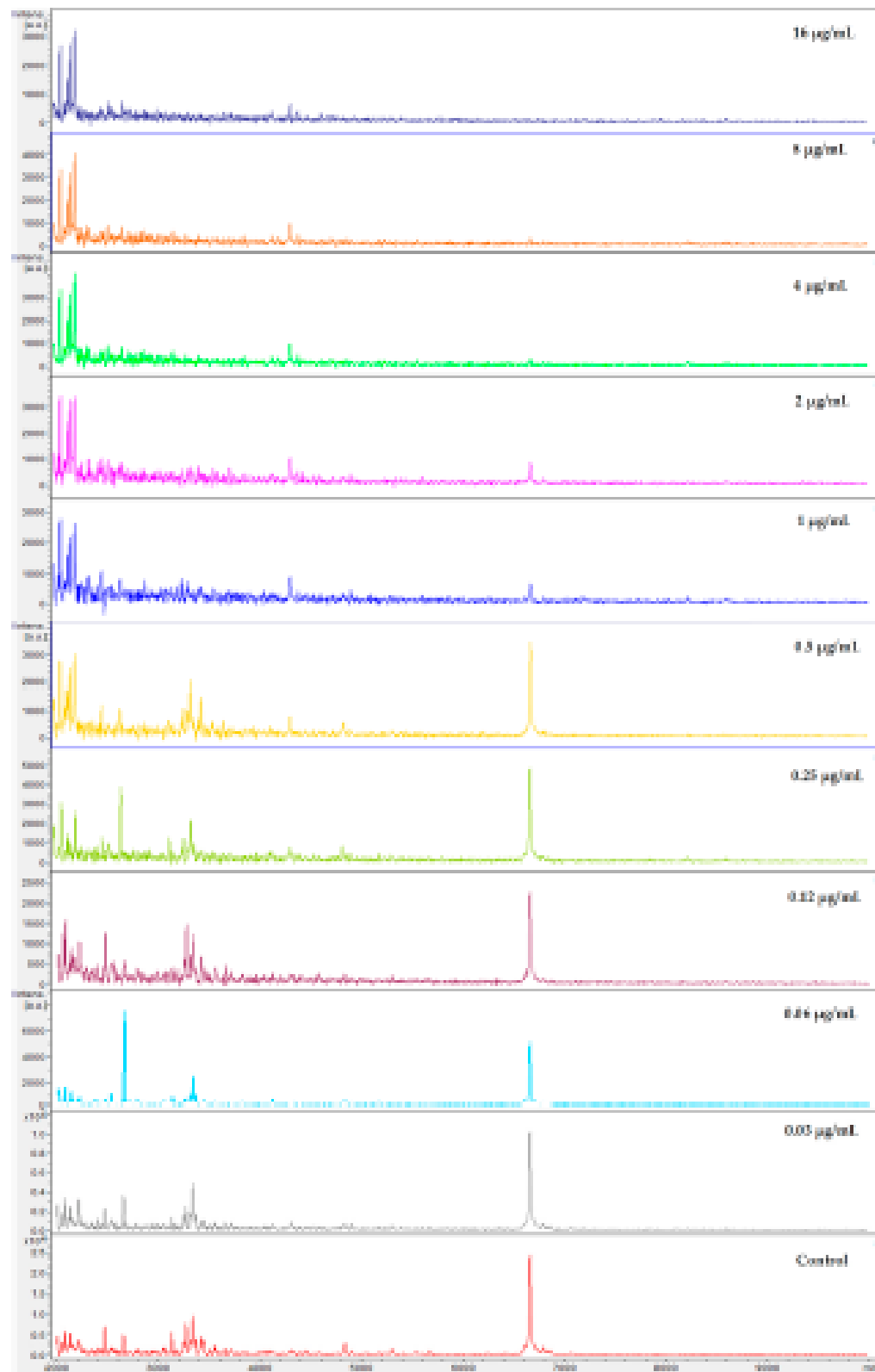


Figure 4. MALDI-TOF spectra profiles obtained from *Candida parapsilosis* 31 under ten different concentrations of anidulafungin and control (no drug) after exposure of 3 h at 37 °C. Minimal spectra alterations are visible following exposure to 1 µg/mL. Source: MALDI FlexAnalysis™ (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

Table 4. CCI matrix created from the correlations of all spectral intervals values of the *Candida parapsilosis* 31 exposed to micafungin. MPCC was quantitatively determined by statistical relation between whole data set obtained by acquired spectra.

MPCC ($\mu\text{g/mL}$)	CCI Null	CCI Maximum
0.0000	0.0100	1.0000
0.0313	0.0095	0.8997
0.0625	0.0116	0.8445
0.1250	0.0323	0.8183
0.2500	0.0381	0.3417
0.5000	0.4160	0.4287
1.0000	0.0090	0.6709
2.0000	0.0096	0.2075
4.0000	0.5823	0.5701
8.0000	0.0087	0.0073
16.0000	1.0000	0.0100

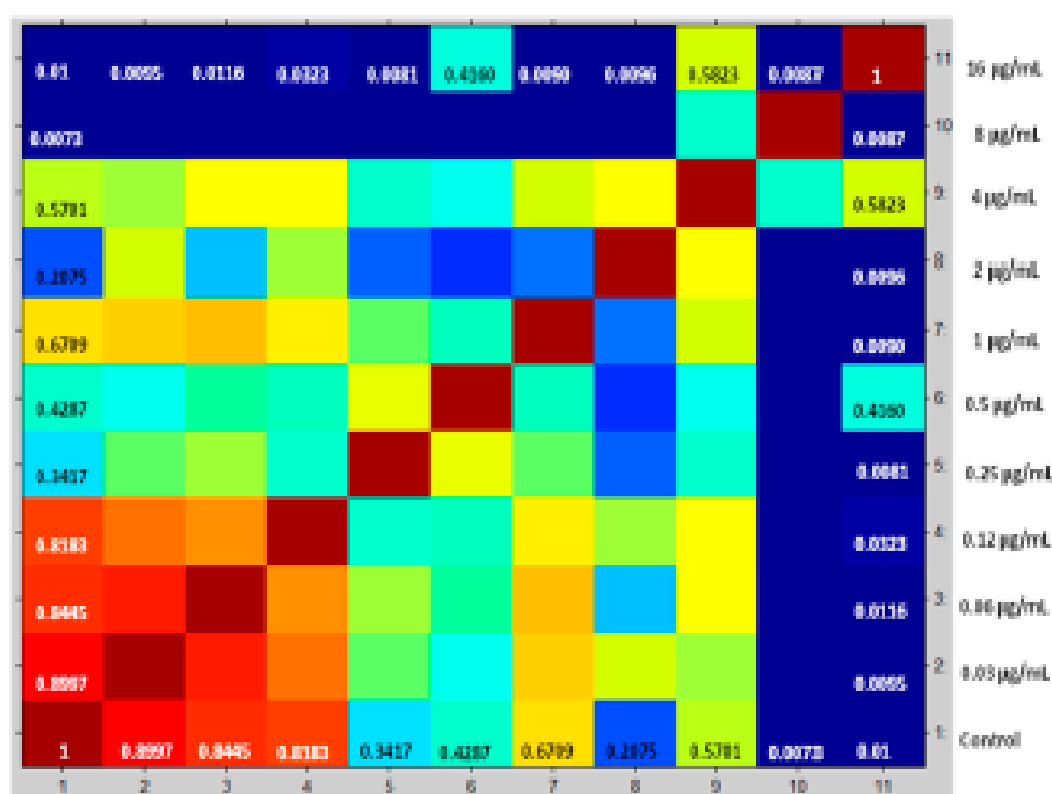


Figure 5. Heat map translated from mass spectra selected of *Candida parapsilosis* 31 exposed against micafungin for 3h and used to generate CCI Matrix. Red gradients coincide with strong associations and green to deep-blue gradients coincide with weak associations. Spectra obtained below MPCC were more similar to the null drug treatment. Spectra obtained at and above MPCC were very similar to the extreme drug concentration. X-axis numbers have the same drug concentration on the y-axis MPCC = 0.25 $\mu\text{g/mL}$. Source Maldi Biotyper 3.0.

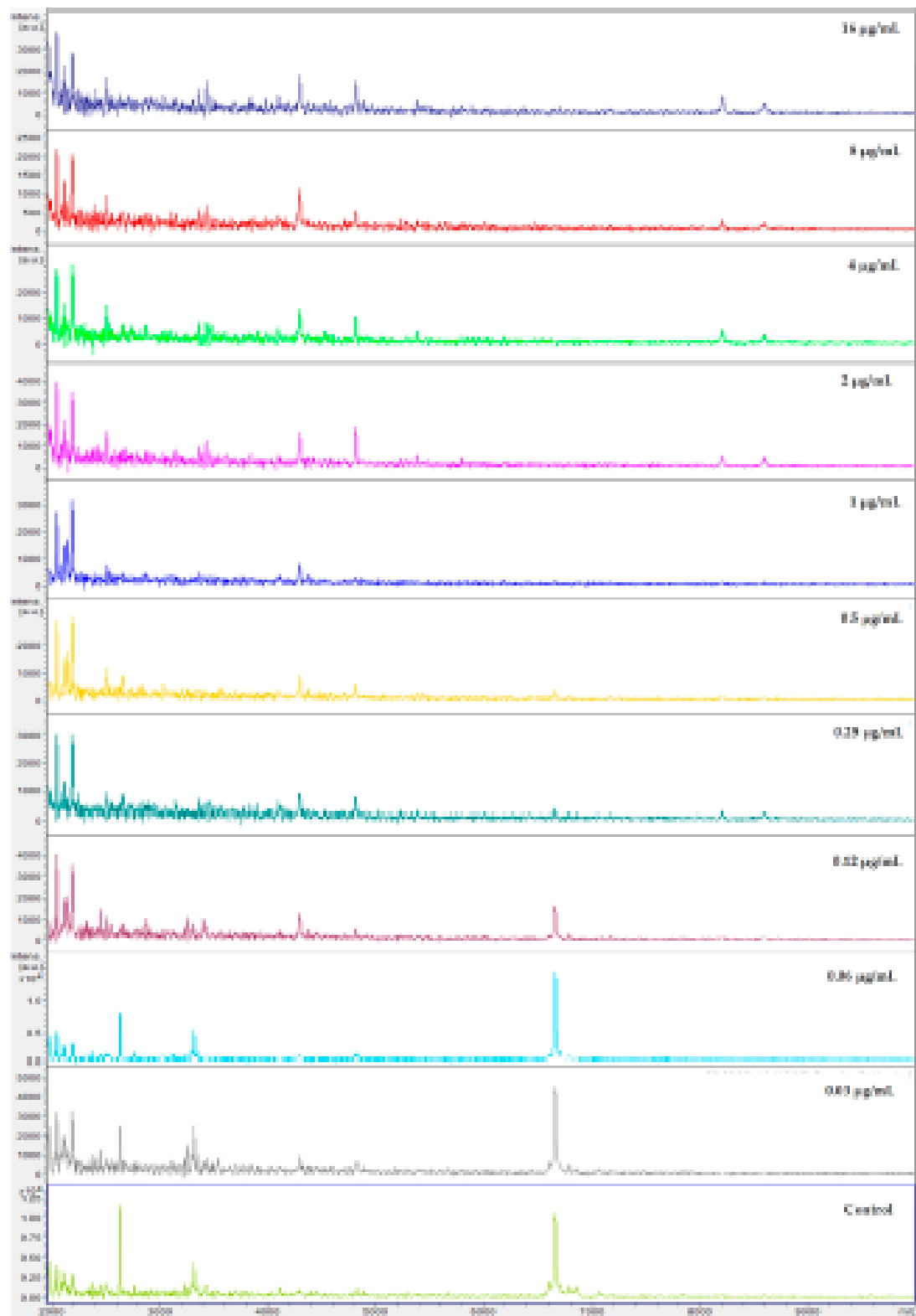


Figure 6. MALDI-TOF spectra profiles obtained from *Candida parapsilosis* 31 under ten different concentrations of micafungin and control (no drug) after exposure of 3 h at 37 °C. Minimal spectra alterations are visible following exposure to 0.25 µg/mL. Source: MALDI FlexAnalysis™ (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

4. Discussion

The mass spectrometry by MALDI-TOF enables one to visualize the variations among the ionized protein composition from strains with different breakpoints by the comparison of their spectra. Our results are in accordance with Vella et al. [12], Saraceli et al. [9], Vella et al. [15], and Paul et al. [17], which affirm that after exposition of yeasts against different concentrations of the antifungal drugs it is possible to find changes in the peak distribution in spectra of every *Candida* tested. Hencein, we exploit this potential of MALDI-TOF MS with the second most occurent agent of candidemia in the Latin America: *Candida parapsilosis* complex [1,4]. To the best of our knowledge, this is first work that analyzes antifungal susceptibility profile of *Candida parapsilosis* complex species by MALDI-TOF. Furthermore, echinocandins is extensively used in critically ill patients with suspected or confirmed candidemia by *Candida parapsilosis*. We must point out that Vella et al. [12] and De Carolis et al. [16] brought us new knowledge in this field using caspofungin, and Vella et al. [16] using anidulafungin. However, there have been no publications with micafungin so far.

The traditional antifungal susceptibility testing by CLSI may detect resistance of a microorganism independently of its mechanism. Therefore, this detection by mass spectrometry may occur if the amount of ionized protein is expressed sufficiently by the yeast cells evaluated [18]. Comparing the CLSI-based APST and the APST-MS methodologies, it was possible to find the high agreement level, reaching a performance of 100% for micafungin. It is important to highlight that the yeasts evaluated in this research were obtained from patients with candidemia admitted in intensive care unit and selected irrespective of their susceptibility or kind of drug resistance mechanisms.

Paul et al. [17] used recently CCL-based proteomic study to analyze 15 *C. tropicalis* fluconazole-resistant and 19 *C. tropicalis* fluconazole-susceptible in comparison with international method published by CLSI microdilution assay. According to researches, the correlation between MPCC and MIC was significant and APST-MS assay may be used as a rapid screening technique for fluconazole resistance in *C. tropicalis*.

Vella et al. [15] evaluated this physical-chemical technique using a subset of 80 *C. glabrata* clinical strains after 3h incubation with anidulafungin. When comparing changes on spectra to the standard method recommended by the CLSI, 57/58 (100%) isolates with WT sequence were classified as susceptible, but 11/22 (50.0%) resistant isolates were really classified as resistant to anidulafungin. The aforementioned authors have repeated the assay for the 11 resistant isolates with longer incubation times (6, 9, and 12 h); however there were two unresolved mistakes for anidulafungin. After 15 h incubation, 100% essential agreement was achieved [15].

Currently, the APST-MS provides MPCC breakpoints like EUCAST and CLSI provides MIC. This new MALDI-TOF-based antifungal susceptibility testing was shortened by several authors reported here as Vella et al. [12], Saraceli et al. [9], and Vella et al. [15]. However, we opted to evaluate MPCC with extended drug concentrations (0.03–16 µg/mL) to determine maximal discrepancy in relation to dilutions, and we verified that our results were similar to those reported by Espinel-Ingroff et al. [18], who advocate a cutoff value of two dilutions between MPCC and MIC, for maximal acceptance of disagreement. Due to extended drug concentration evaluated, we have not tested a large number of strains at this time.

Our group also performed tests with a decreased incubation time (1 and 2 h), but we did not get positive results. Nowadays, new tests have been carried out involving echinocandins with changes in the methodology, like inocula concentration and cultured media, in order to make tests more reproducible and faster. This is relevant, since antifungal susceptibility profile is shown to be more resistant in this species against this antifungal class.

All in all, we demonstrate that the readings by mass spectrometry using MALDI-TOF represent a timesaving (3 h versus 24 h) in comparison with CLSI microdilution trial. In addition, antifungal susceptibility testing by CLSI and MALDI-TOF methods showed concordance of 95% for anidulafungin and caspofungin, besides 100% for micafungin. This proteomic technique presents advantage of excluding subjective read-outs, which occur with the CLSI method when fungi are evaluated.

Pharmacoeconomics should also be carefully analyzed to confirm that MALDI-TOF is more cost-effective [17,19].

5. Conclusions

Herein, the technology MALDI-TOF MS displayed was shown to be effective when applied to the APST trials. Incubation time and inocula concentration were crucial to reach a maximum level of agreement with a standard test. We reinforced the fact that MALDI-TOF is a faster alternative to traditional methods. However, APST-MS needs to be further investigated by researchers and further surveyed to be optimized, and reproduced in a laboratory setting.

Author Contributions: The authors A.E.M.R. and R.G.d.L.-N. equally contributed to the experimental work and its analysis; the conceptualization was performed mainly by D.E.X., E.E.V., and R.G.d.L.-N.; C.Ed.L.V. followed patients; all authors equally contributed to the formal analysis, writing, review, and editing; and funding acquisition was mainly done by R.P.N. and R.G.d.L.-N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) by grant number 453745/2014-5. R.G.d.L.-N. is supported by CNPq Grant 310802/2018-1.

Acknowledgments: The authors wish to thank the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FAPCEPE, Pernambuco, Brazil) for the scholarship of A.E.M.R. (IBPG-1444-2.12/15). The authors also would like to thank the Center for Strategic Technologies Northeastern (CHTNE, MCTI, Brazil) for MALDI-TOF MS analyses and Hospital das Clínicas de Pernambuco (UFPE, Brazil) for providing the biological samples from the patients.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

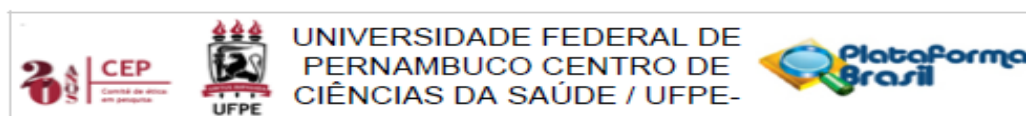
References

1. Arendrup, M.C. Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr. Opin. Crit. Care* **2010**, *16*, 445–452. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Cordeiro, R.A.; Evangelista, A.J.J.; Serpa, R.; Andrade, A.R.C.; Mendes, P.B.L.; Oliveira, J.S.; Aktenaz, L.P.; Pereira, V.S.; Lima-Neto, R.G.; Brilhante, R.N.; et al. Cefepime and Amoxicillin Increase Metabolism and Enhance Caspofungin Tolerance of *Candida albicans* Biofilms. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1337. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Hinrichsen, S.L.; Falcão, E.; Vilella, T.A.S.; Nêgo, L.; Lima, C.; Almeida, L.; Martins, M.; Araújo, C.; Duarte, M.; Lopes, G. *Candida* isolates in tertiary hospitals in Northeastern Brazil. *Braz. J. Microbiol.* **2009**, *40*, 325–328. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Nucci, M.; Quiróz-Telles, R.; Alvarado-Mateo, T.; Tiraboschi, L.N.; Corkes, J.; Zurita, J.; Guzman-Blanco, M.; Santolaya, M.H.; Thompson, L.; Sifuentes-Osorio, J.; et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: A laboratory-based survey. *PLoS ONE* **2013**, *8*, 59373. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Silva, R.B.; Hinrichsen, S.L.; Neves, R.P.; Lima-Neto, R.G. Candidemia in a public hospital in Northeastern Brazil: Epidemiological features and risk factors in critically ill patients. *Rev. Iberoam. Micol.* **2019**, *36*, 181–185. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Clancy, C.J.; Nguyen, M.H. Finding the “missing 50%” of invasive candidiasis: How nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Crit. Infect. Dis.* **2013**, *56*, 1284–1292. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Groll, A.; Shah, P.M.; Mentzel, C.; Schneider, M.; Just-Nuebling, G.; Huebner, K. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J. Infect.* **1996**, *33*, 23–32. [\[CrossRef\]](#)
8. Klingspor, L.; Jalal, S. Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. *Clin. Microbiol. Infect.* **2006**, *12*, 745–753. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Saradi, M.A.; Fothergill, A.W.; Sutton, D.A.; Wiederhold, N.P. Detection of triazole resistance among *Candida* species by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Med. Mycol.* **2015**, *53*, 736–742. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

10. Lima-Neto, R.G.; Santos, C.; Lima, N.; Sampaio, P.; Pais, C.; Neves, R.P. Application of MALDI-TOF MS for requalification of *Candida* clinical isolates culture collection. *Braz. J. Microbiol.* **2014**, *45*, 515–522. [CrossRef] [PubMed]
11. Marinach, C.; Alario, A.; Palous, M.; Kwasch, S.; Fekkar, A.; Brossas, J.Y.; Brun, S.; Snounou, G.; Hennequin, C.; Sanglard, D.; et al. MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: The example of *Candida glabrata* and fluconazole. *Proteomics* **2009**, *9*, 4627–4631. [CrossRef] [PubMed]
12. Vella, A.; De Carolis, E.; Vaccaro, L.; Posteraro, P.; Perlin, D.S.; Kostrowska, M.; Posteraro, B.; Sanguinetti, M. Rapid antifungal susceptibility testing by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry analysis. *J. Clin. Microbiol.* **2013**, *51*, 2964–2969. [CrossRef] [PubMed]
13. CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Testing of Yeasts Approved Standard Document M27-A3*; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2008; Volume 28, pp. 1–25. ISBN 1-56238-66-2.
14. CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts M27-S4*; Fourth Informational Supplement; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2012; Volume 28, pp. 1–23.
15. Vella, A.; De Carolis, E.; Mello, E.; Perlin, D.S.; Sanglard, D.; Sanguinetti, M.; Posteraro, B. Potential use of MALDI-TOF mass spectrometry for rapid detection of antifungal resistance in the human pathogen *Candida glabrata*. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 9099. [CrossRef] [PubMed]
16. De Carolis, E.; Vella, A.; Florio, A.R.; Posteraro, P.; Perlin, D.S.; Sanguinetti, M.; Posteraro, B. Use of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for caspofungin susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 2479–2483. [CrossRef] [PubMed]
17. Paul, S.; Singh, P.; Sharmath, A.S.; Rudramurthy, S.M.; Chakrabarti, A.; Ghosh, A.K. Rapid detection of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* by MALDI-TOF MS. *Mol. Mycol.* **2018**, *56*, 234–241. [CrossRef] [PubMed]
18. Espinel-Ingroff, A.; Barchiesi, E.; Cuenca-Estrella, M.; Pfaller, M.A.; Rinaldi, M.; Rodriguez-Tudela, J.L.; Verweij, P.E. International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 3884–3889. [CrossRef] [PubMed]
19. Martínez-Lamas, L.; Molino, M.L.P.; Pardo, E.; Varela, E.; Reguero, B.J. Espectrometría de masas matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight vs. metodología convencional en la identificación de *Candida no-albicans*. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* **2011**, *29*, 568–572. [CrossRef] [PubMed]



ANEXO A (Comprovante de Aprovação do Comitê de Ética)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Candidemia na Região Nordeste: Primeiro Estudo Epidemiológico Molecular por MLST Associado a Rápida Detecção de Resistência Antifúngica por MALDI-TOF MS

Pesquisador: Ana Emília de Medeiros Roberto

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 58801316.5.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.979.057

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de doutorado intitulado "Candidemia na Região Nordeste: Primeiro Estudo Epidemiológico Molecular por MLST Associado a Rápida Detecção de Resistência Antifúngica por MALDI-TOF MS". Será desenvolvido por Ana Emília de Medeiros Roberto, sob a orientação do Prof. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto do Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos. O estudo apresenta em seu desenho a utilização de hemoculturas provenientes de pacientes internados nas Unidades de Terapia Intensiva do Hospital das Clínicas-PE. As amostras serão obtidas no Laboratório de Análises Clínicas do referido hospital para o diagnóstico de candidemia, estudo epidemiológico e a relação entre alterações espectrais e resistência antifúngica.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

As pendências apresentadas foram corrigidas.

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).

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:** cepccs@ufpe.br

ANEXO B (Comprovante de Submissão do Artigo 2)

Fwd: Confirmation of your submission to Journal of Medical Case Reports - JMCR-D-21-00269 - [EMID:1c314af934171d75]

De: **Journal of Medical Case Reports Editorial Office** <em@editorialmanager.com>

Date: qui., 4 de mar. de 2021 às 14:14

Subject: Confirmation of your submission to Journal of Medical Case Reports - JMCR-D-21-00269 - [EMID:1c314af934171d75]

To: Reginaldo Gonçalves Lima-Neto <reginaldo.limant@ufpe.br>

JMCR-D-21-00269

Candidemia in pediatric patient with microcephaly: first case report in Brazil

Ana Medeiros Roberto, Ph.D.; Cícero Pinheiro Inácio, Ph.D.; Cláudia Lacerda Vidal, MD., Ph.D.; Rejane Pereira Neves, Ph.D.; Sylvia Lemos Hinrichsen, MD., Ph.D.; Reginaldo Gonçalves Lima-Neto, Ph.D.

Journal of Medical Case Reports

Dear Prof Lima-Neto,

Thank you for submitting your manuscript,

"Candidemia in pediatric patient with microcephaly: first case report in Brazil", to Journal of Medical Case Reports

The submission id is: JMCR-D-21-00269

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following website:

<https://www.editorialmanager.com/jmcr/>