

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**CANDIDEMIA EM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DO
TRIÂNGULO MINEIRO: ESTUDO PROSPECTIVO**

PAULA AUGUSTA DIAS FOGAÇA DE AGUIAR

UBERLÂNDIA
2021

PAULA AUGUSTA DIAS FOGAÇA DE AGUIAR

CANDIDEMIA EM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DO TRIÂNGULO MINEIRO: ESTUDO PROSPECTIVO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Profa. Dra. Denise Von Dolinger de Brito Röder

UBERLÂNDIA
2021

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

A282 Aguiar, Paula Augusta Dias Fogaça de, 1976-
2021 Candidemia em Hospital Universitário do Triângulo
Mineiro: estudo prospectivo [recurso eletrônico] :
Candidemia em Hospital Universitário do Triângulo
Mineiro: estudo prospectivo / Paula Augusta Dias Fogaça
de Aguiar. - 2021.

Orientadora: Denise Von Dolinger de Brito Röder.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Ciências da Saúde.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2021.153>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Ciências médicas. I. Röder, Denise Von Dolinger de
Brito, 1976-, (Orient.). II. Universidade Federal de
Uberlândia. Pós-graduação em Ciências da Saúde. III.
Título.

CDU: 61

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

FOLHA DE APROVAÇÃO

Paula Augusta Dias Fogaça de Aguiar

CANDIDEMIA EM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DO TRIÂNGULO MINEIRO: ESTUDO PROSPECTIVO

Presidente da banca: Profa. Dra. Denise Von Dolinger de Brito Röder

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Banca examinadora:

Titular: Profa. Dra. Érika Nascimento Castro Dias
Instituição: Claretiano Centro Universitário e FMRP/USP

Titular: Profa. Dra. Poliana de Castro Melo
Instituição: UFTM

Titular: Prof. Dr. Mário Paulo Amante Penatti
Instituição: UFU

Titular: Prof. Dra. Ralciane de Paula Menezes
Instituição: UFU

Suplente: Prof. Dr. Reginaldo dos Santos Pedroso
Instituição: UFU



ATA

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências da Saúde				
Defesa de:	Tese de Doutorado Nº 002/PPCSA				
Data:	24.02.2021	Hora de início:	08:00h	Hora de encerramento:	12:00h
Matrícula do Discente:	11713CSD015				
Nome do Discente:	Paula Augusta Dias Fogaça de Aguiar				
Título do Trabalho:	Candidemia em Hospital Universitário do Triângulo Mineiro: Estudo Prospectivo				
Área de concentração:	Ciências da Saúde				
Linha de pesquisa:	1: Epidemiologia da ocorrência de doenças e agravos à saúde				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Epidemiologia das infecções hospitalares				

Reuniu-se em web conferência pela plataforma Mconf-RNP, em conformidade com a PORTARIA Nº 36, DE 19 DE MARÇO DE 2020 da COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR - CAPES, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Érika Nascimento Castro Dias (FMRP/USP), Poliana de Castro Melo (Universidade Estadual de Santa Cruz), Mário Paulo Amante Penatti (UFU), Ralciane de Paula Menezes (UFU) e Denise Von Dolinger de Brito Röder (UFU) (UFU) orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dra. Denise Von Dolinger de Brito Röder (UFU), apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu a Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Erika Nascimento, Usuário Externo**, em 24/02/2021, às 11:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Denise Von Dolinger de Brito Roder, Professor(a) do Magistério Superior**, em 24/02/2021, às 12:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ralciane de Paula Menezes, Técnico(a) de Laboratório**, em 24/02/2021, às 12:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mário Paulo Amante Penatti, Professor(a) do Ensino Básico, Técnico e Tecnológico**, em 24/02/2021, às 12:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Poliana de Castro Melo, Usuário Externo**, em 24/02/2021, às 12:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2585071** e o código CRC **DCA0BD08**.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho às minhas filhas Gabriela e
Giovana, razões da minha existência.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder o dom da vida e por permitir estar viva.

Ao meu marido Alexandre, pelos anos de amor, amizade, companheirismo, compreensão e apoio.

Às minhas filhas, Gabriela e Giovana, minhas razões de viver.

Aos meus pais, Luiz Américo e Maria Helena, pelo apoio e amor durante toda a minha vida.

Aos meus irmãos, Patrícia e Júnior, pelo apoio.

À minha orientadora, Profa. Dra. Denise Von Dolinger de Brito Röder, pelo apoio e confiança.

Aos meus amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Análises Clínicas do HCU-UFU, em especial à Maria Vitória Bossolani, por todo o apoio durante esses longos anos de convivência.

Ao meu grande amigo, Mário Paulo Amante Penatti, que esteve sempre comigo, demonstrando disponibilidade, paciência, compreensão e caminhou a meu lado na execução deste trabalho.

Aos amigos do setor de Microbiologia dos Laboratórios de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas de Uberlândia (HCU-UFU) e Check-Up Medicina Laboratorial, em especial ao Tomaz de Aquino Moreira e João Paulo Pimenta, pela imensa cooperação e auxílio na execução desta pesquisa.

À Nágela Bernadelli Sousa Silva, mestre em Ciências da Saúde-UFU, pela valiosa ajuda na etapa de realização de pesquisa de Biofilme.

À biomédica, ex-aluna do curso de Biomedicina, Andressa Baiense, pelo auxílio na coleta dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido.

Ao Prof. Dr. Lúcio Borges de Araújo, FAMAT-UFU, pelo auxílio com as análises estatísticas.

Aos pacientes, pela cooperação pelo avanço da ciência.

À Viviane e Gisele, secretárias do programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde-UFU, por toda a ajuda nestes longos anos.

Aos Laboratórios de Análises Clínicas do HCU-UFU e Check-Up Medicina Laboratorial e também ao Laboratório do Curso Técnico em Análises Clínicas da Escola Técnica de Saúde da UFU (ESTES-UFU), pela cessão do espaço físico e a doação de insumos para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mário Paulo Amante Penatti e à Dra. Ralciane de Paula Menezes, pelos valiosos conselhos durante a fase de qualificação do doutorado.

À Prof. Dra. Érika Nascimento Castro Dias, à Prof. Dra. Poliana Castro Melo, ao Prof. Dr. Mário Paulo Amante Pennatti, ao Prof. Dr. Reginaldo dos Santos Pedroso e à Ralciane de Paula Menezes pelo aceite em participar como membros da banca de defesa e pelos apontamentos realizados. Agradeço imensamente.

À UFU e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pela oportunidade concedida para a realização de uma pesquisa de qualidade.

“Life is what happens to you while you're busy making other plans.”

John Lennon

RESUMO

Introdução: O número de infecções fúngicas associadas aos cuidados de saúde vem aumentando nas últimas décadas, sendo provavelmente uma consequência dos avanços nas terapias médicas e cirúrgicas. O uso amplo de modalidades agressivas de tratamento contribuiu para o aumento do número de pacientes em risco de desenvolvimento de infecção fúngica invasiva, em especial a Candidíase. **Objetivos:** Avaliar a ocorrência de Candidemia e respectivos agentes etiológicos, os fatores de risco para o desenvolvimento da doença e aqueles associados à mortalidade em 30 dias, investigar as características fenotípicas como a produção de biofilme e determinar a susceptibilidade antifúngica de *Candida* spp. isoladas da corrente sanguínea de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Uberlândia (HCU). **Material e Métodos:** Este foi um estudo de coorte com duração de dois anos, conduzido de Julho de 2017 a Julho de 2019 no HCU. Foram estudadas amostras de *Candida* spp. e os dados clínico-epidemiológicos dos pacientes com Candidemia. Os isolados foram identificados através três técnicas: ágar cromogênico CHROMagar™ Candida Medium, provas bioquímicas automatizadas (VITEK®-2) e espectrometria de massas (MALDI-TOF/MS). O teste de susceptibilidade aos antifúngicos foi realizado utilizando os cartões do sistema automatizado VITEK®-2. Os testes de biofilme foram conduzidos através de técnicas espectrofotométricas convencionais (Coloração com Cristal Violeta e Ensaio de Redução do Sal XTT) e espectrometria de massas (MALDI-TOF/MS). Os dados clínico-demográficos dos pacientes (sexo, idade, comorbidades, tempo e local de internação hospitalar, medicação de uso crônico, dispositivos invasivos, tratamento antifúngico e duração do tratamento, uso prévio de antimicrobianos, desfecho da doença) foram extraídos dos pronturários. As análises estatísticas dos fatores de risco associados à mortalidade em 30 dias foram realizadas pelas regressões logísticas univariada e múltipla, seguida da seleção de variáveis pelo Método Stepwise. A concordância entre as técnicas utilizadas para a identificação das leveduras foi feita utilizando o teste Kappa. As curvas de sobrevivência dos pacientes foram construídas usando o método de Kaplan-Meier; valores de $p \leq 0,05$ foram

estatisticamente significativos. **Resultados:** A maioria dos pacientes foi do sexo masculino (65%), acima dos 60 anos (45%). O uso de CVC (90%), cateter vesical (64%), ventilação mecânica (57%) e nutrição parenteral (55%) foram os dispositivos invasivos mais encontrados; o uso prévio de antimicrobianos (96%), cirurgia abdominal prévia (43%), doenças crônicas como neoplasia (27%) e HAS (20%) foram as comorbidades mais frequentes. O tratamento antifúngico foi realizado em 85% dos pacientes, principalmente com fluconazol; 15% dos pacientes não receberam tratamento, pois a maioria evoluiu para o óbito antes do diagnóstico de Candidemia. A taxa de mortalidade por Candidemia foi 56%; a idade acima dos 60 anos, a presença de cateter vesical e a internação em UTI foram os fatores de risco independentes para a mortalidade em 30 dias ($p < 0,05$). A instituição precoce do tratamento contribuiu para uma menor mortalidade ($p < 0,0001$); não houve diferença estatística na sobrevivência dos pacientes com relação às espécies de *Candida*. Durante o período de estudo, 113 pacientes receberam o diagnóstico de Candidemia e foram obtidos 126 isolados de *Candida* spp., sendo 41 *C. albicans*; 27 *C. tropicalis*; 18 *C. glabrata*; 17 *C. parapsilosis stricto sensu*; 10 *C. krusei*; 3 *C. kefyr*; 3 *C. lusitanae*; 2 *C. pelliculosa*; 2 *C. guilliermondii*; 2 *C. orthopsilosis* e 1 *C. dubliniensis*. A melhor correlação entre as metodologias foi entre VITEK[®]-2 e MALDI-TOF/MS, sendo considerada quase perfeita ($K = 0,833$) e significativa ($p < 0,0001$). A maioria dos isolados (95%) apresentou susceptibilidade aos antifúngicos utilizados e todos foram produtores de biofilme, sendo a maioria fortemente produtora, apresentando alta quantificação de biomassa (95%) e alta atividade metabólica (99%); MALDI-TOF/MS foi capaz de detectar proteínas específicas do biofilme, uma vez que os perfis proteômicos dos isolados produtores de biofilme foram distintos daqueles das cepas não produtoras. **Conclusão:** Candidemia pode alcançar altas taxas de mortalidade; o conhecimento dos fatores de risco, o diagnóstico precoce, a identificação correta das espécies envolvidas, a identificação de fatores de virulência como a formação de biofilme e a instituição da terapia adequada e em tempo hábil são fundamentais para o manejo da doença.

Palavras-chave: *Candida* spp., Candidemia, Biofilme, MALDI-TOF/MS, Mortalidade

ABSTRACT

Introduction: The number of fungal infections associated with health care has increased in recent decades, probably a consequence of advances in medical and surgical therapies. The wide use of aggressive treatment modalities has contributed to the increase in the number of patients at risk of developing invasive fungal infection, especially Candidiasis. **Objectives:** To evaluate the occurrence of Candidemia and its etiological agents, risk factors for the development of the disease and those associated with mortality in 30 days, investigate phenotypic characteristics such as biofilm production and to determine the antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from the bloodstream of patients treated at Hospital de Clínicas de Uberlândia (HCU). **Material and Methods:** This was a two-year cohort study, conducted from July 2017 to July 2019 at HCU. Samples of *Candida* spp. and clinical and epidemiological data from patients (gender, age, comorbidities, time and place of hospital stay, medication for chronic use, invasive devices, antifungal treatment and duration of treatment, previous use of antimicrobials, disease outcome) with Candidemia were studied. The isolates were identified using three techniques: CHROMagar™ Candida Medium Chromogenic Agar, Automated Biochemical Tests (VITEK®-2) and Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS). The antifungal susceptibility test was performed using the cards from the automated VITEK®-2 system. The biofilm tests were conducted using conventional spectrophotometric techniques (Violet Crystal Staining and XTT Salt Reduction Assays) and Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS). Statistical analyzes of risk factors associated with 30-day mortality were performed using univariate and multiple logistic regressions, followed by the selection of variables using the Stepwise Method. The agreement between the techniques used for the identification of yeasts was made using the Kappa test. Patient survival curves were constructed using the Kaplan-Meier method; $p \leq 0.05$ values were statistically significant. **Results:** Most patients were male (65%), over 60 years old (45%). The presence of CVC (90%), bladder catheter (64%), mechanical ventilation (57%) and parenteral nutrition (55%) were the most commonly found invasive devices; previous use of antimicrobials (96%), chronic

diseases such as neoplasia (27%), systemic arterial hypertension (20%) and previous abdominal surgery (43%) were the most frequent comorbidities. Antifungal treatment was performed in 85% of the patients, mainly with fluconazole. Candidemia mortality was 56%; age over 60 years, the presence of a bladder catheter and admission to the ICU were the independent risk factors for mortality in 30 days ($p < 0.05$). Early treatment initiation contributed to lower mortality ($p < 0.0001$); there was no statistical difference in patient survival with respect to *Candida* species. During the study period, 113 patients were diagnosed with Candidemia and 126 *Candida* spp. isolates were obtained; 41 were *C. albicans*; 27 *C. tropicalis*; 18 *C. glabrata*; 17 *C. parapsilosis*; 10 *C. krusei*; 3 *C. kefyr*; 3 *C. lusitanae*; 2 *C. pelliculosa*; 2 *C. guilliermondii*; 2 *C. orthopsilosis* and 1 *C. dubliniensis*. The best correlation between the methodologies was between VITEK[®]-2 and MALDI-TOF/MS, being considered almost perfect ($K = 0.833$) and significant ($p < 0.0001$). Most of the isolates (95%) were susceptible to the antifungals used and all were biofilm producers, most of them strongly producers, with high quantification of biomass (95%) and high metabolic activity (99%); MALDI-TOF / MS was able to detect specific biofilm proteins, since the proteomic profiles of biofilm-producing isolates were different from those of non-producing strains. **Conclusion:** Candidemia can reach high mortality rates; the knowledge of risk factors, early diagnosis, the correct identification of the species involved, virulence factors such biofilm-forming strains and the institution of therapy in a timely manner are fundamental for the management of the disease.

Keywords: *Candida* spp., Candidemia, Biofilm, MALDI-TOF/MS, Mortality

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Patogênese de Candidíase Invasiva	23
Figura 1 (artigo 1): Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meyer em relação ao tratamento antifúngico	42
Figura 2 (artigo 1): Distribuição de espécies de <i>Candida</i> e Curva de sobrevivência de Kaplan-Meyer em relação ao desfecho da doença	44
Figura 1 (artigo 2): Espectros de Massas de <i>C. albicans</i>	62
Figura 2 (artigo 2): Espectros de Massas de <i>C. tropicalis</i>	63
Figura 3 (artigo 2): Espectros de Massas de <i>C. glabrata</i>	64
Figura 4 (artigo 2): Espectros de Massas de <i>C. parapsilosis</i>	65
Figura 5 (artigo 2): Espectros de Massas de <i>C. krusei</i>	66
Figura 6 (artigo 2): Composite Correlation Index <i>Candida</i> spp.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 (Artigo 1): Fatores de risco associados à mortalidade em 30 dias de pacientes com infecção de corrente sanguínea por <i>Candida</i> spp	40
Tabela 2 (Artigo 1): Perfil de susceptibilidade antifúngica dos isolados de <i>Candida</i> spp.	43
Tabela 1 (Artigo 2): Classificação da produção de biofilme de isolados de <i>Candida</i> spp.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2D-DIGE	Two-dimensional difference gel electrophoresis
2D-PAGE	Two-dimensional gel electrophoresis
ASD	Agar Sabouraud Dextrose
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain-Heart Infusion
°C	Graus Celsius
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CNA	<i>Candida não-albicans</i>
CVC	Cateter Venoso Central
dL	Decilítros
DM	Diabetes Mellitus
DO	Densidade óptica
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
g	Gravitacional
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HCU-UFU	Hospital de Clínicas de Uberlândia-Universidade Federal de Uberlândia
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IRC	Insuficiência Renal Crônica
K	Kappa
M	Molar
mg	Miligramas
µg	Microgramas
mL	Militros
mM	miliMol
µL	Microlitros
MALDI-TOF/MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight
MIC	Concentração Inibitória Mínima
min	Minutos
MOPS	N-morfolino propanossulfônico ácido
nm	Nanometros

m/z	Razão massa/carga
®	Marca Registrada
RPM	Rotações por minuto
spp.	Espécies indeterminadas; o conjunto de formas em estudo comporta representantes de várias espécies que, por alguma razão, não se considerou necessário explicitá-las
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
™	Trade Mark
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
XTT	2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenil)-2H-tetra-zólio-5 carboxanilida

SUMÁRIO

1- Introdução	19
1.1- Justificativa	20
2- Fundamentação Teórica	23
2.1- Microbiologia, ecologia e patogênese de <i>Candida</i> spp.	23
2.2- Candidemia em Hospitais Brasileiros	25
2.3- Tratamento	26
2.4- Diagnóstico Laboratorial	27
2.4.1- Identificação de <i>Candida</i> spp.	27
2.4.2- Resistência antifúngica in vitro de <i>Candida</i> spp.	29
3- Objetivos	31
4- Resultados	32
4.1- Artigo 1: Alta mortalidade por <i>Candida</i> spp. em Hospital de referência no Brasil: aspectos clínicos-epidemiológicos e laboratoriais	33
4.2- Artigo 2: Detecção rápida de <i>Candida</i> spp. produtoras de biofilme através de MALDI-TOF/MS	55
5-Referências	75
6- Anexos	83
6.1- Anexo 1: Aprovação do CEP-UFU	83
7- Apêndices	84
7.1- Ficha de levantamento de dados de prontuários	84

1- INTRODUÇÃO

O número de infecções fúngicas associadas aos cuidados de saúde vem aumentando nas últimas décadas, sendo provavelmente uma consequência dos avanços nas terapias médicas e cirúrgicas. O uso amplo de modalidades de tratamento agressivas (transplante de células-tronco hematopoéticas, transplante de órgãos sólidos, novos agentes quimioterápicos e agentes imunomoduladores) contribuiu para o aumento do número de pacientes imunocomprometidos em risco de desenvolvimento de infecção fúngica invasiva, em especial a Candidíase e Aspergilose (PAPPAS *et al.*, 2018).

A infecção da corrente sanguínea, Candidemia, é a forma mais comum de infecção invasiva por *Candida* spp. e está associada a altos índices de mortalidade, geralmente acima de 30% (ZHANG *et al.*, 2019). Tradicionalmente, os pacientes mais acometidos são os criticamente doentes em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), aqueles submetidos à cirurgia abdominal e os neutropênicos, sendo as principais causas da candidemia a colonização de cateteres permanentes, a translocação intestinal para a corrente sanguínea ou a deiscência de anastomose após laparotomia (PAPPAS *et al.*, 2019).

Embora seja relatado que a maioria dos casos de infecções fúngicas aconteça em pacientes internados nas UTI, estudos vêm demonstrando um aumento dos casos de Candidemia em pacientes internados em outras alas hospitalares, como as enfermarias de medicina interna (BASSETTI *et al.*, 2019). Este aumento pode ser explicado tanto por haver uma maior percepção, pela equipe médica assistente, da possibilidade de os pacientes adquirirem a infecção por *Candida* spp., bem como pelo aumento do número de internações de pacientes idosos que compartilham muitos fatores de risco para a aquisição de infecção fúngica com os pacientes internados em unidades críticas, tais como cateteres vasculares centrais (CVC), tempo prolongado de terapia nutricional parenteral, cateteres urinários e terapia antimicrobiana de amplo espectro (BIENVENU *et al.*, 2020).

O gênero *Candida* possui mais de 200 espécies descritas; cinco delas (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*

complex e *Candida krusei*) representam mais de 90% dos isolados clínicos (POTE *et al.*, 2020). *C. albicans* é a espécie mais frequentemente encontrada nos isolamentos clínicos em todo o mundo, sendo detectada em 38-70% dos casos em estudos de base populacional; entretanto estudos recentes relatam um aumento do isolamento de espécies não-*albicans*, particularmente na última década (AL-DORZI *et al.*, 2020; BASSETTI *et al.*, 2019; DOI *et al.*, 2016; KHOURI *et al.*, 2016; MARINS *et al.*, 2018; MEDEIROS *et al.*, 2019; PFALLER *et al.*, 2019; POISSY *et al.*, 2020; TSAY *et al.*; 2020).

As taxas de incidência de Candidemia variam consideravelmente entre áreas geográficas e centros médicos. Na Europa e nos EUA, diferentes estudos têm relatado taxas de incidência de 7,07/1.000 admissões em UTI e de 7 casos/100.000 pessoas, respectivamente (BASSETTI *et al.*, 2019; TSAY *et al.*, 2020). No Brasil e na América Latina, Candidemia é um importante problema; as taxas de incidência relatadas podem variar de 0,33 a 6 casos/1.000 admissões hospitalares (DOI *et al.*, 2016). A grande variação destas taxas é, provavelmente, devido a uma combinação de vários fatores, incluindo as diferenças de recursos disponíveis para os programas de assistência médica e de formação, dificuldades na implementação de programas de controle de infecção em hospitais dos países em desenvolvimento, número limitado de trabalhadores para cuidar dos pacientes em unidades de cuidados intensivos e as práticas menos agressivas de terapia antifúngica empírica e profilaxia para os pacientes de alto risco (PAPPAS *et al.*, 2018).

1.1- Justificativa

A avaliação epidemiológica das doenças fúngicas é fundamental para priorizar estratégias de prevenção, diagnósticas e intervenções terapêuticas. O número de casos de doenças fúngicas está aumentando, dada a expansão de pacientes em risco para essas infecções, incluindo aqueles que vivem com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), os transplantados, pacientes com câncer, neonatos prematuros e os idosos.

A identificação do gênero *Candida* através de provas bioquímicas clássicas é a metodologia mais comumente utilizada na rotina dos laboratórios

de Microbiologia e, apesar de possuir boa sensibilidade, é um método trabalhoso e demorado, podendo ainda gerar resultados inconclusivos e até mesmo a não identificação correta da espécie. Outras abordagens de diagnóstico capazes de identificar, de forma assertiva, um grande número de espécies de *Candida*, estão disponíveis, tais como os métodos moleculares; entretanto estes são onerosos e ainda não fazem parte da bancada de rotina da grande maioria dos laboratórios de microbiologia do país. Neste contexto, a avaliação da análise proteômica dos micro-organismos promovida através da metodologia Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight/Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS), surgiu como uma ferramenta poderosa para melhorar a qualidade de identificação microbiológica. Esta metodologia tem sido considerada revolucionária na Microbiologia Clínica, principalmente em relação à velocidade e à confiabilidade dos resultados, podendo apresentar o potencial de melhorar sobremaneira a correta especificação de *Candida* spp. A identificação correta e confiável de espécies do mesmo gênero que apresentam diferentes perfis de susceptibilidade aos antifúngicos, como acontece com *Candida*, é fundamental para a tomada de decisões terapêuticas adequadas, contribuindo desta forma para um melhor prognóstico na evolução dos pacientes que apresentam Candidemia.

Além disto, em um cenário em que as infecções fúngicas disseminadas por patógenos emergentes estão aumentando, a necessidade de um diagnóstico rápido e preciso é obrigatória, a fim de alcançar resultados positivos do tratamento. A identificação de espécies por espectrometria de massas já representa uma realidade no laboratório clínico rotineiro; a implementação desta metodologia para pesquisa de alguns fatores de virulência simultaneamente à etapa de identificação, como a pesquisa de cepas com o potencial de produzir biofilme, pode ser um passo à diante na luta contra as infecções fúngicas.

Devido à preocupação de que cepas resistentes ou com susceptibilidade reduzida a antifúngicos possam se tornar mais prevalentes, é importante avaliar o perfil de susceptibilidade de agentes infecciosos aos antimicrobianos, buscando caracterizar possíveis tendências temporais ou geográficas na frequência deste fenômeno em relação a diferentes patógenos. A avaliação periódica permite monitorar causas de falência terapêutica a estes

medicamentos.

Candida spp. são os fungos que mais comumente causam infecção de corrente sanguínea. Assim, fazer a correta identificação de suas muitas espécies de forma rápida e segura, conhecer a epidemiologia do serviço de saúde, bem como a susceptibilidade às drogas antifúngicas é fundamental para o manejo desta infecção que ainda apresenta altos índices de mortalidade em nosso país.

2- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1- Microbiologia, ecologia e patogênese de *Candida* spp.

Candida spp. são fungos leveduriformes, ovais pertencentes à classe dos hemiascomicetos e que produzem brotamento; algumas espécies podem produzir pseudo-hifas e hifas. Estas leveduras fazem parte da microbiota humana; são encontrados principalmente na cavidade oral e no trato gastrointestinal de mais de 75% da população e comumente colonizam o trato geniturinário e a pele (PAPPAS *et al.*, 2018). A translocação dos microorganismos da pele e do trato gastrointestinal para a corrente sanguínea torna-se um pré-requisito para que a infecção ocorra e é geralmente consequência do aumento anormal da colonização, associada à diminuição das defesas do hospedeiro, sendo a patogênese de *Candida* spp. geralmente resultante da combinação de aumento da carga fúngica com a quebra da barreira cutâneo-mucosa (**Figura 1**).

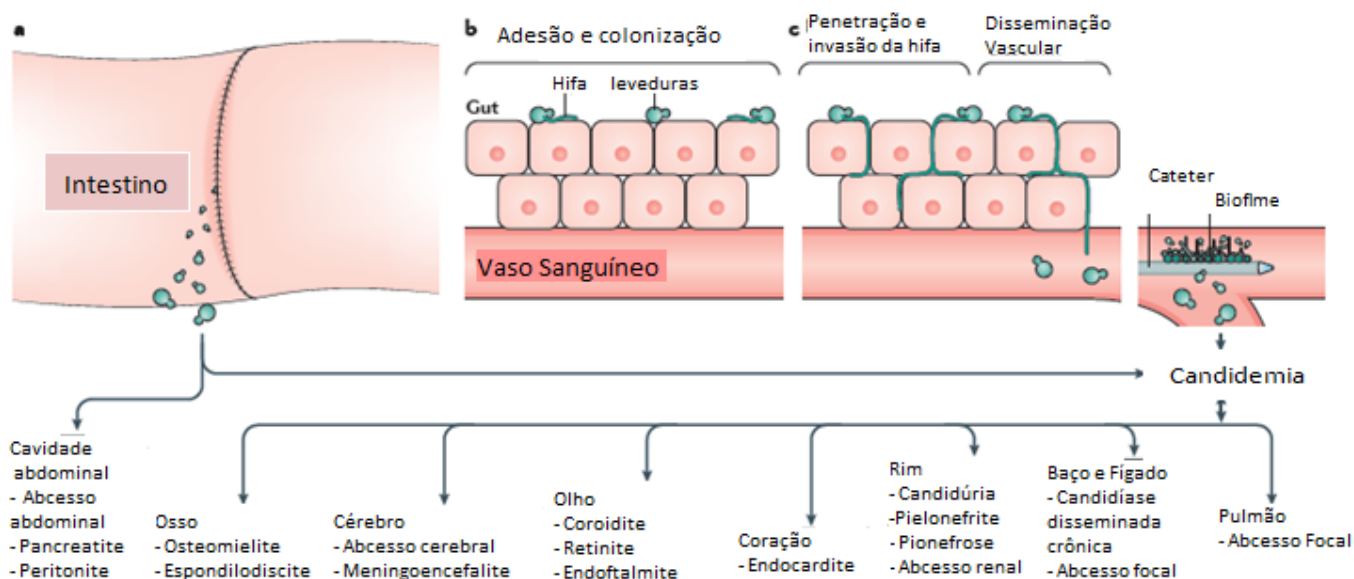


Figura 1: Patogênese de Candidíase Invasiva (adaptado de PAPPAS *et al.*, 2018)

Candida albicans é a espécie mais frequentemente encontrada nos isolados clínicos de todo o mundo (POTE *et al.*, 2020). Entretanto, nos últimos anos, espécies de *Candida* não-*albicans* (CNA) têm sido responsáveis por um número cada vez maior de infecções invasivas, principalmente *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* complex e *C. krusei*; as quais em associação com *C.*

albicans, perfazem mais de 90% dos isolados clínicos (PAPPAS *et al.*, 2018; DELAVY *et al.*, 2019). A ocorrência de Candidemia por espécies não-*albicans* chama atenção devido a sua maior gravidade e pelo fato de algumas espécies serem menos susceptíveis a ação dos antifúngicos, o que limita as opções terapêuticas, podendo impactar diretamente no aumento da mortalidade (PFALLER *et al.*, 2019).

Candida spp. possuem a capacidade de aderir às superfícies e formar biofilmes, tanto em superfícies do corpo, bem como em dispositivos protéticos, incluindo cateteres urinários e dispositivos intravasculares (DEL POZO, 2018). A maioria das espécies de *Candida* possui ainda a capacidade de conversão da fase leveduriforme para a fase de hifas, para que ocorra uma maior aderência às superfícies. Além disto, a formação dos biofilmes conduz à regulação dos mecanismos de resistência às drogas antifúngicas, em especial aos derivados imidazólicos (SARDI *et al.*, 2014). As células fúngicas presentes na matriz dos biofilmes podem se dispersar pela corrente sanguínea e disseminar para outros órgãos, fato que contribui para a elevação das taxas de mortalidade em pacientes com Candidemia (PIERCE *et al.*, 2017; NET; ANDES, 2020).

A pesquisa de biofilme geralmente é realizada através de metodologias espectrofotométricas convencionais e também através da visualização destes através de microscopia eletrônica (NET; ANDES, 2020). Entretanto, novas metodologias, como a espectrometria de massas por dessorção/ionização-tempo de voo (MALDI-TOF/MS), vêm ganhando espaço nos laboratórios de Microbiologia; não só para a correta identificação de micro-organismos (PATEL, 2015; CASSAGNE *et al.*, 2016), mas também como uma forma de identificação rápida de fatores de virulência, como a resistência aos antimicrobianos (CHARRETIER; SCHRENZEL, 2016; DELAVY *et al.*, 2019; ROBERTO *et al.*, 2020) e a capacidade de produção de biofilme (De CAROLIS *et al.*, 2019). MALDI-TOF/MS representa uma ferramenta com alta especificidade, facilidade de manuseio, baixo custo de insumos e rapidez de resultados; sendo assim, informações rápidas e seguras sobre isolados com potencial de produzir biofilmes podem contribuir para melhorar os resultados do tratamento de pacientes com Candidemia (De CAROLIS *et al.*, 2019; DELAVI *et al.*; 2019; OVIANO; RODRIGUES-SANCHES, 2020).

2.2- Candidemia em hospitais brasileiros

Candidemia é um problema crescente em hospitais de cuidados terciários em todo o mundo. É uma causa de sepse tardia e os fatores de risco incluem terapia antimicrobiana de amplo espectro, internação em UTI por mais de 72 horas, terapia imunossupressora, nutrição parenteral e múltiplos procedimentos médicos invasivos (BASSETTI *et al.*, 2019).

A taxa de mortalidade por Candidemia em estudos brasileiros é variável; segundo Khoury e colaboradores (2016), esta foi em torno de 43%. De acordo com Marins e colaboradores (2018), 51,3% dos pacientes evoluíram para o óbito devido à doença; já Doi e colaboradores (2016) e Alves e colaboradores (2020) relataram uma taxa de mortalidade de 72,2% e 54,6%, respectivamente.

Embora *Candida albicans* seja a espécie mais frequentemente encontrada nos isolamentos clínicos, o número de infecções causadas por espécies não-*albicans* vêm aumentando nas últimas décadas (DOI *et al.*, 2016; MARINS *et al.*, 2018). Como a susceptibilidade antifúngica varia entre as espécies de *Candida*, é de fundamental importância conhecer a prevalência destas no serviço hospitalar (PAPPAS *et al.*, 2018). Além disto, Ismail e colaboradores (2018) relatam que as fungemias, dentre elas a Candidemia, são causas de aumento de custos nos serviços de saúde, uma vez que os tratamentos antifúngicos em geral são mais longos, o que acarreta um maior tempo de permanência dos pacientes dentro do âmbito hospitalar e também são mais caros do que os medicamentos utilizados para o tratamento da sepse causada por outros micro-organismos.

No Brasil e na América Latina, Candidemia é um importante problema, e as taxas de incidência relatadas podem variar de 0,33-6 casos/1.000 admissões hospitalares (DOI *et al.*, 2016). Segundo Menezes e colaboradores (2015) as peculiaridades regionais bem como a complexidade de cada serviço hospitalar podem influenciar a predominância das espécies de *Candida*, principalmente entre aquelas não-*albicans*.

Vallabhaneni e colaboradores (2017) afirmam que a quantificação global dos casos de infecção causada por fungos é um desafio, uma vez que as infecções fúngicas sistêmicas são frequentemente difíceis de diagnosticar por se manifestarem com sintomas inespecíficos; o diagnóstico, na maioria dos casos, requer a coleta de amostras biológicas, como o sangue. Além disto,

existem grandes dificuldades, por parte dos serviços de saúde, em documentar o número de infecções causadas por estes micro-organismos, sendo este dado extraído dos registros de alta hospitalar, fato que contribui para a subnotificação desta doença (MARINS *et al.*, 2018).

Segundo Doi e colaboradores (2016) poucos estudos multicêntricos foram publicados no Brasil sobre a incidência de Candidemia, populações susceptíveis, taxa de mortalidade e taxa de resistência antifúngica *in vitro*. Sendo assim, estudos epidemiológicos de vigilância são fundamentais e contribuem, sobremaneira, para a melhor compreensão desta doença.

2.3- Tratamento

Os *guidelines* recentes preconizam que o tratamento da Candidemia seja realizado, preferencialmente, com drogas da classe das equinocandinas (Anidulafungina, Caspofungina ou Micafungina) (WANG *et al.*, 2019); entretanto, devido ao alto custo destes medicamentos, muitos países ainda utilizam os derivados azólicos como a primeira escolha (MARINS *et al.*, 2018). O uso dos derivados imidazólicos por tempo prolongado para o tratamento de outras formas de infecções fúngicas pode ser considerado um fator predisponente para a aquisição de resistência aos antifúngicos (WHALEY *et al.*, 2017). De acordo com Colombo e colaboradores (2013), o Fluconazol pode ser uma terapia alternativa para pacientes clinicamente estáveis com quadros leves, que não foram expostos a regimes de profilaxia com azólicos e que são admitidos em serviços médicos com baixa incidência de infecções causadas por *C. glabrata* e *C. krusei*. Entretanto, os centros médicos que possuem taxas de incidência superiores a 10% das cepas resistentes ao Fluconazol não devem usar este medicamento antes que a espécie de *Candida* seja identificada.

O tratamento profilático já está bem estabelecido para determinados pacientes, como os neutropênicos e aqueles submetidos a transplantes (Medula Óssea ou órgãos sólidos); entretanto, para aqueles não neutropênicos internados nas UTI, este ainda é controverso, uma vez que a profilaxia apresenta benefícios questionáveis, estando associada ao maior risco de efeitos adversos e contribuindo para o desenvolvimento de resistência aos

triazóis, podendo levar ao aumento dos custos de cuidados de saúde (COLOMBO *et al.*, 2013).

A emergência de resistência às equinocandinas em espécies com alta frequência de resistência ao azol eleva o espectro de patógenos fúngicos multi-resistentes. Sendo assim, a monitorização rigorosa da resistência antifúngica, principalmente entre as espécies não-*albicans*, torna-se prudente (BIENVENU *et al.*, 2020).

2.4- Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico clínico, com base na sintomatologia e na anamnese do paciente, não é conclusivo, pois os sinais e sintomas são inespecíficos. O padrão ouro para o diagnóstico laboratorial da infecção de corrente sanguínea por *Candida* spp. é a cultura; no entanto, este permanece um desafio para os médicos e microbiologistas uma vez que, na metade dos casos, não há a positividade das hemoculturas, ou seja, a sensibilidade deste exame é baixa, com índices abaixo de 50% (PAPPAS *et al.*, 2018). O sangue para a hemocultura deve ser coletado em frascos contendo meio de cultura que propiciem o crescimento das leveduras, o que pode levar mais de 96 horas. Entretanto, o tempo para positividade é espécie-dependente, visto que *C. glabrata* cresce mais lentamente do que *C. albicans*, por exemplo. Outros fatores que podem influenciar a sensibilidade da cultura de sangue incluem o volume de sangue, exposição à drogas antifúngicas e a própria técnica da cultura (LIOTT *et al.*, 2019). A dependência da positividade da hemocultura continua a ser um obstáculo significativo para a tomada de decisões relativas ao início da terapia antifúngica. Segundo Otasevic e colaboradores (2018), o desenvolvimento de ensaios *nonculture* (pesquisa de antígenos ou anticorpos no soro; detecção de β -D-glucan-BDG; Reação em Cadeia da Polimerase-PCR) confiáveis é fundamental para proporcionar a oportunidade de intervenção precoce com uma terapia antifúngica mais orientada para os pacientes em risco.

2.4.1- Identificação de *Candida* spp.

Candida albicans pode ser diferenciada de espécies não-*albicans* por técnicas simples, como a prova do tubo germinativo (PAPPAS *et al.*, 2018).

Entretanto, a identificação acurada em gênero e espécie se faz mandatória, uma vez que existem espécies intrinsecamente resistentes ao Fluconazol, como *Candida krusei* (GÓMEZ-GAVIRIA; MORA-MONTES, 2020). Stephaniuk e colaboradores (2016) relataram que o uso de meio cromogênico (CHROMagar™ *Candida* Medium) pode ser uma boa ferramenta para a especificação de *Candida* spp., permitindo a identificação presuntiva de algumas espécies de leveduras de interesse clínico como *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. Entretanto, embora estes meios sejam empregados amplamente na rotina dos laboratórios clínicos, esta técnica pode apresentar limitações, como a impossibilidade de distinção entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*, uma vez que ambas apresentam a mesma coloração verde no meio de cultura utilizado, o que pode acarretar a subnotificação desta espécie (ALBAINA *et al.*, 2015). Metodologias automatizadas para a identificação de leveduras, como as provas bioquímicas realizadas em aparelhos como o VITEK®-2 (bioMérieux, França) ou a análise proteômica por espectrometria de massas, através de MALDI-TOF/MS são alternativas eficazes para a correta identificação de *Candida* spp. (AMBARAGASSI *et al.*, 2019). Estudos relatam que a identificação dos micro-organismos realizada pelo MALDI-TOF/MS supera amplamente os resultados dos métodos fenotípicos clássicos, reduz o tempo da liberação do resultado e fornece uma identificação muito mais acurada em relação à espécie, inclusive para aquelas crípticas (XIE *et al.*, 2019). Sabe-se que as leveduras pertencentes ao complexo *C. parapsilosis* (*C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*) não são identificadas pelos métodos fenotípicos tradicionais (DE CAROLIS *et al.*, 2014; FONTECHA *et al.*, 2019). Sendo assim, para a correta diferenciação entre as três espécies deste complexo, diferentes técnicas moleculares baseadas na análise do DNA podem ser utilizadas; entretanto, estas técnicas, por serem dispendiosas, não estão disponíveis na rotina da grande maioria dos laboratórios de Micologia (ZHAO *et al.*, 2018). A análise proteômica destas leveduras realizada através de MALDI-TOF/MS apresenta excelente acurácia quando comparada à análise molecular, se tornando assim uma ferramenta diagnóstica mais simples, rápida, de baixo custo e que pode ser implementada facilmente na rotina da micologia (XIE *et al.*, 2019).

MALDI-TOF/MS é considerada uma ferramenta analítica poderosa que revolucionou Microbiologia Clínica, dadas a sua rapidez e confiabilidade para identificação dos micro-organismos (OVIAÑO; RODRÍGUEZ-SANCHES, 2020). Rotineiramente utilizado para a identificação bacteriana, Amiri-Eliasi e Fenselau (2001) descreveram a possibilidade da aplicação desta metodologia para a identificação de fungos (leveduriformes e filamentosos), confirmando seu papel fundamental no diagnóstico de infecções. Desde então, pesquisadores têm tentado encontrar para o MALDI-TOF/MS outras funções além da identificação microbiana; já foi descrito a possibilidade de detecção de resistência antifúngica de *Candida albicans* ao Fluconazol e às equinocandinas através da espectrometria de massas (CHARRETIER; SCHRENZEL, 2016; DELAVY *et al.*, 2019; ROBERTO *et al.*, 2020) e também a pesquisa de fatores de virulência de *Candida spp.*, como a capacidade de produção de biofilme (KUBESOVÁ *et al.*, 2012; MLYNÁRIKOVÁ *et al.*, 2016; DE CAROLIS *et al.*, 2019).

2.4.2- Resistência antifúngica *in vitro* de *Candida spp.*

A susceptibilidade das leveduras do gênero *Candida* aos antifúngicos disponíveis depende, dentre outros fatores, da espécie do isolado, sendo que a maioria delas apresenta susceptibilidade a estes medicamentos; entretanto, isolados resistentes têm sido descritos (DELAVY *et al.*, 2019; HART *et al.*, 2019; AL-DORZI *et al.*, 2020), o que pode complicar o quadro clínico do paciente, contribuindo para uma evolução de pior prognóstico. Esta é uma das razões da crescente importância dos testes de susceptibilidade, que devem ser realizados após a correta identificação do micro-organismo em relação ao gênero e espécie (PAPPAS *et al.*, 2018).

As metodologias de referência para a determinação da susceptibilidade a estas drogas têm como base a inibição de crescimento do agente etiológico em meio líquido contendo antifúngicos, distribuído em tubos ou microplacas (PFALLER *et al.*, 2019). O método de referência, utilizado para investigação *in vitro* de fenótipos resistentes a antifúngicos, foi desenvolvido a partir da década de 80, principalmente pelo Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI (CLSI, 2012); entretanto trata-se de método complexo, trabalhoso e demorado para ser usado de forma rotineira; sendo assim, há a necessidade de implementação de métodos alternativos, padronizados e confiáveis que sejam

adaptados para a rotina dos laboratórios de Microbiologia, como o sistema automatizado Vitek-2[®] (bioMérieux-França) ou E-test (PFALLER *et al.*, 2013). Embora a diluição em caldo proposta pelo CLSI seja o método de referência para a determinação da susceptibilidade antifúngica para *Candida* spp., Kathuria e colaboradores (2015) relatam haver uma boa concordância (90% para Caspofungina e 91% para Voriconazol) entre a metodologia de referência e o teste realizado em aparelhos automatizados, como o VITEK[®]-2. Entretanto, estes autores demonstraram discrepância nos resultados de Anfotericina B, sugerindo abordagem cautelosa quando dos testes de susceptibilidade realizados em leveduras raras, como *C. auris*. Segundo PFALLER e colaboradores (2013), o sistema Vitek[®]-2 mostrou ser uma técnica confiável para determinar o teste de susceptibilidade antifúngica para *Candida* spp., sendo uma alternativa mais rápida e fácil para laboratórios clínicos do que os procedimentos desenvolvidos pelo CLSI.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Avaliar a ocorrência de Candidemia e respectivos agentes etiológicos, investigar as características fenotípicas e determinar a susceptibilidade antifúngica de *Candida* spp. isoladas da corrente sanguínea de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Uberlândia (HCU), no período de Julho de 2017 a Junho de 2019.

3.2- Objetivos específicos

3.2.1) Caracterizar a frequência de Candidemia e as espécies de *Candida* spp. isoladas de pacientes internados no HCU-UFU.

3.2.2) Analisar os fatores predisponentes para a Candidemia nos diferentes setores do HCU-UFU e as características demográficas e clínicas dos pacientes que apresentaram a doença durante o período do estudo.

3.2.3) Comparar três metodologias para a identificação das leveduras: meio cromogênico (CHROMagar™ *Candida* Medium), provas bioquímicas automatizadas (VITEK®-2) e análise proteômica (MALDI-TOF/MS). Após a identificação das amostras, verificar:

3.2.3.1- A ocorrência de isolados de *C. dubliniensis* dentre fenótipos de *C. albicans* identificadas através do meio cromogênico.

3.2.3.2- A capacidade discriminatória do MALDI-TOF/MS em diferenciar as espécies crípticas do complexo *C. parapsilosis*.

3.2.4) Determinar a susceptibilidade aos antifúngicos Anfotericina B, Caspofungina, Fluconazol, Micafungina e Voriconazol através do sistema automatizado Vitek®-2 (bioMérieux).

3.2.5) Demonstrar a capacidade de detecção rápida de isolados produtores de biofilme através da espectrometria de massas MALDI-TOF/MS.

4- RESULTADOS

Os resultados desta tese serão apresentados na forma de dois artigos:

Artigo 1: “Alta mortalidade por *Candida* spp. em Hospital de referência no Brasil: aspectos clínico-epidemiológicos e laboratoriais”

Artigo 2: “Detecção rápida de *Candida* spp. produtoras de biofilme por MALDI-TOF/MS”

4.1- ARTIGO 1

Alta mortalidade por *Candida* spp. em Hospital de referência no Brasil: aspectos clínico-epidemiológicos e laboratoriais

P.A.D.F. Aguiar¹; T.A. Moreira²; L.B. Araújo³; D.V.D.B. Röder⁴

1: Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia (FAMED-UFU). Discente do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia.

2: Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas de Uberlândia (HC-UFU)

3: Faculdade de Matemática da Universidade Federal de Uberlândia (FAMAT-UFU)

4: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (ICBIM-UFU). Docente do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia.

Resumo

Introdução: Candidemia é um problema de saúde pública que apresenta alta taxa de mortalidade; acometendo pacientes imunocomprometidos, internados em UTI e submetidos a múltiplos procedimentos e dispositivos invasivos. **Objetivos:** analisar a evolução clínica dos pacientes com Candidemia, avaliar e identificar os preditores de mortalidade em 30 dias, comparar a identificação dos isolados de *Candida* spp., através das metodologias tradicionais e espectrometria de massas (MALDI-TOF/MS) e verificar o perfil de susceptibilidade antifúngica destes isolados. **Material e Métodos:** Estudo de coorte prospectivo que incluiu todos os pacientes internados no HCU-UFU, de Julho de 2017 a Julho de 2019, com diagnóstico laboratorial de Candidemia. Os dados clínico-demográficos foram extraídos dos prontuários; os isolados de *Candida* spp. foram identificados através de provas bioquímicas automatizadas (VITEK[®]-2), crescimento em ágar cromogênico CHROMagar[™] Candida Medium e espectrometria de massas MALDI-TOF/MS. Os testes de susceptibilidade antifúngica foram conduzidos no equipamento VITEK[®]-2. Os fatores de risco associados à mortalidade em 30 dias foram avaliados através de análise univariada e multivariada e as curvas de sobrevivência foram construídas pelo método de Kaplan-Meier. **Resultados:** Durante o período de estudo 113 pacientes apresentaram infecção de corrente sanguínea por *Candida* spp., sendo recuperados 126 isolados; os pacientes foram, em sua

maioria, homens (65%), com mais de 60 anos (45%); 85% dos pacientes receberam tratamento antifúngico com Fluconazol. A taxa de mortalidade em 30 dias foi de 56% e os fatores de risco estatisticamente significantes associados incluíram idade > 60 anos, uso de cateter vesical e internação nas UTI. Além disto, pacientes que não receberam tratamento antifúngico e aqueles em que este foi iniciado após 48 horas do diagnóstico da infecção apresentaram menor sobrevida ($p < 0,0001$). A espécie mais frequente foi *C. albicans* (30%) e MALDI-TOF/MS foi capaz de identificar espécies crípticas de *Candida* spp.; a maioria dos isolados (95%) apresentou susceptibilidade aos antifúngicos testados. **Conclusão:** Foi observada uma alta taxa de mortalidade em 30 dias e o início tardio da terapia antifúngica foi um fator crucial para piora no prognóstico do paciente. Assim, a identificação correta e rápida das espécies de *Candida* envolvidas e a introdução da terapia medicamentosa apropriada e em tempo hábil são fundamentais para o aumento na sobrevida do paciente.

Palavras-Chaves: Candidemia; Mortalidade; Fatores de risco; MALDI-TOF/MS; Susceptibilidade antifúngica.

Introdução

Infecções invasivas ocasionadas por espécies de *Candida*, especialmente Candidemia, são consideradas um grave problema de saúde pública, sendo responsáveis por mais de um milhão de óbitos/ano no mundo todo (ALMEIDA *et al.*, 2019). Acomete, principalmente, pacientes imunocomprometidos, transplantados, em uso de dispositivos invasivos, submetidos à terapia antimicrobiana prolongada e internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (AL-DORZI *et al.*, 2020; BASSETI *et al.*, 2019; TSAY *et al.*, 2020). A taxa de mortalidade em decorrência de Candidemia pode chegar a 70% (PAPPAS *et al.*, 2018), apesar dos avanços no diagnóstico e instituição de terapia medicamentosa adequada.

Assim, a realização de uma vigilância epidemiológica constante e a avaliação do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos dos isolados de *Candida* spp. torna-se fundamental para o controle de infecções e prevenção de surtos hospitalares, principalmente quando há o envolvimento de microorganismos que apresentam resistência a estas drogas (PFALLER *et al.*, 2019).

Candida albicans é a espécie mais frequentemente encontrada nos isolados clínicos de todo o mundo (POTE *et al.*, 2020). Entretanto, nos últimos anos, espécies de *Candida* não-*albicans* (CNA) têm sido responsáveis por um número cada vez maior de infecções invasivas, principalmente *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* complex e *C. krusei*; as quais em associação com *C. albicans*, perfazem mais de 90% dos isolados clínicos (PAPPAS *et al.*, 2018; DELAVY *et al.*, 2019). A ocorrência de Candidemia por espécies não-*albicans* chama atenção devido a sua maior gravidade e pelo fato de algumas espécies serem menos susceptíveis a ação dos antifúngicos, o que limita as opções terapêuticas, podendo impactar diretamente no aumento da mortalidade (PFALLER *et al.*, 2019).

Os *guidelines* para tratamento de Candidíase Invasiva preconizam as equinocandinas como drogas de primeira escolha (WANG *et al.*, 2019); porém, devido ao alto custo destes medicamentos, muitos países, a exemplo do Brasil, ainda utilizam os derivados azólicos como a primeira escolha (MARINS *et al.*, 2018). Segundo Colombo e colaboradores (2013), o Fluconazol pode ser considerado como terapia para complementar um período de tratamento de 14 dias (mínimo), após a identificação da espécie de *Candida* e na vigência de tratamento favorável com as equinocandinas. Importante ressaltar que o Fluconazol apresenta atividade contra a maioria dos isolados de *Candida* spp., exceto para *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. auris* (PFALLER *et al.*, 2019).

O diagnóstico laboratorial da Candidemia é feito, primordialmente, através da hemocultura e é mandatório que sejam realizados testes para a identificação das espécies e de susceptibilidade aos antifúngicos (PAPPAS *et al.*, 2018), com a finalidade de detectar isolados resistentes. Entretanto, é descrito que as metodologias utilizadas tradicionalmente para a identificação de leveduras, como os testes fenotípicos convencionais (provas bioquímicas, meios cromogênicos, entre outros), podem não apresentar a capacidade de identificar de forma correta as espécies crípticas de *Candida* spp. (FONTECHA *et al.*, 2019). Neste sentido, a introdução da espectrometria de massas por dessecção/ionização-tempo de voo (MALDI-TOF/MS) aprimorou a identificação de espécies fúngicas em laboratórios clínicos, melhorando consideravelmente

a precisão do diagnóstico, sendo este feito de forma rápida, correta e segura (CASSAGNE *et al.*, 2016).

Apesar do notório aumento de Candidemia em hospitais brasileiros, poucos são os relatos dos fatores associados com a mortalidade precoce e o impacto da terapia inapropriada no desfecho dessas infecções. Deste modo, este estudo tem como objetivo analisar a evolução clínica dos pacientes acometidos pela doença, avaliar e identificar os preditores de mortalidade em 30 dias após o diagnóstico da infecção e ainda comparar a identificação dos isolados de *Candida* spp., através das metodologias tradicionais e espectrometria de massas (MALDI-TOF/MS), além de verificar o perfil de susceptibilidade antifúngica destes isolados.

Material e Métodos

- *Unidade de estudo e pacientes*

Trata-se de uma coorte prospectiva, de dois anos, conduzida no Hospital de Clínicas de Uberlândia, da Universidade Federal de Uberlândia (HCU-UFU). O HCU é um hospital de alta complexidade, referência na região e possui cerca de 500 leitos. Todos os pacientes que apresentaram ao menos um episódio de Candidemia entre Julho de 2017 e Julho de 2019 foram incluídos no estudo. Pacientes com mais de um episódio da doença foram contabilizados apenas uma vez, sendo considerado apenas o primeiro caso da infecção.

- *Desenho do estudo e coleta de dados*

Esta coorte permitiu identificar os preditores de mortalidade em 30 dias após o diagnóstico da infecção por *Candida* spp. e o impacto da terapia inapropriada e diagnóstico incorreto no desfecho dos casos de Candidemia. As informações demográficas e clínicas (sexo, idade, setor de internação hospitalar, doença de base/comorbidades, dispositivos invasivos como cateter central, cateter vesical, ventilação mecânica, sonda em trato digestório, nutrição parenteral, uso crônico de medicamentos, procedimentos cirúrgicos, tratamento antimicrobiano, tratamento antifúngico, tempo de tratamento,

recorrência e recidiva) de cada paciente foram recuperadas dos prontuários hospitalares.

A terapia antifúngica foi considerada inadequada quando o paciente recebeu antifúngicos que não apresentavam atividade "in vitro"; quando o tratamento foi iniciado há mais de 48 horas após o diagnóstico da infecção, ou ainda quando o tratamento antifúngico foi inferior a 5 dias e quando o paciente não recebeu tratamento (TUMBARELLO *et al.*, 2007).

- Identificação das leveduras e teste de susceptibilidade antifúngica

Os isolados foram identificados através de três técnicas distintas: crescimento em ágar cromogênico CHROMagar™ Candida Medium (Becton Dickinson, Alemanha), provas bioquímicas automatizadas conduzidas no equipamento VITEK®-2 (bioMérieux, França) e espectrometria de massas MALDI-TOF/MS (Bruker Daltonick, Alemanha). O teste de susceptibilidade aos antifúngicos foi realizado utilizando os cartões AST-YS07/AST-YS08 do sistema automatizado VITEK®-2 (bioMérieux, França); foram testados anfotericina B, caspofungina, fluconazol, micafungina e voriconazol. Os critérios de interpretação das Concentrações Inibitórias Míminas para classificação dos isolados em susceptível, sensível dose dependente e resistente estavam de acordo com o documento M27-S4 do Clinical and Laboratory Standart Institute (CLSI, 2012).

- Análise Estatística

As variáveis quantitativas foram descritas em média e desvio padrão; já as qualitativas em frequência e porcentagem. Os fatores de risco foram avaliados pela regressão logística univariada, bem como pela regressão logística múltipla seguida da seleção de variáveis pelo método Stepwise (HOSMER; LEMESHOW, 2004).

A concordância entre as técnicas utilizadas para identificação dos isolados foi feita utilizando o teste Kappa (ROSNER, 1995) sendo considerados os valores descritos por Landis e Koch (1977), a saber: correlação insignificante ($K < 0$); correlação fraca (K entre 0 e 0,2); correlação razoável (K

entre 0,21 e 0,4); correlação moderada (K entre 0,41 e 0,6); correlação forte/substancial (K entre 0,61 e 0,8) e correlação quase perfeita (K entre 0,81 e 1,0).

Já as curvas de sobrevivência foram construídas usando o método de Kaplan-Meier. Todos os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Estas análises foram realizadas utilizando o software SPSS v.20.

- Comitê de Ética

Este estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (CEP-UFU), com o número de CAAE: 65341817.0.0000.5152, parecer CEP-UFU: 2.826.857.

Resultados

Durante o período de estudo, foram avaliados 113 pacientes com diagnóstico de Candidemia; destes, quatro pacientes (3,5%) apresentaram mais de um episódio de infecção de corrente sanguínea por *Candida* spp., totalizando 126 isolados.

A maioria dos pacientes foi do sexo masculino (65%; 74/113), sendo os mais acometidos aqueles com idade superior a 60 anos (45%; 41/113). Os setores hospitalares com o maior número de infecções por *Candida* spp. foram as UTI (51%; 57/113), seguidos pelas unidades clínicas (25%; 28/113) e cirúrgicas (24%; 27/113). Além disto, o tempo médio de internação nas UTIs foi de 47 dias (variação de 5 a 127 dias).

Comorbidades como cirurgia abdominal prévia recente (38%), Neoplasia (27%) e Hipertensão Arterial Sistêmica (20%) e o uso de dispositivos invasivos como CVC (90%), sonda em aparelho digestório (73%), cateter vesical (64%), ventilação mecânica (57%), nutrição parenteral prolongada (55%), além do uso prévio de antimicrobianos (96%) e cirurgia do trato digestivo (44%) foram comuns nos pacientes incluídos no estudo.

O tratamento antifúngico foi realizado em 85% (96/113) dos pacientes, preferencialmente com Fluconazol (800 mg em dose de ataque; após 400 mg/dia) em monoterapia (66%; 63/96). As equinocandinas foram utilizadas para o tratamento de 37% dos pacientes, 22% destes em monoterapia e 16% em associação com o Fluconazol; o tempo médio de uso dos antifúngicos foi 12 dias. Além disto, 15% (17/113) dos pacientes não receberam nenhum tipo de tratamento, uma vez que, a maioria, evoluiu para o óbito antes do diagnóstico laboratorial da infecção.

A taxa de mortalidade em 30 dias por Candidemia foi de 56%; e a idade revelou ser um fator de risco independente ($p=0,0195$). Já a análise univariada dos fatores de risco associados a esta evidenciou 3 variáveis significativas: a idade maior que 60 anos ($p=0,0355$), a internação em UTI ($p=0,0493$) e a presença do cateter vesical ($p=0,0078$). As principais características clínicas e epidemiológicas dos pacientes com Candidemia e as análises de fatores de risco associados à mortalidade em 30 dias estão resumidos na **tabela 1**.

Tabela 1: Fatores de risco associados à mortalidade em 30 dias de pacientes com infecção de corrente sanguínea por *Candida* spp.

Características	Total (n= 113) n; (%)	Desfecho		Análise Estatística			
		ALTA (n= 50) n; (%)	ÓBITO (n= 63) n; (%)	Univariada		Multivariada	
				OR (IC 95%)	Valor de <i>p</i>	OR (IC 95%)	Valor de <i>p</i>
Sexo	39; (35)	18; (36)	21; (33,3)	0,89 (0,41-1,94)	0,7672		
Idade: média (desvio padrão)	50,7	42,82 (24,58)	57,10 (21,62)	1,03 (1,01-1,05)	0,0025*	1,03 (1,0-1,10)	0,0195*
0-18 anos	16 (14)	10 (20)	6 (9,5)	0,42 (0,14-1,25)	0,1198		
19-59 anos	46 (41)	23 (46)	23 (36,5)	0,68 (0,32-1,44)	0,3086		
>60 anos	51 (45)	17 (34)	34 (54)	2,28 (1,06-4,90)	0,0355*		
Tempo de internação: média (desvio padrão)	51,9	75,16 (37,36)	32,95 (26,98)	0,96 (0,94-0,98)	0,0000		
Internação em UTI	57 (24)	20 (40)	37 (58,7)	2,13 (1,02-4,54)	0,0493*		
Tempo de internação em UTI (média de dias)	47,15	31,58 (44,51)	17,6 (21,31)	0,99 (0,97-0,99)	0,0352		
Comorbidades							
HIV/AIDS	1 (0,8)	1 (2,4)	0	1,00 (-)	0,9913		
Insuficiência Renal Crônica (IRC)	3 (2,6)	1 (2,4)	2 (3,4)	1,40 (0,12-16,7)	0,7849		
Alteração trato digestório (não cirúrgica)	4 (3,5)	2 (4,9)	2 (3,4)	0,68 (0,09-5,07)	0,7102		
Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS)	23 (20)	8 (19,5)	15 (25,4)	1,41 (0,53-3,51)	0,4907		
Diabetes Mellitus (DM)	11 (10)	4 (9,8)	7 (11,9)	1,25 (0,34-4,56)	0,7407		
Cardiopatía	12 (11)	4 (9,8)	8 (13,6)	1,45 (0,41-5,18)	0,5665		
Neoplasia	31 (27)	11 (26,8)	20 (33,9)	1,40 (0,58-3,36)	0,4530		
Cirurgia abdominal prévia	43 (38)	14 (34,1)	29 (49,2)	1,86 (8,82-4,25)	0,1379		
Medicação uso crônico							
Imunossupressor	6 (5)	3 (13,6)	3 (7,1)	0,49 (0,09-2,64)	0,4047		
Quimioterápico	6 (5)	2 (9,1)	4 (9,5)	1,05 (0,18-6,25)	0,9550		

Características	Total (n= 113) n; (%)	Desfecho		Análise Estatística			
		ALTA (n= 50) n; (%)	ÓBITO (n= 63) n; (%)	Univariada		Multivariada	
				OR (IC 95%)	Valor de <i>p</i>	OR (IC 95%)	Valor de <i>p</i>
Dispositivos Invasivos							
Cateter venoso Central	102 (90)	46 (92)	56 (88,9)	0,70 (0,19-2,52)	0,5810		
Cateter vesical	72 (64)	25 (50)	47 (74,6)	2,94 (1,33-6,49)	0,0078*		
Ventilação Mecânica (IOT/TT)	65 (57)	25 (50)	40 (63,4)	1,39 (0,57-3,39)	0,4741		
Sonda Trato Digestório (NG/NE)	83 (73)	35 (70)	48 (76,1)	0,59 (0,14-2,43)	0,4635		
Ostomia em Trato Digestório	10 (9)	3 (6)	7 (11,1)	1,70 (0,41-7,05)	0,4635		
Nutrição parenteral	62 (55)	25 (50)	37 (58,7)	1,42 (0,67-3,31)	0,3550		
Procedimentos Cirúrgicos durante a internação							
Cirurgia Trato Digestório	51 (44)	19 (38)	31 (49,2)	1,58 (0,74-3,36)	0,2347		
Cirurgia Trato Urinário	11 (10)	5 (10)	6 (9,5)	0,95 (0,27-3,31)	0,9324		
Tratamento antifúngico	96 (85)	49 (98)	47 (74,6)	0,06 (0,01-0,47)	0,0074		
Tempo de tratamento-média (desvio padrão)	11,8 (5,97)	15 (4,44)	6,11 (6,27)	0,75 (0,67-0,83)	0,0000		
Tratamento \geq 14 dias	54 (56)	45 (90)	9 (14,2)	0,02 (0,01-0,08)	0,0000	0,01 (0,0-0,06)	0,0000
Tempo de início \leq 48 horas após o diagnóstico da infecção	92 (96)	47 (94)	45 (71,4)	1,91 (0,17-21,8)	0,6010		
Antimicrobianos prévios à infecção							
Antibiótico	109 (96)	47 (94)	62 (98,4)	3,96 (0,4-39,26)	0,2400		
Tempo de uso de antibiótico- m (desvio padrão)	13,31 (8,29)	13,83 (8,68)	12,92 (7,94)	0,99 (0,94-1,03)	0,5634		
Uso de antibiótico \geq 14 dias	52 (48)	24 (48)	28 (44,4)	0,85 (0,40-1,81)	0,6707		
Antifúngico	14 (12)	7 (14)	7 (11,1)	0,77 (0,25-2,35)	0,6440		
Recorrência/Recidiva		2 (4)	2 (3,2)	0,80 (0,11-5,89)	0,8266		

As estimativas de sobrevida cumulativas de Kaplan-Meier (**Figura 1**) evidenciaram que os pacientes que não receberam tratamento antifúngico apresentaram uma menor probabilidade de sobrevida quando comparados com aqueles que o receberam ($p < 0,0001$). Além disso, os pacientes que receberam a terapia em até 48 horas após o diagnóstico da Candidemia apresentaram uma maior probabilidade de sobrevida ($p < 0,0001$).

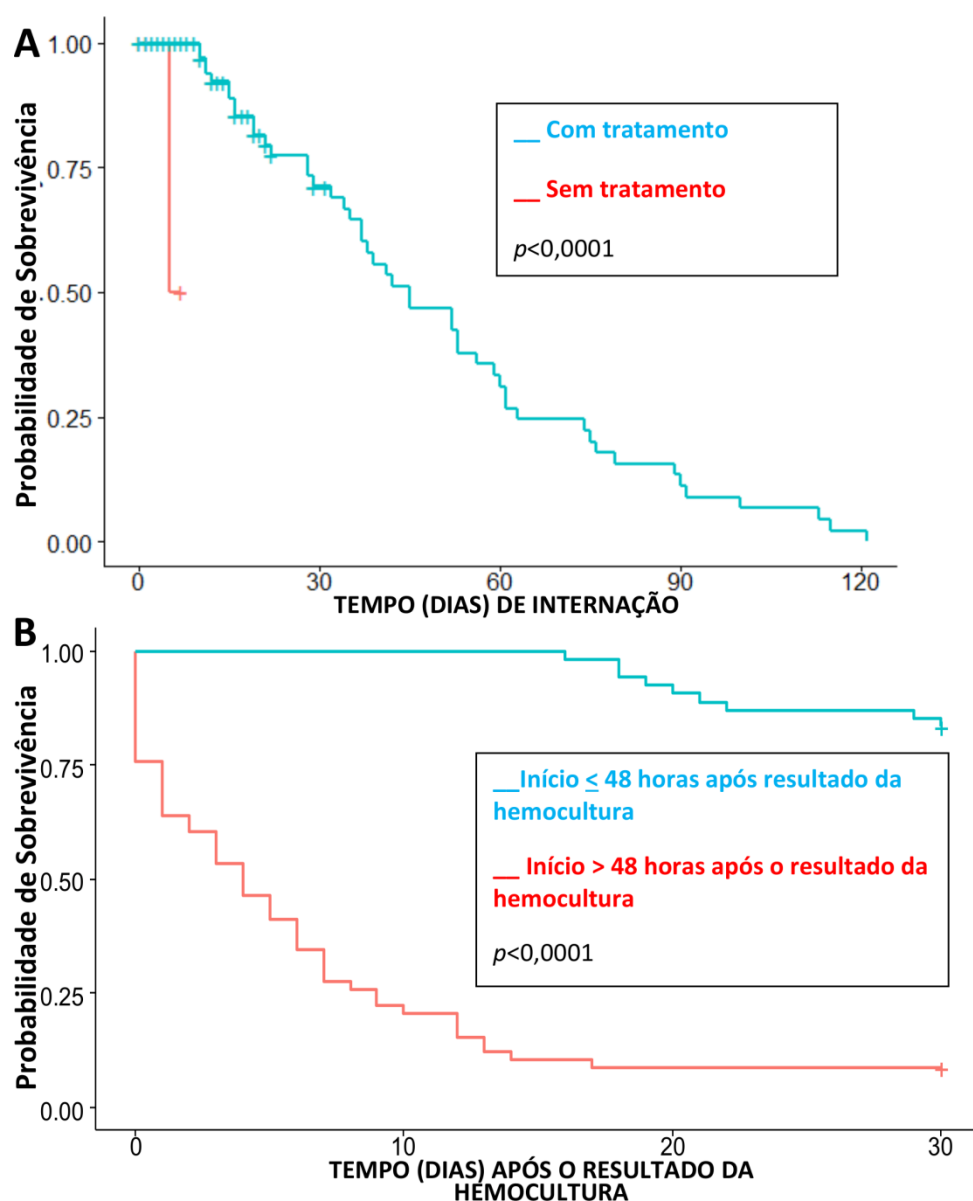


Figura 1: Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier: **A-** dos grupos com e sem terapia até o evento óbito, considerando o tempo de internação. **B-** dos grupos com início do tratamento em até 48 horas após o diagnóstico da infecção, considerando a mortalidade em 30 dias.

Dos 126 isolados de *Candida* spp., 41 foram *C. albicans*; 27 *C. tropicalis*; 18 *C. glabrata*; 17 *C. parapsilosis*; 10 *C. krusei*; 3 *C. kefyr*; 3 *C. lusitanae*; 2 *C. pelliculosa*; 2 *C. guilliermondii*; 2 *C. orthopsilosis* e 1 *C. dubliniensis*. A concordância entre as 3 metodologias utilizadas para a identificação dos isolados foi variável, sendo a melhor correlação entre VITEK®-2 e MALDI-TOF/MS, considerada quase perfeita ($K=0,833$) e significativa ($p<0,0001$). Já as concordâncias entre Chromagar™ e MALDI-TOF/MS e entre Chromagar™ e VITEK®-2 foram consideradas substanciais ($K=0,67$ e $K=0,68$, respectivamente) e significativas ($p<0,0001$). Três isolados previamente identificados com *C. famata* pelo VITEK®-2 foram reclassificados pelo MALDI-TOF/MS como *C. albicans* (2 isolados) e *C. parapsilosis* (1 isolado). Além disto, a identificação dos dois isolados de *C. orthopsilosis* somente foi possível através do MALDI-TOF/MS.

Foi observado que a maioria dos isolados apresentou susceptibilidade a todos os antifúngicos testados. A resistência ao Fluconazol foi observada em 12 isolados (9,5%); entretanto, 10 destes eram *C. krusei* (7,9%). O perfil de susceptibilidade antifúngica dos isolados de *Candida* spp. está demonstrado na

Tabela 2.

Tabela 2: Perfil de susceptibilidade antifúngica e faixa de variação dos valores da MIC de isolados de *Candida* spp., obtidos de pacientes com Candidemia

	<i>C. albicans</i> (41)	<i>C. tropicalis</i> (27)	<i>C. glabrata</i> (18)	<i>C. parapsilosis</i> (17)	<i>C. krusei</i> (10)	<i>Candida</i> spp (13)
Susceptibilidade antifúngica, n (%)						
Fluconazol	41 (100%)	27 (100%)	18 (100%)	16 (94%)	0 (0%)	12 (92%)**
Voriconazol	41 (100%)	27 (100%)	17 (94%)	17 (100%)	10 (100%)	12 (92%)**
Caspofungina	41 (100%)	27 (100%)	17 (94%)	17 (100%)	10 (100%)	13 (100%)
Micafungina	41 (100%)	27 (100%)	17 (94%)	17 (100%)	10 (100%)	13 (100%)
Anfotericina B	41 (100%)	27 (100%)	17 (94%)	17 (100%)	7 (70%)	13 (100%)
MIC, média (faixa de variação)						
Fluconazol	0,8 (0,5-1)	0,9 (0,5-1)	2,9 (1-4)	4,9 (0,5-64)	12 (4 -16)	2,9 (0,5-32)
Voriconazol	0,12 (0,12)	0,12 (0,12)	0,4 (0,25-4)	0,17 (0,12-1)	0,13 (0,12-0,25)	0,4 (0,12-4)
Caspofungina	0,2 (0,12 a 0,25)	0,19 (0,12-0,25)	0,7 (0,12-8)	0,5 (0,25 a 1)	0,7 (0,25-2)	0,28 (0,12-0,5)
Micafungina	0,08 (0,06 a 0,5)	0,06 (0,06)	0,5 (0,06- 8)	0,6 (0,25 a 2)	0,4 (0,12-2)	0,23 (0,06-0,5)
Anfotericina B	0,6 (0,25 a 1)	0,4 (0,25-0,5)	1,3 (0,25-16)	0,4 (0,25-1)	1 (0,5-2)	0,41 (0,25-1)

MIC: Concentração inibitória mínima; *Candida* spp. (3 *C. kefyr*; 3 *C. lusitanae*; 2 *C. pelliculosa*; 2 *C. guilliermondii*; 2 *C. orthopsilosis* e 1 *C. dubliniensis*); ***C. guilliermondii*

Foi ainda estudada a distribuição das espécies de *Candida* e o desfecho da doença; dentre os pacientes que evoluíram para o óbito, *C. albicans* foi a espécie predominante (61%). Foi verificado ainda que aqueles que tiveram infecção por *C. krusei* evoluíram mais rapidamente para o óbito do que os demais pacientes; no entanto, não houve diferença estatística na sobrevivência dos pacientes com relação às espécies de *Candida*. A **Figura 2** evidencia a distribuição dos isolados em relação aos grupos óbito/alta (**A**), bem como a curva de sobrevivência de Kaplan-Meier entre estes grupos (**B**).

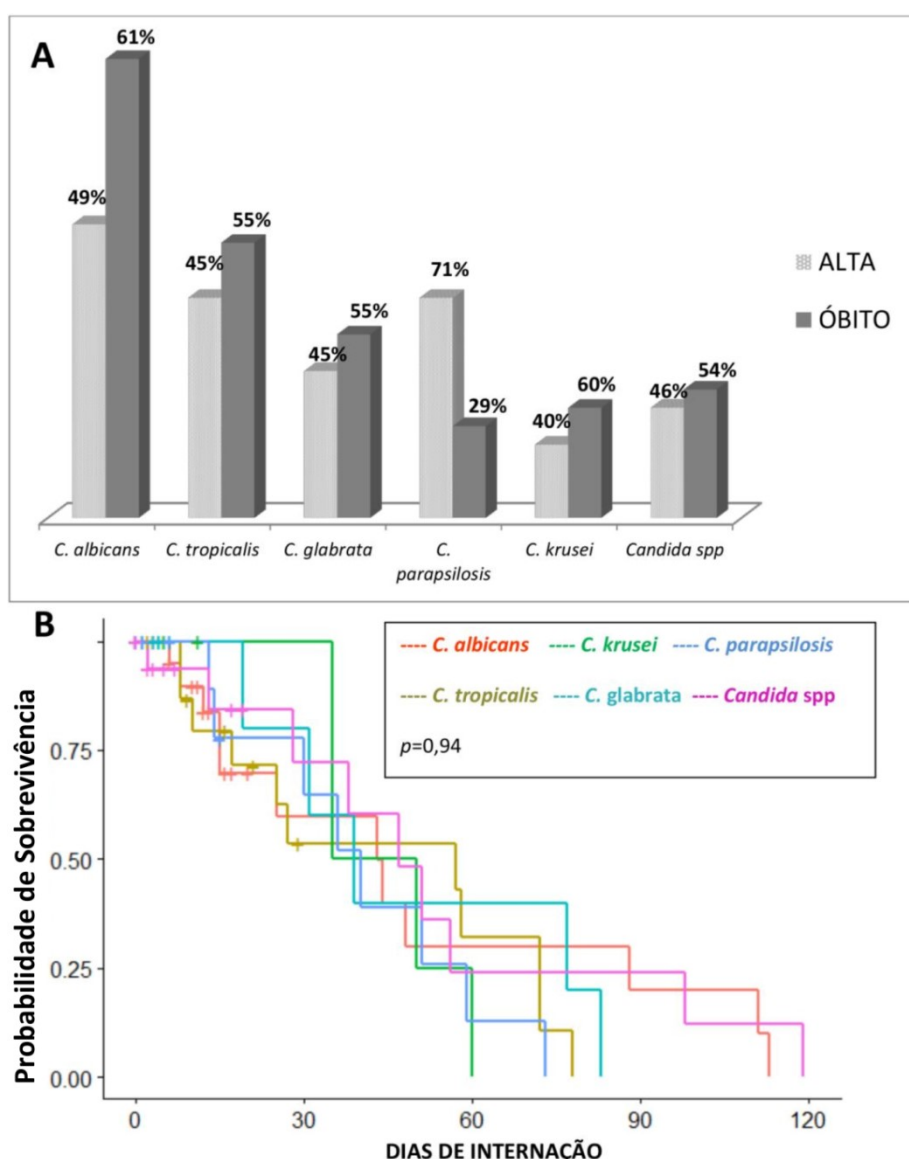


Figura 2: Distribuição dos isolados de *Candida* spp. em relação ao óbito (**A**) e curva de Kaplan-Meier em relação aos grupos óbito/alta, considerando o tempo de internação (**B**). **Candida* spp.: *C. kefyr*; *C. orthopsilosis*; *C. lusitanae*; *C. guilliermondii*; *C. pelliculosa*; *C. dubliniensis*

Discussão

Candidemia é descrita como a quarta causa de infecção nosocomial da corrente sanguínea (ISMAIL *et al.*, 2020), geralmente associada a maior tempo de internação, altos custos médicos e com mortalidade acima de 30% dos casos (ZHANG *et al.*, 2019). No período deste estudo, *Candida* spp. foram responsáveis por 4,2% dos casos de infecção de corrente sanguínea de pacientes internados no HCU-UFU.

A maioria dos pacientes acometidos pela doença foi do sexo masculino e faixa etária acima de 60 anos; dados concordantes com a literatura (ARENDUP *et al.*, 2019; BASSETTI *et al.*, 2019; MEDEIROS *et al.*, 2019; TODA *et al.*, 2019; POISSY *et al.*, 2020). Embora a diferença de incidência de Candidemia por sexo ainda não tenha causa conhecida (TODA *et al.*, 2019), Arroyo-Mendoza e colaboradores (2020), sugerem que a testosterona pode reduzir a resistência à infecção sistêmica à *C. albicans*, fato que pode explicar a maior incidência da doença nos pacientes do sexo masculino.

Neste estudo, o maior número de casos aconteceu nas UTI, possivelmente, devido à quantidade de fatores de risco associados aos cuidados dos pacientes nestas unidades (PAPPAS *et al.*, 2018). A quebra das defesas naturais do hospedeiro (manipulação cirúrgica do trato digestório, múltiplos dispositivos invasivos, uso de drogas imunossupressoras, nutrição parenteral prolongada, entre outros) proporciona a translocação do fungo da pele ou do intestino para a corrente sanguínea (POISSY *et al.*, 2020) e, havendo o comprometimento da resposta imune, a levedura se prolifera, levando ao quadro de Candidemia (PAPPAS *et al.*, 2018; ZHAI *et al.*, 2020).

Os *guidelines* para o manejo terapêutico da Candidemia orientam que o tratamento seja feito, inicialmente, com drogas da classe das equinocandinas (BIENVENU *et al.*, 2019; ROILIDES *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019; ROILIDES *et al.*, 2020; TASHIRO *et al.*, 2020). No presente estudo, o tratamento antifúngico foi realizado em 85% dos pacientes, na grande maioria dos casos, com o Fluconazol, principalmente em monoterapia; a maioria dos pacientes que não recebeu o tratamento evoluiu para o óbito antes do diagnóstico

laboratorial da infecção. A administração das equinocandinas como primeira escolha terapêutica foi feita apenas em 20% dos pacientes, provavelmente pelo alto custo destas quando comparado ao custo dos derivados azólicos (MARINS *et al.*, 2018; CHOI *et al.*, 2019). Segundo Colombo e colaboradores (2013), o Fluconazol pode ser uma terapia alternativa para pacientes clinicamente estáveis com quadros leves, que não foram expostos a regimes de profilaxia com azólicos e que são admitidos em serviços médicos com baixa incidência de infecções causadas por *C. glabrata* e *C. krusei*. Entretanto, os serviços médicos que apresentam taxas de incidência superiores a 10% de isolados resistentes ao Fluconazol não devem usar este medicamento antes que a espécie de *Candida* seja identificada. Importante destacar que, neste estudo, o início precoce da terapia antifúngica e o tempo de tratamento adequado foram fatores protetores na sobrevivência dos pacientes; PAPPAS e colaboradores (2018) demonstraram uma maior taxa de mortalidade quando o tratamento não é feito de forma apropriada.

A mortalidade por Candidemia foi de 56%, sendo a idade acima de 60 anos, presença de cateter vesical e a internação em UTI os fatores de risco associados a um pior desfecho clínico em 30 dias após o diagnóstico do processo infeccioso. Estudos mostram que esta infecção pode apresentar taxas de mortalidade bastante variada, de 12% a 70% (MEDEIROS *et al.*, 2018; PAPPAS *et al.*, 2018; BASSETTI *et al.*, 2019; ZHENG *et al.*, 2019; TSAY *et al.*, 2020), o que reflete a severidade dos casos desta doença. Estudos realizados no Brasil também apontam altas taxas de mortalidade por Candidemia; segundo Khoury e colaboradores (2016), esta foi em torno de 43%. De acordo com Marins e colaboradores (2018), 51,3% dos pacientes evoluíram para o óbito devido à doença; já Doi e colaboradores (2016) e Alves e colaboradores (2020) relataram uma taxa de mortalidade de 72,2% e 54,6%, respectivamente.

Candida albicans foi isolada em 30% dos casos; 70% dos episódios de Candidemia foram devido a espécies não-*albicans*, principalmente devido a *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. kusei*. Estes dados são concordantes tanto com a literatura internacional (AL-DORZI *et al.*, 2020;

BASSETI *et al.*, 2019; PFALLER *et al.*, 2019; POISSY *et al.*, 2020; TSAY *et al.*; 2020), como trabalhos brasileiros (DOI *et al.*, 2016; KHOURI *et al.*, 2016; MARINS *et al.*, 2018; MEDEIROS *et al.*, 2019) demonstrando perfil de distribuição semelhante para as cinco espécies mais comuns de *Candida* spp. As diferenças regionais bem como a complexidade de cada serviço hospitalar podem influenciar a predominância das espécies de *Candida* (MENEZES *et al.*, 2015). Estudos apontam que *C. albicans* seja mais patogênica que *Candida* não-*albicans* (HIRAYAMA *et al.*, 2020; KADOSH; MUNDODI, 2020); entretanto, embora o maior número de óbitos tenha sido causado por esta espécie, não foi evidenciada diferença estatística em relação à mortalidade e as espécies de *Candida* estudadas. Importante destacar que os pacientes que tiveram infecção por *C. krusei* evoluíram para o óbito mais precocemente do que aqueles que tiveram infecção por outras espécies; segundo Kronen e colaboradores (2018), pacientes com infecção por esta espécie de *Candida* apresentam uma taxa de mortalidade mais elevada quando comparados aos pacientes com infecção por outras *Candida* não-*albicans*, embora isto possa ser um maior reflexo da gravidade da doença de base destes pacientes do que devido à virulência micro-organismo. Isto pode ser corroborado ainda por estudos de Candidíase Sistêmica em murinos, que evidenciaram que *C. krusei* exibe menor virulência que *C. albicans* (GÓMEZ-GAVIRIA M.; MORA-MONTES, 2020).

Candida spp. são identificadas rotineiramente por testes fenotípicos tradicionais que podem não identificar de forma correta as suas muitas espécies (AMBARAGASSI *et al.*, 2019). MALDI-TOF/MS apresenta acurácia de 100% para a identificação de fungos leveduriformes e pode ser considerado um novo padrão-ouro, rápido e seguro, para a identificação de espécies de *Candida* (XIE *et al.*, 2019). No presente estudo, foi evidenciada correlação quase perfeita entre MALDI-TOF/MS e VITEK[®]-2, com discrepância, principalmente, na identificação dos isolados pertencentes ao complexo “*psilosis*” e em isolados classificados como *C. famata* pelo VITEK[®]-2. As provas bioquímicas não apresentam a capacidade de distinguir as espécies crípticas do complexo “*psilosis*”, portanto estas leveduras são identificadas de forma correta somente por técnicas moleculares e proteômicas (De CAROLIS *et al.*, 2014). Por conseguinte, na presença de inconsistência durante a identificação

através de testes fenotípicos ou na presença de espécies incomuns como *C. famata*, faz-se necessária a confirmação por métodos mais sensíveis e específicos, como MALDI-TOF/MS (KIM *et al.*, 2014). Importante ressaltar que, embora verificada a discrepância na identificação dos 3 isolados de *C. famata*, estes pacientes não tiveram um pior desfecho clínico.

A microdiluição em caldo é o padrão de referência para os testes de susceptibilidade antifúngica (CLSI, 2012); entretanto esta metodologia não apresenta aplicabilidade rotineira na maioria dos laboratórios de Microbiologia Clínica, por ser extremamente laboriosa (PFALLER *et al.*, 2013). Sendo assim, testes comerciais, como o sistema semiautomático VITEK®-2 (bioMérieux, França), podem ser utilizados para prever a susceptibilidade antifúngica de *Candida* spp. (PFALLER *et al.*, 2013; KHATURIA *et al.*, 2015). Neste estudo, excluindo os casos de resistência intrínseca de *C. krusei* ao Fluconazol, foi possível observar apenas uma pequena parcela de isolados (5%) resistente aos antifúngicos testados, principalmente *C. krusei* e *C. glabrata*, dados concordantes com estudos de vigilância internacional (PFALLER *et al.*, 2019). A resistência aos antifúngicos disponíveis para o tratamento da Candidemia ainda pode ser considerada um evento incomum para *Candida* spp.; contudo, micro-organismos resistentes têm sido relatados (DA MATTA *et al.*, 2017; DELAVY *et al.*, 2019; HART *et al.*, 2019; AL-DORZI *et al.*, 2020). Neste contexto, a resistência antifúngica deve ser monitorada, uma vez que infecções causadas por micro-organismos resistentes podem levar a uma maior mortalidade por Candidemia (TSAY *et al.*, 2017).

Sabendo que a infecção de corrente sanguínea por *Candida* spp. é comum em hospitais de nível terciário, estudos clínico-epidemiológicos com a identificação dos principais fatores de risco associados ao desenvolvimento desta doença podem proporcionar a adoção de medidas preventivas, especialmente em relação aos procedimentos e dispositivos invasivos, contribuindo com a diminuição da incidência. Além disto, a correta especiação destas leveduras, a introdução precoce do tratamento antifúngico e a monitorização da resistência antifúngica devem ser estimulados, com o intuito de diminuir a morbimortalidade da Candidemia.

Conclusão

Este estudo reafirma a gravidade de Candidemia, que acometeu primordialmente pacientes do sexo masculino, idosos, internados em Unidade de Terapia Intensiva e submetidos a procedimentos invasivos e apresentou uma taxa de mortalidade elevada. *C. albicans* foi a espécie isolada com mais frequência e o MALDI-TOF/MS foi capaz de identificar espécies crípticas e não usuais de *Candida* spp., o que não foi possível com a utilização das outras metodologias empregadas na identificação destas leveduras. A maioria dos isolados apresentou susceptibilidade aos antifúngicos testados, sendo encontrados poucos casos de resistência. Sabe-se que Candidemia pode alcançar taxas de mortalidade elevadas; sendo assim, o conhecimento de fatores de risco associados, a identificação correta e rápida das espécies envolvidas para a instituição da terapia medicamentosa apropriada e em tempo hábil são fundamentais para o manejo correto da doença.

Agradecimentos

Agradecemos a todos os que participaram deste trabalho, em especial ao corpo técnico do setor de Microbiologia dos Laboratórios de Análises Clínicas do HCU-UFU, da Escola Técnica de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia (ESTES-UFU) e do Check-Up Medicina Laboratorial. Esta pesquisa não seria possível sem sua valiosa ajuda. Este estudo foi parcialmente financiado pelo Código de Financiamento-001 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Contribuição dos autores

Todos os autores contribuíram de forma igualitária na condução deste estudo.

Referências

- AL-DORZI, H. M. et al. Invasive Candidiasis in Critically Ill Patients: A Prospective Cohort Study in Two Tertiary Care Centers. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 35, n. 6, p. 542-553, 2020. <https://doi.org/10.1177/0885066618767835>
- ALMEIDA, F.; RODRIGUES, M.L.; COELHO, C. The still underestimated problem of fungal diseases worldwide. **Front Microbiol**, 10:214, Feb., 2019. doi: [10.3389/fmicb.2019.00214](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00214)
- ALVES, P. G. V. et al. Risk factors associated with mortality among patients who had candidemia in a university hospital. **Rev Soc Bra Med Trop.**, v. 53, e20190206: 2020. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0206-2019>.
- AMBARAGHASSI, G. et al. Identification of *Candida auris* by Use of the Updated Vitek 2 Yeast Identification System, Version 8.01: a Multilaboratory Evaluation Study. **J Clin Microbiol**, v. 57, n. 11, e00884-19, Oct., 2019. <https://doi.org/10.1128/jcm.00884-19>
- ARENDUP, M. C. et al. Diagnostic Performance of T2Candida Among ICU Patients With Risk Factors for Invasive Candidiasis. **Open Forum Infect Dis.**, v. 6, n. 5, ofz 136, Mar., 2019. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz136>
- ARROYO-MENDONZA, M. Effect of testosterone and estrogen supplementation on the resistance to systemic *Candida albicans* infection in mice. **Heliyon**, v. 6, n. 7, e04437. Jul., 2020. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04437>
- BASSETI, M. et al. Incidence and outcome of invasive candidiasis in intensive care units (ICUs) in Europe: results of the EUCANDICU project. **Crit care**, v. 23, n. 219, Jun., 2019. <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2497-3>
- BIENVENU, A. L. et al. Evaluation of first-line therapies for the treatment of candidemia in ICU patients: A propensity score analysis. **Int J Infect Dis.**, v. 93, p. 16-21, Apr., 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.01.037>
- CASSAGNE, C. et al. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. **Mycoses**, v. 59, n.11, p. 678-690, Nov., 2016. doi: 10.1111/myc.12506. <https://doi.org/10.1111/myc.12506>
- CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. M27-S4. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: 4th Informational Supplement. **Clinical and Laboratory Standard Institute**, Wayne, Pennsylvania, 2012. ISBN 1-56238-827-4
- CHOI, H. et al. Changes in the utilization patterns of antifungal agents, medical cost and clinical outcomes of candidemia from the health-care benefit expansion to include newer antifungal agents. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 83, pag. 49-55, Jun., 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.03.039>

COLOMBO, A. L. et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Braz J Infect Dis.**, v.17, n. 3, Jun., 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2013.02.001>

DA MATTA, D.A; SOUZA A.C.R. COLOMBO, A.L. Revisiting Species Distribution and Antifungal Susceptibility of *Candida* Bloodstream Isolates from Latin American Medical Centers. **J Fungi (Basel)**, v. 3, n. 2, 2017. <https://doi.org/10.3390/jof3020024>

DOI, M. A. et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PLoS One**, 2016; 11(1): e0146909. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146909>

De CAROLIS, E. et al. Identification and typing of the *Candida parapsilosis* complex: MALDI-TOF MS vs. AFLP. **Med Mycol**, v. 52, n. 2, p. 123-130, Feb., 2014. <https://doi.org/10.1093/mmy/myt009>

DELAVY, M. et al. Investigating Antifungal Susceptibility in *Candida* Species With MALDI-TOF MS-Based Assays. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 19; n. 9; Feb., 2019. <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffcimb.2019.00019>

FONTECHA, G. et al. Identification of Cryptic Species of Four *Candida* Complexes in a Culture Collection. **J Fungi (Basel)**, v. 5, n. 4., p. 117. Dec., 2019. <https://dx.doi.org/10.3390%2Fjof5040117>

GÓMEZ-GAVIRIA M.; MORA-MONTES, H.M. Current Aspects in the Biology, Pathogeny, and Treatment of *Candida krusei*, a Neglected Fungal Pathogen. **Infect Drug Resist.**, v. 10, n. 13., p. 1673-1689, Jun. 2020. <https://dx.doi.org/10.2147%2FIDR.S247944>

HART, E. et al. A systematic review of the impact of antifungal stewardship interventions in the United States. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.**, v.18, n. 24, Aug., 2019. <https://doi.org/10.1186/s12941-019-0323-z>

HIRAYAMA, T. et al. Virulence assessment of six major pathogenic *Candida* species in the mouse model of invasive candidiasis caused by fungal translocation. **Sci Rep.**, v. 10, n. 1, p. 3814, Mar., 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60792-y>

HOSMER, D. W.; LEMESHOW, S. Applied Logistic Regression, Second Edition, New York: John Wiley & Sons. 2004, 392p. ISBN 0-471-35632-8.

ISMAIL, W. N. A. W. The Economic Burden of Candidemia and Invasive Candidiasis: A Systematic Review. **Value in Health Regional Issues**, v. 21, p. 53-58, May, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.vhri.2019.07.002>

KADOSH, D.; MUNDODI, V. A Re-Evaluation of the Relationship between Morphology and Pathogenicity in *Candida* Species. **J Fungi (Basel)**, v. 6, n. 1, p. 13. Jan., 2020, <https://doi.org/10.3390/jof6010013>

KHATURIA, S. et al. Multidrug-Resistant *Candida auris* Misidentified as *Candida haemulonii*: Characterization by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and DNA Sequencing and Its Antifungal Susceptibility Profile Variability by Vitek 2, CLSI Broth Microdilution, and Etest Method. **J Clin Microbiol**, v. 53, n. 6, p. 1823-1830, Jun., 2015. <https://doi.org/10.1128/jcm.00367-15>

KHOURI, S. et al. Evaluation of infections by *Candida* at a university hospital of Vale do Paraíba region, São Paulo State, Brazil: species distribution, colonization, risk factors and antifungal susceptibility. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 7, n. 2, p. 51-57, 2016. <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232016000200006>.

KIM, S. H et al. Misidentification of *Candida guilliermondii* as *C. famata* among strains isolated from blood cultures by the VITEK 2 system. **Biomed Res Int.**, 2014:250408, May, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/250408>

KRONEN, R. et al. Creation and Assessment of a Clinical Predictive Calculator and Mortality Associated With *Candida krusei* Bloodstream Infections. **Open Forum Infectious Diseases** v. 5, n. 2, Feb. 2018. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx253>

LANDIS, J. R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, n. 33, v. 8, p. 159-174, Mar. 1977 <https://doi.org/10.2307/2529310>

MARINS, T. A. et al. Evaluation of *Candida* bloodstream infection and antifungal utilization in a tertiary care hospital. **BMC Infectious Diseases**, 18:187, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3094-9>

MEDEIROS, M. A. P. et al. Epidemiology and prognostic factors of nosocomial candidemia in Northeast Brazil: A six-year retrospective study. **PLOS ONE**, Aug. 2019 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221033>

MENEZES, R. P. et al. Frequency of *Candida* species in a tertiary care Hospital in Triangulo Mineiro, Minas Gerais state, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 57, n. 3, p. 185-191, May-Jun., 2015. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000300001>

PAPPAS, P.G. et al. Invasive candidiasis. **Nat Rev Dis Primers**, v. 11; n.4; May, 2018. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>

PFALLER, M. A. et al. Comparison of the Vitek 2 yeast susceptibility system with CLSI microdilution for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole against *Candida* spp., using new clinical breakpoints and

epidemiological cutoff values. **Micology**, v. 77, n.1, p. 37-40, Set., 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.05.019>

PFALLER, M. A. et al. Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* Species From 1997–2016. **OFID**, n. 6, p.79-94, (Suppl 1), 2019. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy358>

POTE, T. S., et al. Distribution of Pathogenic Yeasts in Different Clinical Samples: Their Identification, Antifungal Susceptibility Pattern, and Cell Invasion Assays. **Infect Drug Resist.**, v. 13, p. 1133-1145, Apr., 2020.
<https://doi.org/10.2147/idr.s238002>

POISSY, J. et al. Risk factors for candidemia: a prospective matched case-control study. **Critical Care**, v. 109, n. 24, p. 2-11, 2020.
<https://doi.org/10.1186/s13054-020-2766-1>

ROILIDES, E. et al. A Prospective, Open-label Study to assess the safety, tolerability and efficacy of anidulafungin in the treatment of invasive candidiasis in children 2 to <18 years of age. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 38, n. 3, p. 275-279; Mar., 2019. <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000002237>

ROILIDES, E. et al. Safety, Efficacy and Pharmacokinetics of Anidulafungin in Patients 1 Month to <2 Years of Age With Invasive Candidiasis, Including Candidemia. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 39, n. 4, p. 305-309; Apr., 2020.
<https://dx.doi.org/10.1097%2FINF.0000000000002568>

ROSNER, B. Fundamentals of biostatistics. 4 ed. Belmont: Duxbury Press; 1995. p. 426. ISBN-13: 978-0538733496

TASHIRO, S. et al. Echinocandins versus non-echinocandins for the treatment of invasive candidiasis: A meta-analysis of randomized controlled trials. **J Inf Chemot.**, v. 26, n. 1, p. 1164-1167, Nov., 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.jiac.2020.06.008>

TODA, M. et al. Population-based active surveillance for culture-confirmed candidemia-four sites, United States, 2012–2016. **MMWR Surveill Summ.**, v. 68, n. 8, p. 1-15, Sep. 2019. <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6841a2>

TSAY, S. V. et al. Burden of Candidemia in the United States, 2017. **Clin Infect Diseases**, Feb., 2020. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa193>

TUMBARELLO, M. et al. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. **J Clin Microbiol.**, n. 45, v. 6, p. 1843-1850, Jun., 2007.
<https://doi.org/10.1128/jcm.00131-07>

XIE, A. T. et al. Accuracy of matrix-assisted LASER desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of *Candida*. **Biosci Rep.**, v. 39, n. 10, BSR20190859, Oct., 2019. <https://doi.org/10.1042/BSR20190859>

XIAO, Z. et al. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and mortality risk factors of candidemia among critically ill patients: a retrospective study from 2011 to 2017 in a teaching hospital in China. **Antimicrob Resist Infect Control.**, n. 8, v. 89, May, 2019 . <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0534-2>

WANG, Y. et al. Antifungal agents for invasive candidiasis in non-neutropenic critically ill adults: What do the guidelines recommend? **International Journal of Infectious Diseases**, v. 89, p. 137-145, Nov., 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.10.016>

4.2- ARTIGO 2

Rapid detection of biofilm-producing *Candida* species via MALDI-TOF Mass Spectrometry

P.A.D.F. Aguiar¹, T.A. Moreira², J.P. Pimenta³, N.B.S. Silva⁴, D.V.D.B. Röder⁴

1: Faculty of Medicine of the Federal University of Uberlândia (FAMED-UFU)

2: Clinical Analysis Laboratory of the Clinical Hospital of Uberlândia (HCU-UFU)

3: Check-Up Medicina Laboratorial (Uberlândia)

4: Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlândia (ICBIM-UFU)

Abstract

Aims: The aim of this study was to evaluate the formation of biofilm by *Candida* spp. isolated from the bloodstream, using traditional spectrophotometric methodologies. In addition, the goal was to compare the results with those obtained through MALDI-TOF/MS, as well as to verify its use as a potential tool for the detection biofilm-forming strains. **Methods and Results:** 113 isolates of *Candida* spp. were studied: 41 were *C. albicans*, 27 *C. tropicalis*, 18 *C. glabrata*, 17 *C. parapsilosis* and 10 *C. krusei*. Metabolic activity was determined through the tetrazolium salt (XTT) reduction assay and biomass by staining with Crystal Violet. All isolates were able to form biofilm, 94% of which were strong producers, with high biomass quantification (95%; 107/113) and high metabolic activity (99%; 112/113). Mass spectra of the biofilm-producing isolates showed differences in the intensity of mass peaks when compared with the spectra of the non-producing strains. **Conclusions:** It was demonstrated that MALDI-TOF/MS was able to detect specific biofilm proteins, as the mass spectra of the isolates presented differences when compared with non-producing strains. **Significance and impact of the study:** MALDI-TOF/MS can become a valuable tool for biofilm detection at the moment of the identification of the microorganism, thus contributing greatly to the management of patients with Candidemia.

Key Words: *Candida* spp. *Candida albicans*. *Candida parapsilosis*. *Candida krusei*. *Candida glabrata*. *Candida tropicalis*. Biofilm. MALDI-TOF/MS

Introduction

The number of fungal infections associated with health care has increased in recent decades and is probably a consequence of advances in medical and surgical therapies (Pote *et al.* 2020). The implementation of aggressive treatment modalities, such as hematopoietic stem cell transplantation, the transplantation of solid organs and the use of chemotherapy agents contributed to the increase in cases of these infections especially those caused by bacteria and fungi (Tsay *et al.* 2020). Among fungal infections, those caused by *Candida* species stand out. Candidemia can be considered the most frequent invasive form, whose mortality can reach 70% (Pappas *et al.* 2018).

Candida albicans is the species of *Candida* most frequently found in clinical isolates worldwide (Pote *et al.* 2020); however, other species such as *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. krusei*, can also be isolated and, in association with *C. albicans*, can represent more than 90% of clinical isolates (Delavy *et al.* 2019).

Candida spp. has the ability to express several virulence factors, with biofilm production being one of the most important ones (Nett and Andes, 2020.) It is well-recognized that biofilm is a structured microbial community involved in an extracellular matrix that allows the microorganism to adhere to biotic and abiotic surfaces, making it difficult the action of antimicrobials (Del Pozo 2017). The formation of biofilm by *Candida* spp. represents a health problem for critically ill patients, due to limited drug therapy options and, currently, there are no well-defined guidelines for the treatment of infections caused by biofilm-forming strains (Olivares *et al.* 2020). Furthermore, it is known that yeast cells present in the biofilm matrix can be dispersed into the bloodstream and spread to other organs, contributing to increased rates of mortality in patients with Candidemia (Pierce *et al.* 2017; Nett and Andes 2020).

Biofilm research is generally carried out using conventional spectrophotometric methodologies, as well as the visualization of these through electron microscopy. Although these techniques are widely used, they may present several limitations such as high costs, low sensitivity and reproducibility,

long run time and overestimation or underestimation of biofilm biomass (Azeredo *et al.* 2017). Currently, new methodologies such as Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS) are become more popular in microbiology laboratories not only for the correct identification of microorganisms (Patel 2015; Cassagne *et al.* 2016) but also as a way of quickly and safe identifying virulence factors. These factors include resistance to antimicrobials (Charretier and Schrenzel 2016; Faron *et al.* 2017; Delavy *et al.* 2019; Roberto *et al.* 2020) and biofilm production capacity (De Carolis *et al.* 2019).

The aim of this study was to evaluate the formation of biofilm by *Candida* spp. isolated from the bloodstream of patients treated at a referral tertiary hospital in Brazil. This was done by using traditional colorimetric methodologies and comparing the results with those obtained through MALDI-TOF/MS, as well as by verifying its use as a potential tool for the detection of biofilm-forming strains.

Materials and methods

Study Unit

This study was conducted at the Hospital de Clínicas of Universidade Federal de Uberlândia (HCU-UFU). The HCU-UFU is a tertiary hospital with approximately 530 beds and is a reference for the cities of Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba in Southeastern Brazil.

Study Design

This is a prospective study carried out between July 2017 and July 2019. *Candida* spp. were obtained from positive blood cultures from patients admitted to the various sectors of the HC-UFU, identified via proteomic analysis (MALDI-TOF/MS, Bruker Daltonik, Germany), kept in brain-heart infusion broth and glycerol (BHI-glycerol) and stored at -20°C until the moment of analysis.

1. Plates preparation for spectrophotometric evaluation

Sample preparation for biofilm production evaluation was carried out according to de Paula Menezes *et al.* (2019), with some modifications as

follows: 10 μ l of a recent culture of *Candida* spp. on sabouraud dextrose agar (ASD) were inoculated in three ml of Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Himedia, Mumbai, India), followed by incubation at $35\pm 2^\circ\text{C}$ for 24 h. After incubation, the material was centrifuged at 3,000 g for five min. The supernatant was then discarded, and the pellet was washed three times with phosphate buffered saline (PBS) (1xPBS diluted from concentrated one 10x). In sequence, the pellet was resuspended and centrifuged three times. This suspension was diluted in RPMI 1640 medium, which was supplemented with glucose and buffered with (N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) (Hexis, Sao Paulo, Brazil), adjusting the turbidity to the 0.5 McFarland scale (approximately 1×10^6 cells/ml) in a digital turbidimeter (DensiCHECK™ Plus-bioMeri ux). Then, 100 μ l of it were dispensed in each well of a flat-bottom 96-well polystyrene plate. Thereafter, the plates were incubated at $35\pm 2^\circ\text{C}$ for 24 h.

2. Biomass determination by staining with Crystal Violet

The determination of biomass by staining with Crystal Violet was performed according to Stepanovi  *et al.* (2007). After the plates were incubated at $35\pm 2^\circ\text{C}$ for 24 h, the culture medium was removed, and the wells were washed with PBS three times to remove planktonic cells. Then, 125 μ l of 0.1% Crystal Violet (Merck, Darmstadt, Germany) were added to the 96-well polystyrene plate and left for five min. After this process, the plate was washed three times with 125 μ l of sterile distilled water to remove excess Crystal Violet. For the purpose of solubilizing this dye, 125 μ l of 30% acetic acid solution were added to the wells, and the reading was performed on a spectrophotometer (Biotek®) at a wavelength of 570 nm.

Tests were done in quadruplicate, and the result was expressed according to the mean of absorbance observed in each well. They were classified as weak producer (OD <0.44), moderate producer (0.44 <OD <1.17) and strong producer (OD > 1.17) (Marcos-Zambrano *et al.* 2014).

3. Determination of metabolic activity via the tetrazolium-XTT reduction assay

The metabolic activity determination was performed according to Pierce *et al.* (2008). After biofilm was formed, the culture medium was removed, and

the wells were washed with PBS three times to remove planktonic cells. Then, 100 μl of [2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide] (XTT) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) and menadione [1 μl of 10 mmol l^{-1} menadione in 10 ml of 0.5 g l^{-1} XTT] (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) solution were added. Then, the plates were incubated and protected from light for two h. After incubation, 80 μl of each sample were transferred to another plate, and the reading was performed on a spectrophotometer (SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader[®]) at a wavelength of 490 nm.

Tests were done in quadruplicate, and the result was expressed according to the mean of the absorbance observed in each well. They were classified as weak producer ($\text{OD} < 0.097$), moderate producer ($0.097 < \text{OD} < 0.2$) and strong producer ($\text{OD} > 0.2$) (Marcos-Zambrano *et al.* 2014).

4. Evaluation of biofilm production via MALDI-TOF/MS

Samples were prepared according to Stevenson *et al.* (2010) and Mlynáriková *et al.* (2016) with some modifications. Three μl of a 48-h culture at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ in ASD were suspended in one ml of 70% ethanol (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and were briefly vortexed; then, this suspension was centrifuged (Eppendorf 5415D) for two min at 56,000 g . The supernatant was removed, and the pellet was quickly centrifuged at 28,000 g , followed by the removal of residual ethanol. The pellet was resuspended in 50 μl of formic acid 70% (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and was added to 50 μl of acetonitrile (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The sample was then briefly vortexed and centrifuged for two min at 1,500 g . Then, three μl of the supernatant were immediately transferred to the MALDI-TOF/MS target plate (Bruker Daltonik, Germany), and after drying at room temperature, the wells were covered with the α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) matrix (Bruker Daltonik, Germany). The software BioTyper 3.1 (Bruker Daltonik, Germany) was used to capture and evaluate the mass spectra and also to create the Composite Correlation Index (CCI). The tests were done in triplicate; low quality spectra with discrepant peaks and those with a score < 2.0 were excluded. *E. coli* (ATCC[®] 25922[™]), *C. albicans* (ATCC[®] 10231[™]), *C. parapsilosis* (ATCC[®] 22019[™]), *C. tropicalis* (ATCC[®] 750[™]), *C. glabrata* (ATCC[®] 15126[™]) and *C.*

krusei (ATCC® 34135™) were used as controls and validation. Strains of non-biofilm-producing *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. krusei* were used to compare mass spectra. The best quality spectra of two biofilm-forming isolates of each species were selected for comparative analysis with the respective non-biofilm-producing strain. To evaluate the CCI matrix, four biofilm-producing isolates and their respective non-producing strain of each *Candida* species studied were selected.

Ethical statement

This study received approval from the Research Ethics Committee of the Federal University of Uberlândia (CEP-UFU), CAAE: 65341817.0.0000.5152, CEP-UFU opinion: 2.826.857.

Results

During the study period, 113 *Candida* spp. were isolated: 41 were *C. albicans*, 27 *C. tropicalis*, 18 *C. glabrata*, 17 *C. parapsilosis* and 10 *C. krusei*. All isolates were able to form biofilm, 94% of which were strong producers, with high biomass quantification (95%; 107/113) and high metabolic activity (99%; 112/113) as shown in **Table 1**.

Table 1: Classification of the biofilm production of *Candida* spp. isolated from the bloodstream of HC-UFU patients between July 2017 and July 2019

Specie (n)	OD variation range (CV)	Crystal Violet			OD variation range (XTT)	XTT		
		WB	MB	SB		WB	MB	SB
<i>C. albicans</i> (41)	0,854-3,998	0	1	40	0,318-1,289	0	0	41
<i>C. tropicalis</i> (27)	0,448-3,998	0	2	25	0,313-1,423	0	0	27
<i>C. glabrata</i> (18)	1,132-3,917	0	1	17	0,364-1,401	0	0	18
<i>C. parapsilosis</i> (17)	0,841-3,808	0	2	15	0,195-1,094	0	1	16
<i>C. krusei</i> (10)	1,258-3,771	0	0	10	0,241-0,745	0	0	0

OD: Optical Density; CV: Crystal Violet; WB: weak biofilm producer; MB: moderate biofilm producer; SB: strong biofilm producer

When evaluating the mass spectra of the isolates using BioTyper 3.1 software, it was possible to observe differences between the proteomic profiles of the isolates when compared with the respective non-biofilm-producing strains, especially analyzing the difference in intensity of certain mass peaks. For *C. albicans*, these differences were better noticed in 3530 m/z, 4579 m/z and 6907 m/z; for *C. tropicalis* in 3080-3080 m/z, 3501-3502 m/z, 4113 m/z, 6063m/z and 6899-6900 m/z; for *C. glabrata* in 3845 m/z, 5254 m/z, 5560 m/z, 5888 and 11110 m/z; for *C. parapsilosis* in 3620 m/z, 4590-4592 m/z, 5091 m/z, 6668 m/z and 8229 m/z and finally for *C. krusei* in 3133 m/z, 3945 m/z and 6758 m/z. Figures **1-5** show the mass spectra, with emphasis on the mass peaks with different intensities, of the non-biofilm producing strains (**A**) and of two biofilm producing isolates (**B** and **C**) of each studied species. In addition, when evaluating the CCI, it was possible to observe differences in the masses of biofilm-producing isolates when compared to non-biofilm producing strains. The distances between the mass spectra are represented as a color spectrum ranging from red, high similarity, to blue, low similarity. Figure **6** shows the CCI matrix of four biofilm-producing isolates and the respective non-producing strains for each *Candida* species studied (**A**: *C. albicans*; **B**: *C. tropicalis*; **C**: *C. glabrata*; **D**: *C. parapsilosis* and **E**: *C. krusei*).

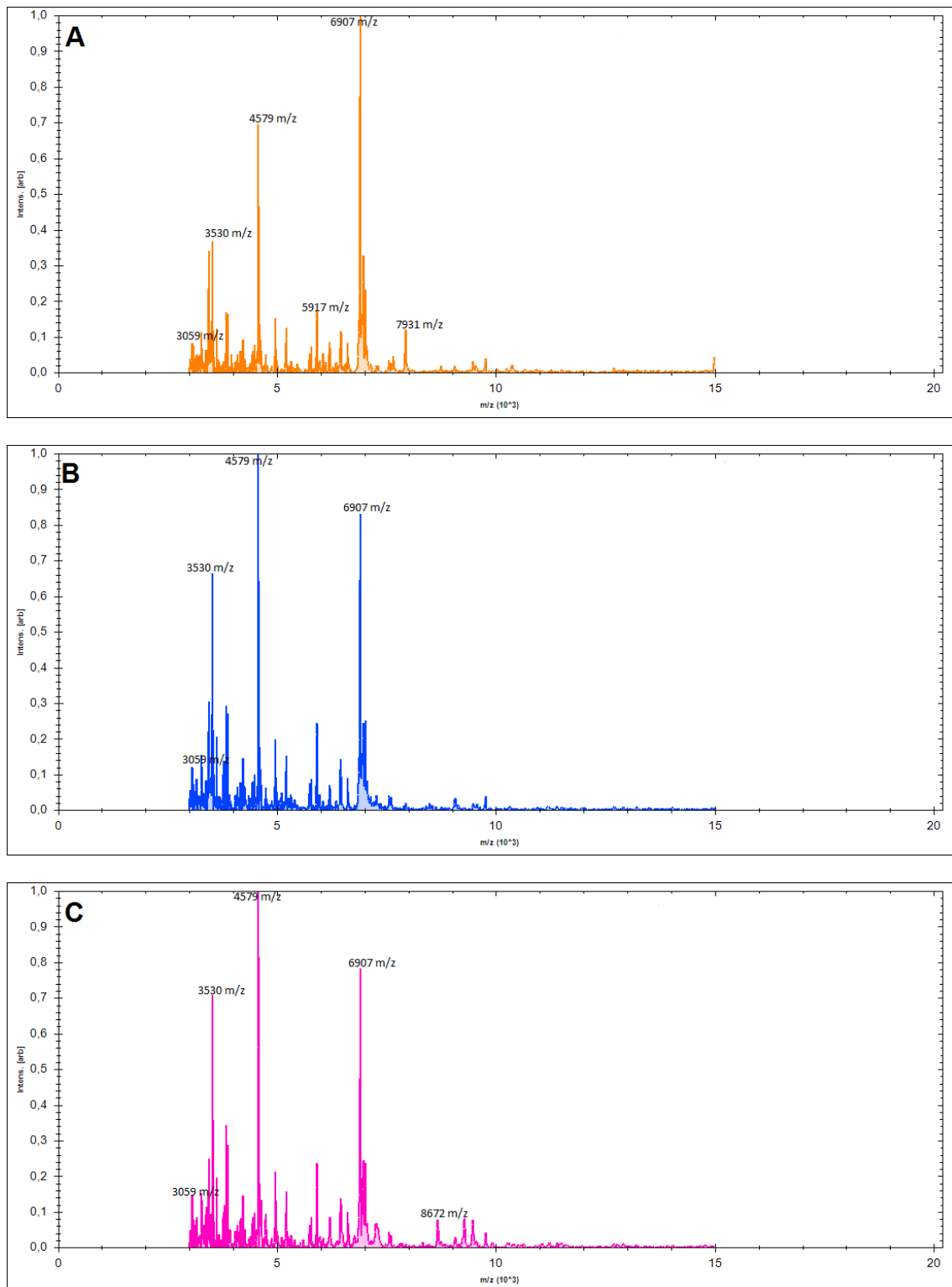


Figure 1: Mass spectra of *Candida albicans* non-producing biofilm (A) and isolates producing biofilm (B and C). The main differences between the proteomic profiles of non-biofilm-producing isolates from those of biofilm-producers can be seen especially in the relative mass ranges of 3530 m/z, 4579 m/z and 6907 m/z.

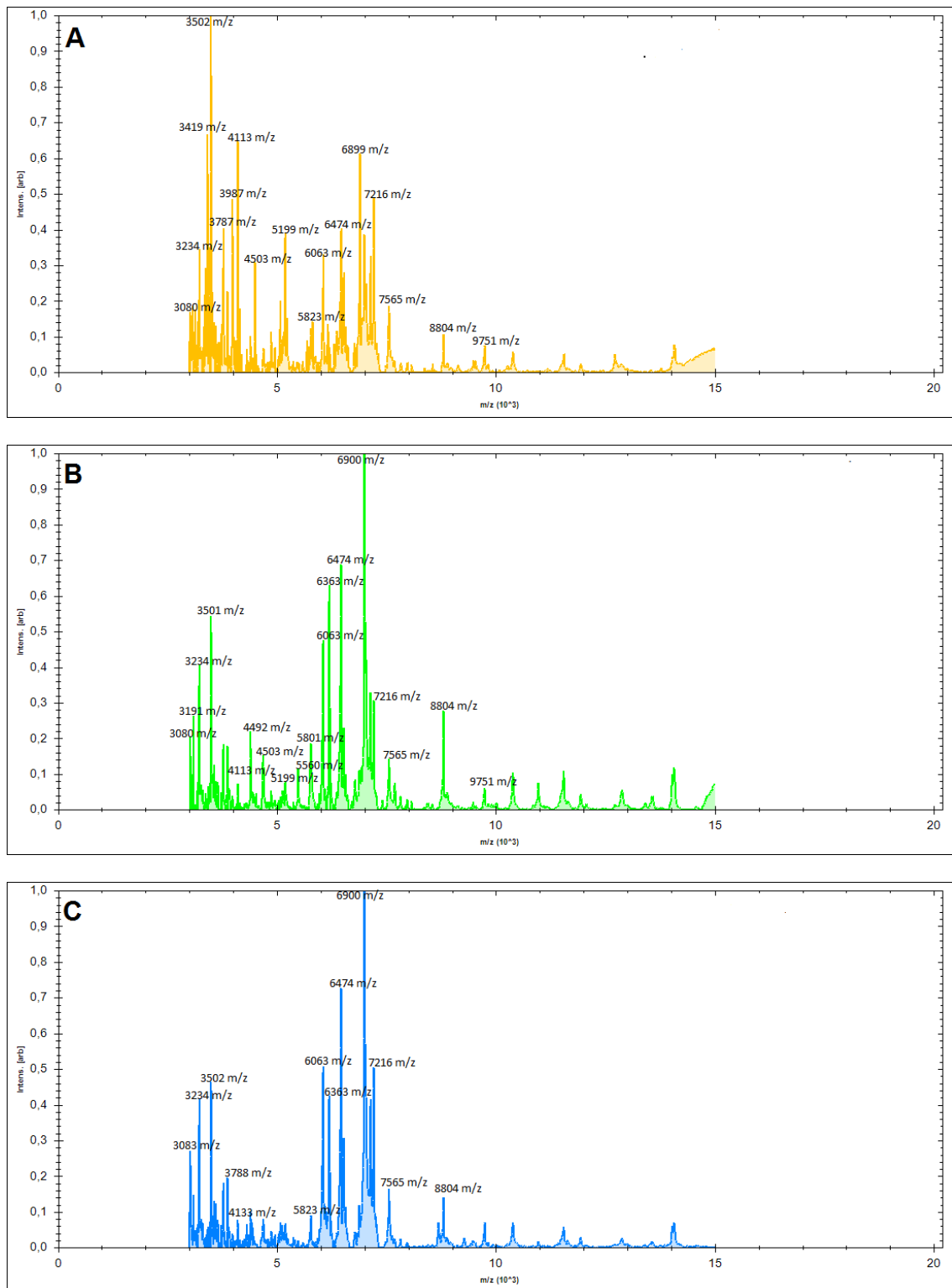


Figure 2: Mass spectra of *Candida tropicalis* non-producing biofilm (A) and isolates producing biofilm (B and C). The main differences between the proteomic profiles of non-biofilm-producing isolates from those of biofilm-producers can be seen especially in the relative mass ranges of 3080-3080 m/z, 3501-3502 m/z, 4113 m/z, 6063m/z and 6899-6900 m/z.

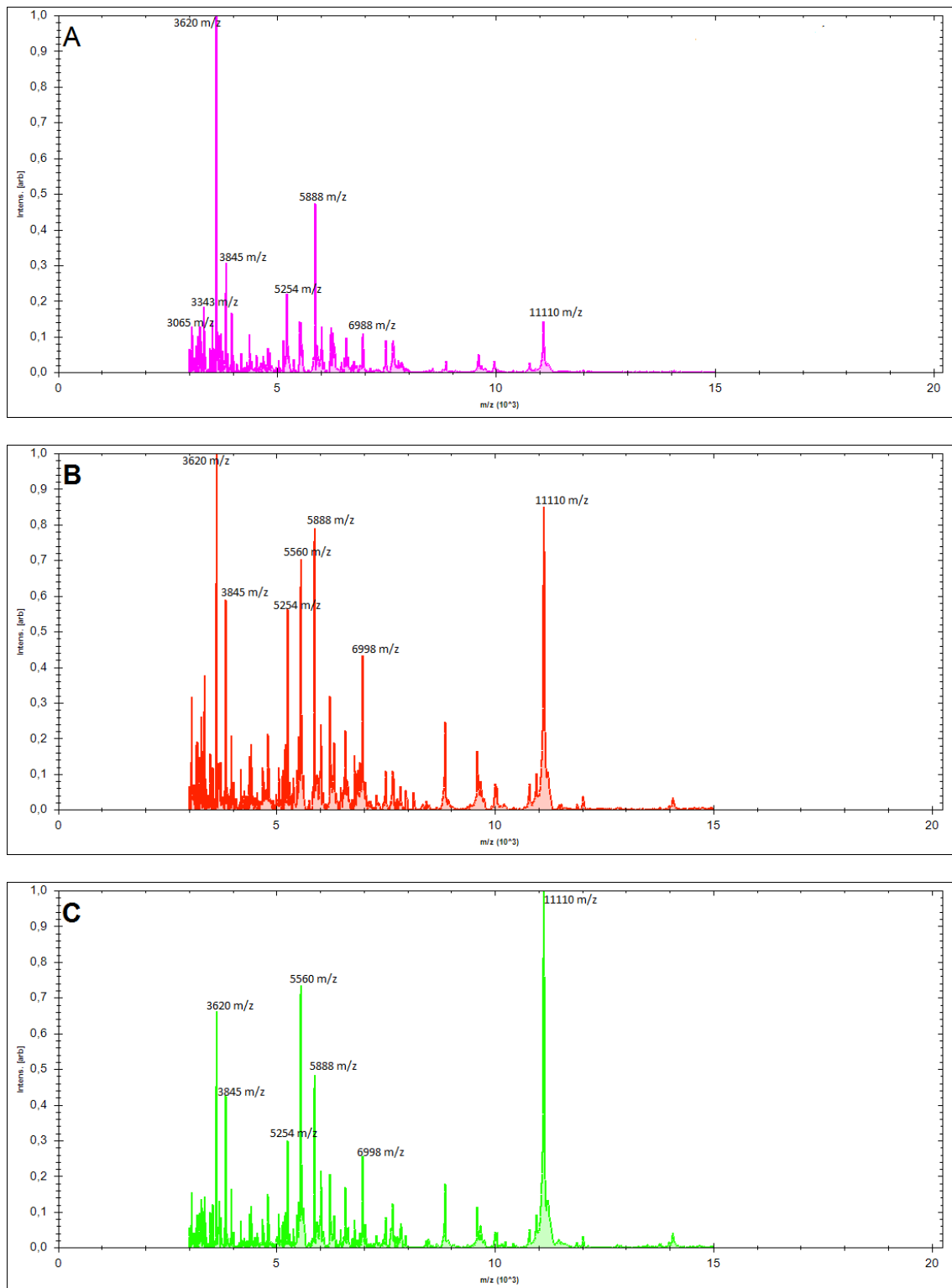


Figure 3: Mass spectra of *Candida glabrata* non-producing biofilm (A) and isolates producing biofilm (B and C). The main differences between the proteomic profile of the biofilm-producing and non-producing isolates can be seen especially in the relative mass ranges 3845 m/z, 5254 m/z, 5560 m/z, 5888 and 11110 m/z.

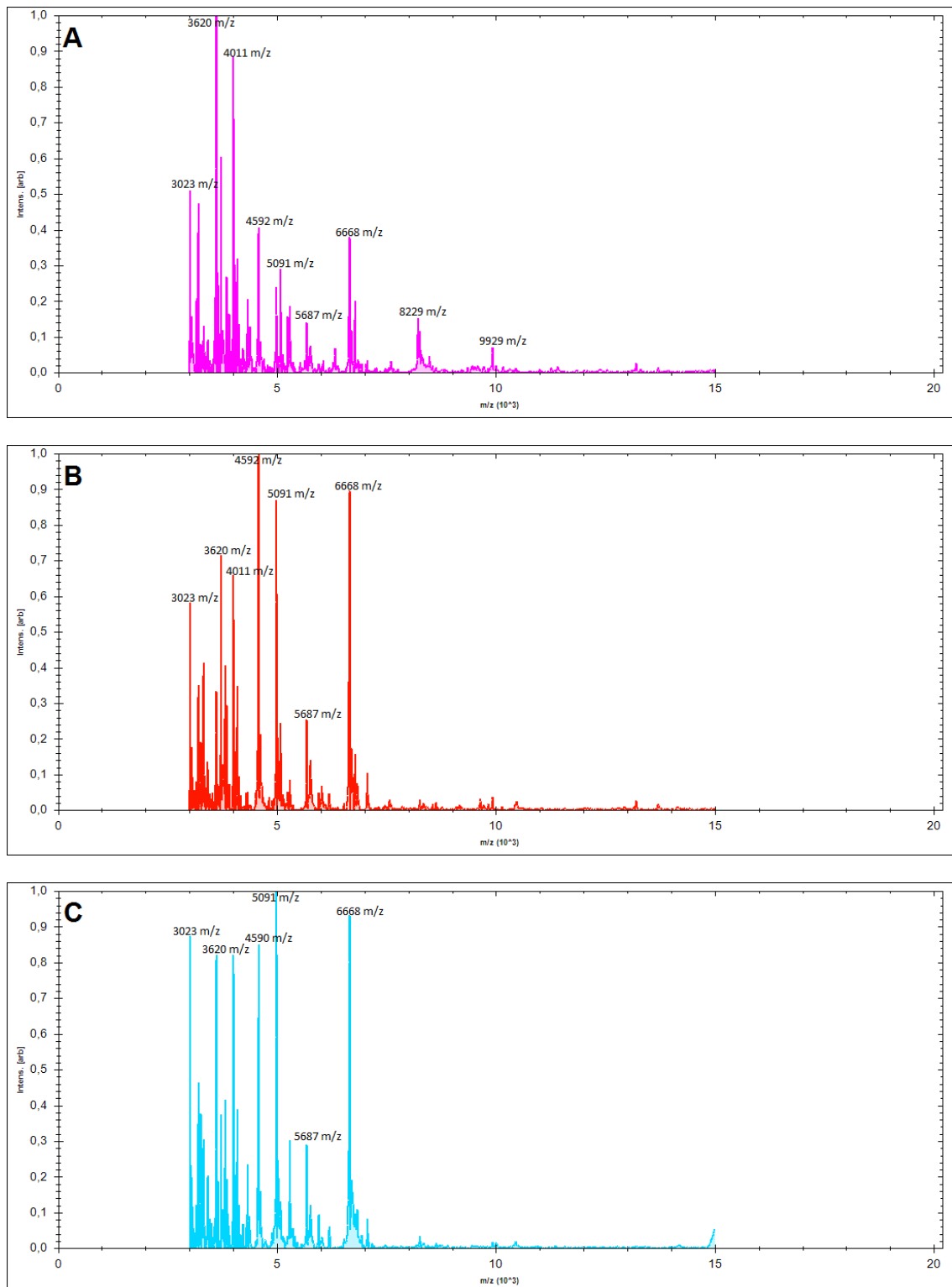


Figure 4: Mass spectra of *Candida parapsilosis* non-producing biofilm (A) and isolates producing biofilm (B and C). The main differences between the proteomic profile of the non-producing and producing-biofilm isolates can be seen especially in the relative mass ranges of 3620 m/z, 4590-4592 m/z, 5091 m/z, 6668 m/z and 8229 m/z.

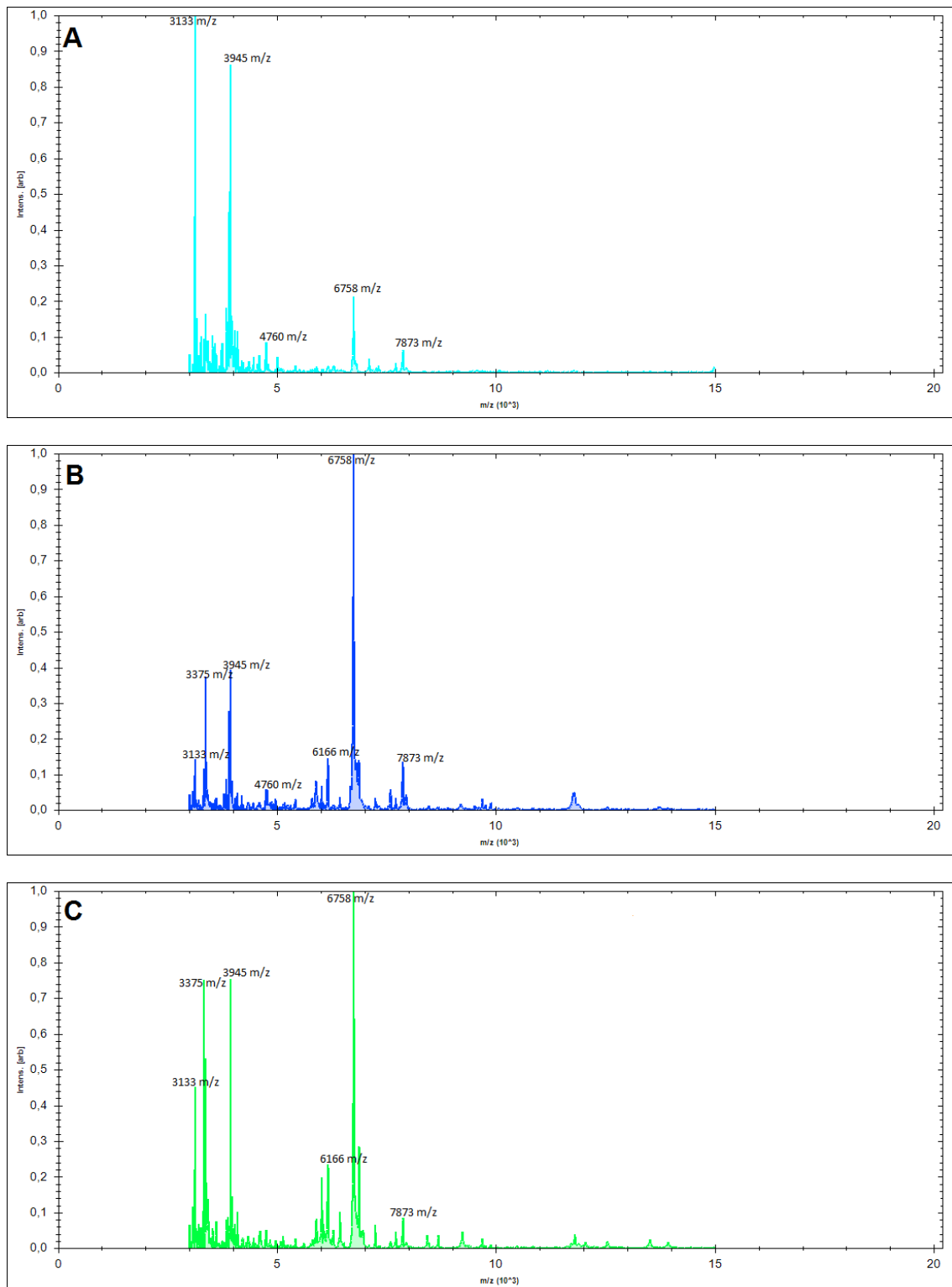


Figure 5: Mass spectra of *Candida krusei* non-producing biofilm (A) and isolates producing biofilm (B and C). The main differences between the proteomic profile of the non-producing and producing-biofilm isolates can be seen especially in the relative mass ranges of 3133 m/z, 3945 m/z and 6758 m/z.

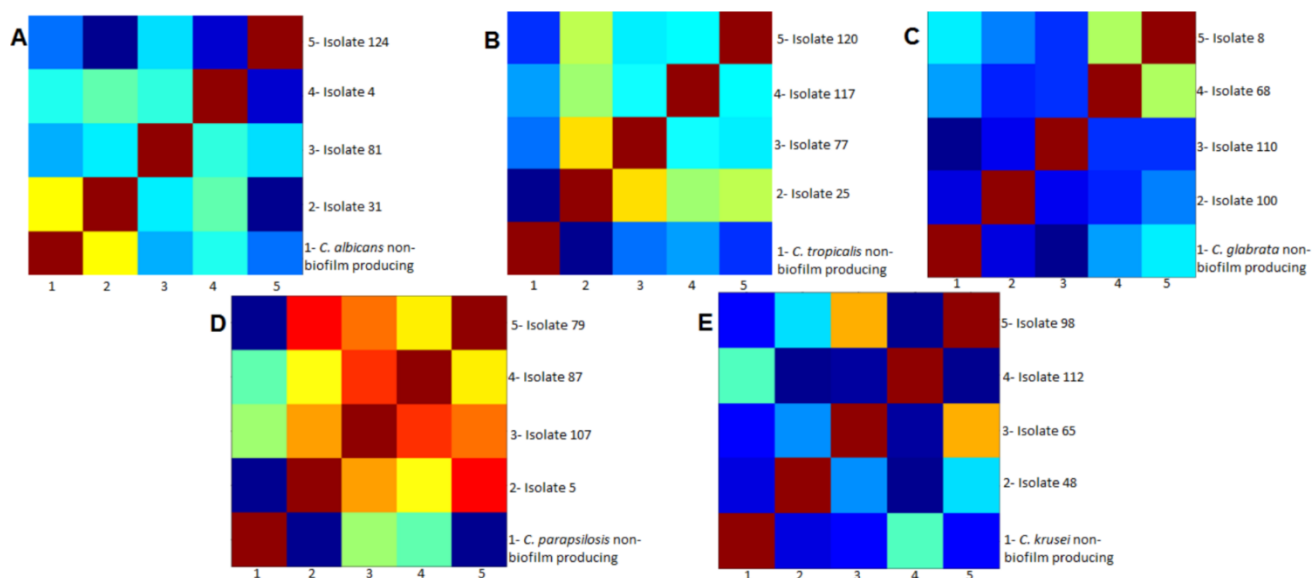


Figure 6: Composite Correlation Index matrix of 4 biofilm-producing isolates and the respective non-producing strains for each *Candida* species studied (**A:** *C. albicans*; **B:** *C. tropicalis*; **C:** *C. glabrata*; **D:** *C. parapsilosis* and **E:** *C. krusei*). The distances between the mass spectra are represented as a color spectrum ranging from red, high similarity, to blue, low similarity.

Discussion

Bloodstream infection resulting from *Candida* spp. has become a serious public health problem (Oviño and Rodrigues-Sánchez 2020; Tsay *et al.* 2020), mainly in tertiary hospitals, because in these places are hospitalized patients at the higher risk of developing Candidemia, such as those admitted to the intensive care units, undergoing various invasive procedures and multiples indwelling medical devices (Monfredini *et al.*, 2018; Al-dorzi *et al.* 2020). Candidemia is associated with high mortality rates due to late diagnosis and treatment (Clancy and Nguyen 2018; Pappas *et al.* 2018; Vitális *et al.* 2020). Van Ismail *et al.* (2020) mentioned this disease is the fourth-leading cause of nosocomial bloodstream infection.

Several studies have demonstrated the importance and frequency of biofilm-producing *Candida* spp. isolates, many of which are strongly producers (Monfredini *et al.* 2018; De Carolis *et al.* 2019; de Paula Menezes *et al.* 2019; Vitális *et al.* 2020). According to these authors, patients infected with biofilm-producing isolates have a worse prognosis, given that biofilm production by

Candida spp. is considered an important virulence factor, contributing to the persistence of the infection and hindering its treatment. This can culminate in an unfavorable clinical outcome and can be deemed an independent predictor of mortality among patients with Candidemia (Li *et al.* 2018), as the biofilm matrix can withstand high doses of antifungals and still provide resistance to the host's defense factors (Nett and Andes 2020).

Biofilm production capacity has been researched via conventional methods, such as biomass quantification (Crystal Violet staining) and the evaluation of metabolic activity (XTT reduction assays) (Azeredo *et al.* 2017). In this study, all 113 isolates were biofilm producers and mostly presented the high quantification of biomass and high metabolic activity. Few differences were found between the traditional methodologies used, which can be explained by the structural difference in the composition of the species-specific biofilm (Marcos-Zambrano *et al.* 2014; Nett and Andes 2020). It can also be explained by the ways in which the experiments were conducted, as Crystal Violet evaluate the extracellular matrix, living and dead cells as a whole and the reduction of XTT assays are used to evaluate only live cells (Azeredo *et al.* 2017). It is known that the capacity of biofilm formation, as well the structure and composition of the matrix are species dependent (Li *et al.* 2018). However, in this study, no significant differences were found regarding biomass and metabolic activity between the studied species.

The study by Thomas *et al.* (2006) showed that the most abundant component of the biofilm matrix is proteins. The 2D-PAGE techniques, as well as their modification, the 2D-DIGE, were the most commonly used for the study of proteins in biological components. Since then, proteomic analysis has been used to investigate the biofilms of *Candida* spp. (Martínez-Gomariz *et al.* 2009), showing that distinct proteins exist between biofilm-forming and non-forming microorganisms. However, these techniques are laborious and time consuming, and depending on the proteins found, they may show low reproducibility (Meleady 2018).

As already mentioned, studies suggest a correlation between mortality and biofilm formation (Li *et al.* 2018; Vitális *et al.* 2020). It is known that infections caused by biofilm-producing isolates tend to be more severe, given

that these microorganisms find in the biofilm a safe environment and this provides the persistence of the infectious process, even in those patients who received the appropriate antifungal treatment (Monfredini *et al.* 2018). In addition, the formation of biofilm promotes the colonization of tissues and indwelling medical devices, which hinders the process of eliminating these microorganisms from the bloodstream (De Carolis *et al.* 2019). Therefore, for the best and correct management of patients with Candidemia, rapid and safe techniques for the detection of the biofilm-producing isolates must be implemented.

In this context, rapid, simple, cost-effective and reproducible techniques have been identified as potential tools for the differentiation of various protein components of the microorganism cells (Greco *et al.* 2018), as well as their biofilms. MALDI-TOF/MS has been widely used in microbiology, and studies suggest that its use can be extrapolated, for example, to identify the virulence factors of these (Delavi *et al.*; 2019; Oviño and Rodríguez-Sánchez 2020), such as the potential production of biofilm (De Carolis *et al.* 2019).

Kubesová *et al.* (2012), evaluating the discriminatory power of MALDI-TOF/MS to correctly identify strains of the “psilosis” complex, could have also checked to verify differences between the mass spectra of the biofilm-producing and non-producing strains; however, they claimed that this is a laborious technique and suggested that the analysis of a large number of yeasts would be necessary to form a reliable database. Mlynáriková *et al.* (2016) evaluated isolates of *C. parapsilosis stricto sensu* (producing and non-producing biofilms) and found no significant differences between them, showing a low reproducibility of this technique, even when different types of matrices were used for the analysis. However, as Thomaz (2018) suggested, the mentioned authors used a liquid culture medium to study the isolates, and the formation of biofilm on the wall of the bottles containing this medium could justify the absence of a difference between the samples analyzed. Finally, De Carolis *et al.* (2019) pointed out the efficiency of MALDI-TOF/MS for the discrimination between isolates of *C. parapsilosis* highly producing biofilms and those considered to be from lower producers.

The present study showed differences between the mass spectra of the biofilm-producing isolates when compared with the spectra of the respective non-producing strains, especially the difference in intensity of certain mass peaks, indicating that specific proteins exist in isolates biofilm-producers. However, the number of samples tested is small—not sufficient to compose a database. Thus, a multicenter analysis of the isolates of *Candida* spp. biofilm producers that shows different profiles of mass spectra would be necessary for the validation of these results. With more robust numbers, information about strains with the potential to produce biofilm could exist in equipment databases; this fact would make it possible, with no additional costs for the laboratory, to analyze and detect biofilm producing strains quickly and safely, at the moment of the identification of the microorganism, thus contributing greatly to the management of patients with Candidemia.

In conclusion, all samples of *Candida* spp. isolated from the bloodstream presented the ability to produce biofilm, which was verified via both biomass and metabolic activity and this fact contributes to microorganism virulence. It was demonstrated that mass spectrometry was able to detect specific biofilm proteins, as the mass spectra of the isolates presented differences when compared with non-producing strains. As soon as a large number of samples are studied, thus leading to the generation of a robust database, MALDI-TOF/MS can become a valuable tool for this purpose.

Acknowledgements

We would like to thank all of those who participated in this work, especially the technical staff of the microbiology sector of the clinical analysis laboratories at the HCU-UFU, Technical health school of the Federal University of Uberlândia (ESTES-UFU) and Check-Up Medicina Laboratorial. This research would not be possible without their valuable help. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) Finance Code 001.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest

Authors' contributions

The authors contributed equally to this work.

References

Al-Dorzi H.M., Sakkijha H., Khan R., Aldabbagh T., Toledo A., Ntinika P., Al Johani S.M., Arabi Y.M. (2020). Invasive Candidiasis in Critically Ill Patients: A Prospective Cohort Study in Two Tertiary Care Centers. *J Intensive Care Med* **35**, 542-553. <https://doi.org/10.1177/0885066618767835>

Azeredo J., Azevedo N.F., Briandet R., Cerca N., Coenye T., Costa A.R., Desvaux M., Di Bonaventura G., Hébraud M., Jaglic Z., Kačániová M., Knøchel S., Lourenço A., Mergulhão F., Meyer R.L., Nychas G., Simões M., Tresse O., Sternberg C.(2017). Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol* **43**, 313-351. <https://doi.org/10.1080/1040841x.2016.1208146>

Cassagne C., Normand A.C., L'Ollivier C., Ranque S., Piarroux R.(2016). Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. *Mycoses* **59**, 678-690. <https://doi.org/10.1111/myc.12506>

Charretier, Y., Schrenzel, J. (2016). Mass spectrometry methods for predicting antibiotic resistance. *Proteo Clin Applications* **10**, 964-981. <https://doi.org/10.1002/prca.201600041>

Clancy C.J., Nguyen M.H. (2018). Diagnosing Invasive Candidiasis. *J Clin Microbiol* **56**, e01909-01917. <https://doi.org/10.1128/jcm.01909-17>

De Carolis E., Soldini S., La Rosa M., Nucci F., Posteraro B., Sanguinetti M. (2019). BIOF-HILO Assay: A New MALDI-TOF Mass Spectrometry Based Method for Discriminating Between High- and Low-Biofilm-Producing *Candida parapsilosis* Isolates. *Front Microbiol* **10**, 2046. <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffmicb.2019.02046>

de Paula Menezes R., Silva F.F., Melo S.G.O., Alves P.G.V., Brito M.O., de Souza Bessa M.A., Amante Penatti M.P., Pedroso R.S., Abdallah V.O.S., Röder D.V.D.B. (2019). Characterization of *Candida* species isolated from the hands of the healthcare workers in the neonatal intensive care unit. *Med Mycol* **57**, 588-594. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy101>

Del Pozo, J.L. (2017). Biofilm-related disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* **16**, 51-65. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1417036>

Delavy, M., Dos Santos, A.R., Heiman, C.M., & Coste, A.T. (2019). Investigating Antifungal Susceptibility in *Candida* Species With MALDI-TOF MS-Based Assays. *Front Cell Infect Microbiol* **9**, 19. <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffcimb.2019.00019>

Doi A.M., Pignatari, A.C., Edmond, M.B., Marra, A.R., Camargo, L.F., Siqueira, R.A., da Mota, V.P., Colombo, A.L. (2016). Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *PloS one* **11**, e0146909.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146909>

Faron M.L., Buchan B.W., Ledebor N.A. (2017). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Use with Positive Blood Cultures: Methodology, Performance, and Optimization. *J Clin Microbiol* **55**, 3328-3338. <https://doi.org/10.1128/jcm.00868-17>

Greco V., Piras C., Pieroni L., Ronci M., Putignani L., Roncada P., Urbani A. (2018). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical proteomics. *Expert Rev Proteomics* **15**, 683-696.

<https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1505510>

Kubesová A., Šalplachta J., Horká M., Røužička F., Šlais K. (2012). Candida “psilosis” –electromigration techniques and MALDI-TOF mass spectrometry for phenotypical discrimination. *Analyst* **137**, 1937-1943. DOI: [10.1039/c2an15931g](https://doi.org/10.1039/c2an15931g)

Li, W.S., Chen, Y.C., Kuo, S.F., Chen, F.J., Lee, C.H. (2018). The Impact of Biofilm Formation on the Persistence of Candidemia. *Front Microbiol* **9**, 1196.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01196>

Marcos-Zambrano L.J., Escribano P., Bouza E., Guinea J. (2014). Production of biofilm by Candida and non-Candida spp. isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. *Int J Med Microbiol*, **304**, 1192-1198.

<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.08.012>

Marins T.A., Marra A.R., Edmond M.B., Martino M.D.V., Yokota P.K.O., Mafra A.C.C.N., Durão Junior M.S.(2018). Evaluation of *Candida* bloodstream infection and antifungal utilization in a tertiary care hospital. *BMC Infect Dis* 2018 **18**, 187.

<https://doi.org/10.1186/s12879-018-3094-9>

Martínez-Gomariz M., Perumal P., Mekala S., Nombela C., Chaffin W..L, Gil C. (2009). Proteomic analysis of cytoplasmic and surface proteins from yeast cells, hyphae, and biofilms of *Candida albicans*. *Proteomics* **9**, 2230-2252.

<https://dx.doi.org/10.1002%2Fpmic.200700594>

Meleady P. (2018). Two-Dimensional Gel Electrophoresis and 2D-DIGE.

Methods Mol Biol **1664**, 3-14. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7268-5_1

Mlynáriková K., Šedo O., Růžička F., Zdráhal Z., Holá V., Mahelová M. (2016). Evaluation of capacity to detect ability to form biofilm in *Candida parapsilosis* sensu stricto strains by MALDI-TOF MS. *Folia Microbiol (Praha)* **61**, 465-471.

<https://doi.org/10.1007/s12223-016-0458-7>

Monfredini P.M., Souza A.C.R., Cavaleiro R.P., Siqueira R.A., Colombo A.L. (2018). Clinical impact of *Candida* spp. biofilm production in a cohort of patients with candidemia. *Med Mycol* **56**, 803-808. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx133>

Nett J.E., Andes D.R. (2020). Contributions of the Biofilm Matrix to *Candida* Pathogenesis. *J Fungi (Basel)* **6**, 21. <https://dx.doi.org/10.3390/Fjof6010021>

Olivares E., Badel-Berchoux S., Provot C., Prévost G., Bernardi T., Jehl F. (2020). Clinical Impact of Antibiotics for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections. *Front Microbiol.* **9**,10:2894. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02894>

Oviaño M., Rodríguez-Sánchez B. (2020). MALDI-TOF mass spectrometry in the 21st century clinical microbiology laboratory. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **25**, S0213-005X(20)30163-4. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.02.027>

Pappas P.G., Lionakis M.S., Arendrup M.C., Ostrosky-Zeichner L., Kullberg B.J. (2020). Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers* **4**,18026. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>

Patel R. (2015). MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin Chem.* **61**, 100-111. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.221770>

Pfaller M.A., Diekema D.J., Turnidge J.D., Castanheira M., Jones R.N.(2019). Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* Species From 1997-2016. *Open Forum Infect Dis* **15**, S79-S94. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy358>

Pierce C.G., Uppuluri P., Tristan A.R., Wormley F.L. Jr., Mowat E., Ramage G., Lopez-Ribot J.L. (2008). A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc*, **3**,1494-1500. <https://doi.org/10.1038/nport.2008.141>

Poissy J., Damonti L., Bignon A., Khanna N., Von Kietzell M., Boggian K., Neofytos D., Vuotto F., Coiteux V., Artru F., Zimmerli S., Pagani J.L., Calandra T., Sendid B., Poulain D., van Delden C., Lamoth F., Marchetti O., Bochud P.Y., FUNGINOS; Allfun French Study Groups. (2020). Risk factors for candidemia: a prospective matched case-control study. *Crit Care* **24** 109. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-2766-1>

Pote S.T., Sonawane M.S., Rahi P., Shah S.R., Shouche Y.S., Patole M.S., Thakar M.R., Sharma R. (2020). Distribution of Pathogenic Yeasts in Different Clinical Samples: Their Identification, Antifungal Susceptibility Pattern, and Cell Invasion Assays. *Infect Drug Resist.* **13**, 1133-145. <https://doi.org/10.2147/idr.s238002>

Roberto A.E.M., Xavier D.E., Vidal E.E., Vidal C.F.L., Neves R.P., Lima-Neto R.G. (2020). Rapid Detection of Echinocandins Resistance by MALDI-TOF MS

in *Candida parapsilosis* Complex. *Microorganisms* **8**, 109.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8010109>

Stepanović S., Vuković D., Hola V., Di Bonaventura G., Djukić S., Cirković I., Ruzicka F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, **115**, 891-899.
https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x

Stevenson, L.G., Drake, S.K., Shea, Y.R., Zelazny, A.M., Murray, P.R. (2010). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species *J Clin Microbiol* **48**, 3482–3486. <https://doi.org/10.1128/jcm.00687-09>

Tsay S.V., Mu Y., Williams S., Epton E., Nadle J., Bamberg W.M., Barter D.M., Johnston H.L., Farley M.M., Harb S., Thomas S., Bonner L.A., Harrison L.H., Hollick R., Marceaux K., Mody R.K., Pattee B., Shrum Davis S., Phipps E.C., Tesini B.L., Gellert A.B., Zhang A.Y., Schaffner W., Hillis S., Ndi D., Graber C.R., Jackson B.R., Chiller T., Magill S., Vallabhaneni S. (2017). Burden of Candidemia in the United States. *Clin Infect Dis*, **28**, ciaa193.

Thomas D.P., Bachmann S.P., Lopez-Ribot J.L. (2006). Proteomics for the analysis of the *Candida albicans* biofilm lifestyle. *Proteomics* **6**, 5795-5804.
<https://doi.org/10.1002/pmic.200600332>

Thomaz, D.Y. (2018). Complexo *Candida parapsilosis*: identificação molecular das espécies, análise proteômica dos biofilmes por MALDI-TOF MS e investigação de um surto envolvendo isolados clínicos resistentes aos azólicos. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo. DOI: 10.11606/T.5.2019.tde-13022019-163819

Vítális E., Nagy F., Tóth Z., Forgács L., Bozó A., Kardos G., Majoros L., Kovács R. (2020). *Candida* biofilm production is associated with higher mortality in patients with candidaemia. *Mycoses* **63**, 352-360.
<https://doi.org/10.1111/myc.13049>

Wan Ismail W.N.A., Jasmi N., Khan T.M., Hong Y.H., Neoh C.F. (2020). The Economic Burden of Candidemia and Invasive Candidiasis: A Systematic Review. *Value Health Reg Issues* **21**, 53-58.
<https://doi.org/10.1016/j.vhri.2019.07.002>

Welsh R.M., Bentz M.L., Shams A., Houston H., Lyons A., Rose L.J., Litvintseva A.P. (2017). Survival, Persistence, and Isolation of the Emerging Multidrug-Resistant Pathogenic Yeast *Candida auris* on a Plastic Health Care Surface. *J Clin Microbiol* **55**, 2996-3005. <https://doi.org/10.1128/jcm.00921-17>

5- REFERENCIAS

AL-DORZI, H., M. et al. Invasive Candidiasis in Critically Ill Patients: A Prospective Cohort Study in Two Tertiary Care Centers. **Jour. Intensive Care Medicine**, v. 35, n. 6, p. 542-553, 2020.

<https://doi.org/10.1177/0885066618767835>

ALBAINA, O. et al. Identification and characterization of nine atypical *Candida dubliniensis* clinical isolates. **J Med Microbiol.**, v. 64, p. 147-156, Feb., 2015.

<https://doi.org/10.1099/jmm.0.078832-0>

ALMEIDA, F.; RODRIGUES, M.L.; COELHO, C. The still underestimated problem of fungal diseases worldwide. **Front Microbiol**, 10:214, Feb., 2019. doi: [10.3389/fmicb.2019.00214](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00214)

ALVES, P. G. V. et al. Risk factors associated with mortality among patients who had candidemia in a university hospital. **Rev Soc Bra Med Trop.**, v. 53, e20190206: 2020. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0206-2019>.

AMBARAGHASSI, G. et al. Identification of *Candida auris* by Use of the Updated Vitek 2 Yeast Identification System, Version 8.01: a Multilaboratory Evaluation Study. **J Clin Microbiol**, v. 57, n. 11, e00884-19, Oct., 2019.

<https://doi.org/10.1128/jcm.00884-19>

AMIRI-ELIASI, B.; FENSELAU, C. Characterization of protein biomarkers desorbed by MALDI from whole fungal cells. **Anal Chem.**, v. 73, n. 21, p. 5228-5231, Nov., 2001. <https://doi.org/10.1021/ac010651t>

ARENDUP, M. C. et al. Diagnostic Performance of T2Candida Among ICU Patients With Risk Factors for Invasive Candidiasis. **Open Forum Infect Dis.**, v. 6, n. 5, ofz 136, Mar., 2019. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz136>

ARROYO-MENDONZA, M. Effect of testosterone and estrogen supplementation on the resistance to systemic *Candida albicans* infection in mice. **Heliyon**, v. 6, n. 7, e04437. Jul., 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04437>

AZEREDO, J. et al. Critical Review on biofilm methods. **Crit Rev Microbiol**, v. 43, n. 3, p. 313-351, May, 2017.

<https://doi.org/10.1080/1040841x.2016.1208146>

BASSETI, M. et al. Incidence and outcome of invasive candidiasis in intensive care units (ICUs) in Europe: results of the EUCANDICU project. **Crit care**, v. 23, n. 219, Jun., 2019. <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2497-3>

BIENVENU, A. L. et al. Evaluation of first-line therapies for the treatment of candidemia in ICU patients: A propensity score analysis. **Int J Infect Dis.**, v. 93, p. 16-21, 2020 Apr., 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.01.037>

CASSAGNE, C. et al. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. **Mycoses**, v. 59, n.11, p. 678-690, Nov., 2016.

<https://doi.org/10.1111/myc.12506>

CHARRETIER, Y.; SCHRENZEL, J. Mass spectrometry methods for predicting antibiotic resistance. **Proteomics Clinical Applications**, v. 10; n. 9-10; p.964-981; Oct., 2016. <https://doi.org/10.1002/prca.201600041>

CLANCY, C. J.; NGUYEN, M. H. Diagnosing Invasive Candidiasis. **J Clin Microbiol**, v. 56, n. 5, e01909-17, Apr., 2018.

<https://doi.org/10.1128/jcm.01909-17>

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. M27-S4. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: 4th Informational Supplement. **Clinical and Laboratory Standard Institute**, Wayne, Pennsylvania, 2012. ISBN 1-56238-827-4

CHOI, H. et al. Changes in the utilization patterns of antifungal agents, medical cost and clinical outcomes of candidemia from the health-care benefit expansion to include newer antifungal agents. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 83, p. 49-55, Jun., 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.03.039>

COLOMBO, A. L. et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Braz J Infect Dis.**, v.17, n. 3, Jun., 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2013.02.001>

DA MATTA, D.A; SOUZA A.C.R. COLOMBO, A.L. Revisiting Species Distribution and Antifungal Susceptibility of Candida Bloodstream Isolates from Latin American Medical Centers. **J Fungi (Basel)**, v. 3, n. 2, 2017.

<https://doi.org/10.3390/jof3020024>

DELAVY, M. et al. Investigating Antifungal Susceptibility in *Candida* Species With MALDI-TOF MS-Based Assays. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 19; n. 9; Feb., 2019. <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffcimb.2019.00019>

DE CAROLIS, E. et al. BIOF–HILO Assay: A New MALDI–TOF Mass Spectrometry Based Method for Discriminating Between High and Low-Biofilm-Producing *Candida parapsilosis* Isolates. **Front Microbiol.**, v. 10, art. 246, Aug., 2019. <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffmicb.2019.02046>

DEL POZO, J. L. Biofilm-related disease. **Expert Rev Anti Infect Ther.**, v. 16, n.1, p. 51-65, Jan., 2018. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1417036>

De PAULA MENEZES, R. et al. Characterization of *Candida* species isolated from the hands of the healthcare workers in the neonatal intensive care unit.

Medical Mycology, v. 0, p. 1-7, Sep., 2019.

<https://doi.org/10.1093/mmy/myy101>

DOI, M. A. et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PloS One**, 2016; 11(1): e0146909. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146909>

FARON, M. L.; BUCHAN, B. W.; LEDEBOER, N. A. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Use with Positive Blood Cultures: Methodology, Performance, and Optimization. **J Clin Microbiol.**, v. 55, n. 12, p. 3328-3338, Dec., 2017. <https://doi.org/10.1128/jcm.00868-17>

FONTECHA, G. et al. Identification of Cryptic Species of Four *Candida* Complexes in a Culture Collection. **J Fungi (Basel)**, v. 5, n. 4., p. 117. Dec., 2019. <https://dx.doi.org/10.3390%2Fjof5040117>

GÓMEZ-GAVIRIA M.; MORA-MONTES, H.M. Current Aspects in the Biology, Pathogeny, and Treatment of *Candida krusei*, a Neglected Fungal Pathogen. **Infect Drug Resist.**, v. 10, n. 13., p. 1673-1689, Jun. 2020. <https://dx.doi.org/10.2147%2FIDR.S247944>

GRECO, V. et al. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical proteomics. **Expert Rev Proteomics**, v. 15, n.8, p. 683-696, Aug., 2018. <https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1505510>

HART, E. et al. A systematic review of the impact of antifungal stewardship interventions in the United States. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.**, v.18, n. 24, Aug., 2019. <https://doi.org/10.1186/s12941-019-0323-z>

HIRAYAMA, T. et al. Virulence assessment of six major pathogenic *Candida* species in the mouse model of invasive candidiasis caused by fungal translocation. **Sci Rep.**, v. 10, n. 1, p. 3814, Mar., 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60792-y>

HOSMER, D. W.; LEMESHOW, S. Applied Logistic Regression, Second Edition, New York: John Wiley & Sons. 2004, 392p. [ISBN 0-471-35632-8](https://doi.org/10.1002/9781118133263).

ISMAIL, W. N. A. W. The Economic Burden of Candidemia and Invasive Candidiasis: A Systematic Review. **Value in Health Regional Issues**, v. 21, p. 53-58, May, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.vhri.2019.07.002>

KADOSH, D.; MUNDODI, V. A Re-Evaluation of the Relationship between Morphology and Pathogenicity in *Candida* Species. **J Fungi (Basel)**, v. 6, n. 1, p. 13. Jan., 2020. <https://doi.org/10.3390/jof6010013>

KHATURIA, S. et al. Multidrug-Resistant *Candida auris* Misidentified as *Candida haemulonii*: Characterization by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and DNA Sequencing and Its Antifungal Susceptibility Profile Variability by Vitek 2, CLSI Broth Microdilution, and Etest Method. **J Clin Microbiol**, v. 53, n. 6, p. 1823-1830, Jun., 2015. <https://doi.org/10.1128/jcm.00367-15>

KHOURI, S. et al. Evaluation of infections by *Candida* at a university hospital of Vale do Paraíba region, São Paulo State, Brazil: species distribution, colonization, risk factors and antifungal susceptibility. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 7, n. 2, p. 51-57, 2016. <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232016000200006>

KIM, S. H et al. Misidentification of *Candida guilliermondii* as *C. famata* among strains isolated from blood cultures by the VITEK 2 system. **Biomed Res Int.**, 2014:250408, May, 2015. <https://doi.org/10.1155/2014/250408>

KRONEN, R. et al. Creation and Assessment of a Clinical Predictive Calculator and Mortality Associated With *Candida krusei* Bloodstream Infections. **Open Forum Infectious Diseases** v. 5, n. 2, Feb., 2018. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx253>

KUBESOVA, A. et al. *Candida* “psilosis”—Electromigration techniques and MALDI-TOF mass spectrometry for phenotypical discrimination. **Analyst**, n. 137, p. 1937–1943, 2012. DOI: [10.1039/c2an15931g](https://doi.org/10.1039/c2an15931g)

LANDIS, J. R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, n. 33, v. 8, p. 159-174, Mar., 1977. <https://doi.org/10.2307/2529310>

LI W. S., et al. The Impact of Biofilm Formation on the Persistence of Candidemia. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, Jun., 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01196>

LIOTT, F. M. et al. Development of a Multiplex PCR Platform for the Rapid Detection of Bacteria, Antibiotic Resistance, and *Candida* in Human Blood Samples. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, 9:389, Nov., 2019. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00389>

MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P. G. Invasive candidiasis. **Infect Dis Clin North Am.**, v. 30, n. 1, p. 103-134, Mar., 2016. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.013>

MARCOS-ZEMBRANO, L. J. et al. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. Isolates causing fungemia: Comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. **Inter J Medical Microbiol.**, v. 304, p. 1192–1198, Aug., 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.08.012>

MARINS, T. A. et al. Evaluation of *Candida* bloodstream infection and antifungal utilization in a tertiary care hospital. **BMC Infectious Diseases**, 18:187, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3094-9>

MARTINEZ-GOMARIZ, M. et al. Proteomic analysis of cytoplasmic and surface proteins from yeast cells, hyphae and biofilms of *Candida albicans*.

Proteomics, v. 9, n. 8, p. 2230-2252, Apr., 2009.

<https://dx.doi.org/10.1002%2Fpmic.200700594>

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, Feb., 2013.

<https://dx.doi.org/10.4161%2Fviru.22913>

MEDEIROS, M. A. P. et al. Epidemiology and prognostic factors of nosocomial candidemia in Northeast Brazil: A six-year retrospective study. **PLOS ONE**, Aug., 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221033>

MELEADY, P. Two-dimensional gel electrophoresis and 2D-DIGE. *Methods Mol Biol.*, v. 1664, p. 3-14, 2018. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7268-5_1

MENEZES, R. P. et al. Frequency of *Candida* species in a tertiary care Hospital in Triangulo Mineiro, Minas Gerais state, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 57, n. 3, p. 185-191, May-Jun., 2015. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000300001>

MLYNÁRIKOVÁ, K. et al. Evaluation of Capacity to Detect Ability to Form Biofilm in *Candida Parapsilosis* Sensus Stricto Strains by MALDI-TOF MS. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 61, n. 6, p. 465-471, Apr., 2016.

<https://doi.org/10.1007/s12223-016-0458-7>

MONFREDINI, P.M et al. Clinical impact of *Candida* spp. biofilm production in a cohort of patients with candidemia. **Med Mycol.**, v. 56, n. 7, p. 803-808, Oct., 2018. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx133>

NET, J. E.; ANDES, D. R. Contributions of the Biofilm Matrix to *Candida* Pathogenesis. **J Fungi**, v.6, n. 1, Feb., 2020.

<https://dx.doi.org/10.3390/Fjof6010021>

Olivares E., Badel-Berchoux S., Provot C., Prévost G., Bernardi T., Jehl F. (2020). Clinical Impact of Antibiotics for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections. **Front Microbiol.** **9**,10:2894.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02894>

OTASEVIC, S. et al. Non-culture based assays for the detection of fungal pathogens. **J Micol Med.**, v. 2, n. 28, p. 236-248, Jun. 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.03.001>

OVIANO, M; RODRIGUES-SANCHES, B. MALDI-TOF mass spectrometry in the 21st century clinical microbiology laboratory. **Enferm Infecç Microbiol Clin.**, Apr., 2020. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.02.027>

PAPPAS, P.G. et al. Invasive candidiasis. **Nat Rev Dis Primers**, v. 11; n.4; May, 2018. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>

PATEL, R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. **Clin Chem.**, v. 61, n. 1, p. 100-111; Jan., 2015.

<https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.221770>

PFALLER, M. A. et al. Comparison of the Vitek 2 yeast susceptibility system with CLSI microdilution for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole against *Candida* spp., using new clinical breakpoints and epidemiological cutoff values. **Micology**. v. 77, n.1, p. 37-40, Set., 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.05.019>

PFALLER, M. A. et al. Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* Species From 1997–2016. **OFID**, n. 6, p.79-94, (Suppl 1), 2019. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy358>

PIERCE, C.G. et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nat Protoc.**, v. 9, n. 3, p.1494-1500, 2008 .

<https://doi.org/10.1038/nport.2008.141>

PIERCE, G. C. et al. The *Candida albicans* Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function. **J Fungi (Basel)**, v. 3, n. 1, Mar., 2017.

<https://doi.org/10.3390/jof3010014>

POTE, T. S., et al. Distribution of Pathogenic Yeasts in Different Clinical Samples: Their Identification, Antifungal Susceptibility Pattern, and Cell Invasion Assays. **Infect Drug Resist.**, v. 13, p. 1133-1145, Apr., 2020.

<https://doi.org/10.2147/idr.s238002>

POISSY, J. et al. Risk factors for candidemia: a prospective matched case-control study. **Critical Care**, v. 109, n. 24, p. 2-11, 2020.

<https://doi.org/10.1186/s13054-020-2766-1>

ROBERTO, A. E. M. et al. Rapid Detection of Echinocandins Resistance by MALDI-TOF MS in *Candida parapsilosis* Complex. **Microorganisms**. v. 13, n. 8, Jan., 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010109>

ROILIDES, E. et al. A Prospective, Open-label Study to assess the safety, tolerability and efficacy of anidulafungin in the treatment of invasive candidiasis in children 2 to <18 years of age. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 38, n. 3, p. 275-279; Mar., 2019. <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000002237>

ROILIDES, E. et al. Safety, Efficacy and Pharmacokinetics of Anidulafungin in Patients 1 Month to <2 Years of Age With Invasive Candidiasis, Including Candidemia. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 39, n. 4, p. 305-309; Apr., 2020.

<https://dx.doi.org/10.1097%2FINF.0000000000002568>

ROSNER, B. A. Fundamentals of biostatistics. 4 ed. Belmont: Duxbury Press; 1995. p. 426. ISBN-13: 978-0538733496

- SARDI, J. C. et al. Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Rev Iberoam Micol.**, v. 31, n.1, p. 22-29, Jan-Mar., 2014. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.09.014>
- STEFANIUK, E. et al. Usefulness of CHROMagar Candida Medium, Biochemical Methods--API ID32C and VITEK 2 Compact and Two MALDI-TOF MS Systems for *Candida* spp. Identification. **Pol J Microbiol.**, v. 1, n. 65, p. 111-114, 2016. <https://doi.org/10.5604/17331331.1197283>
- STEPANOVIC, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Apmis**, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- STEVENSON, L. G., et al. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Clinically Important Yeast Species. **J Clin Microbiol.**, v. 48, n. 10, p.3482-3486, Jun., 2010. <https://doi.org/10.1128/jcm.00687-09>
- TASHIRO, S. et al. Echinocandins versus non-echinocandins for the treatment of invasive candidiasis: A meta-analysis of randomized controlled trials. **J Inf Chemot.**, v. 26, n. 1, p. 1164-1167, Nov., 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2020.06.008>
- THOMAS, D. P; BACHMANN, S. P.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Proteomics for the analysis of the *Candida albicans* biofilm lifestyle. **Proteomics**, v. 21, n. 6, p. 5795-6804, Nov., 2006. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600332>
- THOMAZ, D. Y. et al. **Complexo Candida parapsilosis: identificação molecular das espécies, análise proteômica dos biofilmes por MALDI-TOF e investigação de um surto envolvendo isolados clínicos resistentes aos azólicos. (Tese doutorado)**– Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, p. 130, 2018. DOI: 10.11606/T.5.2019.tde-13022019-163819
- TODA, M. et al. Population-based active surveillance for culture-confirmed candidemia-four sites, United States, 2012–2016. **MMWR Surveill Summ.**, v. 68, n. 8, p. 1-15, Sep., 2019. <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6841a2>
- TSAY, S. V. et al. Burden of Candidemia in the United States, 2017. **Clin Infect Diseases**, Feb., 2020. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa193>
- TUMBARELLO, M. et al. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. **J Clin Microbiol.**, n. 45, v. 6, p. 1843-1850, Jun., 2007. <https://doi.org/10.1128/jcm.00131-07>
- VALLABHANENI, S. et al. Investigation of the First Seven Reported Cases of *Candida auris*, a Globally Emerging Invasive, Multidrug-Resistant Fungus–United States, May 2013–August 2016. **Am J Transplant.**, v. 17, n. 1, p. 296-299, Jan., 2017. <https://doi.org/10.1111/ajt.14121>

VITALIS E. et al. *Candida* biofilm production is associated with higher mortality in patients with candidaemia. **Mycoses**, 63, p. 352-360, Jan., 2020.

<https://doi.org/10.1111/myc.13049>

XIE, A. T. et al. Accuracy of matrix-assisted LASER desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of *Candida*. **Biosci Rep.**, v. 39, n. 10, BSR20190859, Oct., 2019. <https://doi.org/10.1042/BSR20190859>

XIAO, Z. et al. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and mortality risk factors of candidemia among critically ill patients: a retrospective study from 2011 to 2017 in a teaching hospital in China. **Antimicrob Resist Infect Control.**, n. 8, v. 89, May, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0534-2>

Wan Ismail W.N.A., Jasmi N., Khan T.M., Hong Y.H., Neoh C.F.(2020). The Economic Burden of Candidemia and Invasive Candidiasis: A Systematic Review. *Value Health Reg Issues* **21**, 53-58.

<https://doi.org/10.1016/j.vhri.2019.07.002>

WANG, Y. et al. Antifungal agents for invasive candidiasis in non-neutropenic critically ill adults: What do the guidelines recommend? **International Journal of Infectious Diseases**, v. 89, p. 137-145, Nov., 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.10.016>

WHALEY, S. G. et al. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans Candida* Species. **Front Microbiol.**, v. 7, p. 2173, Jan., 2017. <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.02173>

WELSH, R. M. et al. Survival, Persistence and Isolation of Emerging Multidrug-Resistant Pathogenic Yest *Candida auris* on a plastic healthy care surface. **J Clin Microbiol.**, v. 55, n. 10, p. 2996-3005, Oct., 2017.

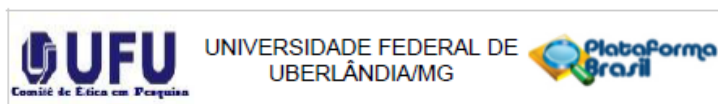
<https://doi.org/10.1128/jcm.00921-17>

ZHAO, Y. et al. Yeast identification by sequencing, biochemical kits, MALDI-TOF MS and rep-PCR DNA fingerprinting. **Med Mycol.**, v. 56, n. 7, p. 816-817, Oct., 2018.

<https://doi.org/10.1093/mmy/myx118>

6. ANEXOS

6.1- Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-UFU)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Candidemia em hospital universitário do Triângulo Mineiro: Estudo prospectivo

Pesquisador: Paula Augusta Dias Fogaça de Aguiar

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 65341817.0.0000.5152

Instituição Proponente: HOSPITAL DE CLINICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLANDIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.062.162

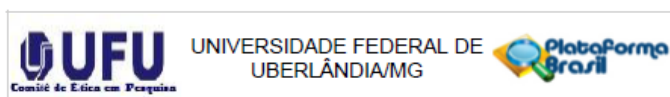
Apresentação do Projeto:

Trata-se de resposta às pendências apontadas no parecer consubstanciado número 1.990.235, de 29 de Março de 2017.

De acordo com o descrito no projeto, trata-se de um estudo prospectivo observacional, do tipo caso controle, que será realizado com 300 participantes, pacientes internados no HC da UFU. Para o grupo "caso" serão incluídos todos os pacientes com infecção de corrente sanguínea causada por *Candida* spp. durante o período de Julho de 2017 a Junho de 2019.

Para o grupo "controle" serão incluídos pacientes internados no HC no mesmo período dos "casos" porém sem processo infeccioso. Serão incluídos dois controles para cada caso. Nos prontuários dos participantes serão obtidos dados epidemiológicos (como sexo, idade, procedência, profissão, medicamentos de uso crônico) e condições clínicas (como doença de base, estado imunológico, tempo de internação, uso de antimicrobianos de amplo espectro e outros fatores de risco para o desenvolvimento de candidemia). Os pacientes interessados em participar do estudo, ou seus representantes legais, assinarão o TCLE.

Critério de INCLUSÃO para o grupo - caso: Serão incluídos todos os pacientes internados no HCU que apresentarem infecção de corrente sanguínea por *Candida* spp. durante o período proposto



Continuação do Parecer: 2.062.162

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CANDIDEMIA_grupo_caso.doc	15:31:13	Fogaça de Aguiar	Aceito
Outros	FICHA_DADOS_CANDIDEMIA.docx	30/03/2017 15:14:07	Paula Augusta Dias Fogaça de Aguiar	Aceito
Outros	links_curriculos.doc	30/03/2017 14:43:26	Paula Augusta Dias Fogaça de Aguiar	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Compromisso_Equipe_Executiva.pdf	14/02/2017 14:06:02	Paula Augusta Dias Fogaça de Aguiar	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERLANDIA, 14 de Maio de 2017

Assinado por:
Sandra Terezinha de Farias Furtado
(Coordenador)

7- APÊNDICES

7.1- Ficha para coleta de dados dos pacientes

FICHA PARA ANÁLISE DE PRONTUÁRIOS

Paciente (iniciais do nome):

Ident. no projeto (n^o):

Sexo M F

Idade

Procedência

Zona Urbana Zona Rural Município:

Profissão

Medicamentos de uso crônico (previamente à internação)

Causa da internação

Setor do Hospital em que ocorreu a internação

Quadro Clínico

Queixas (sinais e sintomas no diagnóstico)

Tempo de internação

Suspeita clínica

SIM Não

Após quanto tempo de internação aconteceu o diagnóstico de candidemia

Hemocultura coletada em

Veia periférica Cateter

Cateteres Não SIM. Qual?

Vascular periférico Vascular central Vesical Outros

Tempo de uso de cateter

Nutrição parenteral Não Sim**Ventilação mecânica** Não Sim**Cirurgia abdominal** Não Sim**Sonda em trato digestivo** Não Sim**Manipulação cirúrgica de vias urinárias** Não Sim**Estado Imunológico** Imunocompetente Imunodeprimido

Qual doença de base?

Se AIDS:

Carga viral: Não se aplica < 50 cópias de RNA/mL
 <10.000 cópias de RNA/mL 10.000 a 100.000 cópias de RNA/mL
 > 100.000 cópias de RNA/mL

Contagem de CD4: Não se aplica ≤ 200 cels./mm³ 200 a
 350 cels./mm³ 351 a 499 cels./mm³ ≥ 500 cels./mm³

Tratamento Antifúngico Não Sim Antifúngico: _____

Duração do Tratamento

Quanto tempo após o diagnóstico da Candidemia (após a liberação do Gram)

Evento adverso com o tratamento antifúngicos Não Sim Qual _____**Uso de antifúngico previamente à infecção** Não Sim Qual _____

Duração do tratamento

Uso de antibioticoterapia de largo espectro previamente à infecção Não Sim Qual _____

Duração do tratamento

Candida spp. identificada em outro sítio

Não Sim Qual _____

Infecções por outros Microorganismos

Não Sim Micro-organismo: _____

Concomitante à candidemia

Não Sim

Evolução da doença

Cura Óbito

Após quanto tempo do diagnóstico

Recidiva

Não Sim