

DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA ÀS EQUINOCANDINAS DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Candida parapsilosis strictu sensu*, *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis* ATRAVÉS DE ESPECTOMETRIA DE MASSAS

Isabelle Fumiko Tanaka¹; Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto²

¹Estudante do Curso de Biomedicina-CCS/CCB – UFPE; E-mail: isabelletanaka2@gmail.com

²Docente/pesquisador do Depto de Medicina Tropical – CCS/CCB –UFP; E-mail:

goncalves_reginaldo@hotmail.com

Sumário: Candidemia ou candidíase hematogênica ocupa a quarta causa mais comum de infecção hospitalar no mundo (ARENDRUP et al., 2005). Dentre as *Candida não-albicans*, *C. parapsilosis* tem emergido nos últimos anos, sendo um isolado comum em casos de candidemia. O uso de sondas e cateteres tem sido relacionado ao aumento das infecções, uma vez que esta espécie possui grande capacidade de produzir biofilme. Adequada conduta laboratorial através de exame direto e cultura, auxiliam no diagnóstico clínico e tratamento. Entretanto, esses procedimentos estão sendo complementados por métodos genômicos e proteômicos como estratégia de diagnóstico rápido.

Palavras-chave: *Candida parapsilosis*; equinocandinas; MALDI-TOF MS; resistência antifúngica.

INTRODUÇÃO

A técnica de MALDI-TOF MS é bastante confiável para a identificação de fungos até ao nível de espécie, e já está auxiliando os laboratórios de microbiologia médica a reduzir custos, bem como minimizar a emergência de isolados resistentes aos antifúngicos comercialmente disponíveis (SANTOS et al., 2010). O objetivo principal do presente estudo é detectar de maneira rápida e reprodutível a resistência antifúngica em isolados clínicos de *Candida parapsilosis*, propondo um novo processo metodológico que seja promissor e resolutivo no auxílio da escolha terapêutica pelos profissionais médicos para os pacientes críticos, além de contribuir com o avanço dos estudos proteômicos atuais.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado entre agosto de 2014 e julho de 2015 nas Unidades de Terapia Intensiva do Hospital Agamenon Magalhães e Hospital das Clínicas, ambos do Estado de Pernambuco. Três amostras de sangue venoso foram coletadas em dias consecutivos, assepticamente em tubos Vacutainer® com EDTA e depois, acondicionadas em tubos contendo meio Brain Heart Infusion-BHI para diagnóstico laboratorial micológico. As amostras foram semeadas em duplicata na superfície do meio ágar Sabouraud (DIFCO) com 50 mg/L de clorafenicol em placas de Petri, mantidas à temperatura de 30° C e 37° C por até 15 dias. Após o surgimento das colônias, estas foram purificadas e identificadas pela técnica de MALDI-TOF MS. Proteínas adquiridas pela Bruker que contém picos específicos foram utilizadas como calibrante.

Para análise dos isolados no MALDI-TOF MS uma quantidade significativa de cada isolado foi transferida com alça para eppendorfs com 300 µL de água, foram levadas ao vortex e adicionado 900 µL de etanol em cada amostra e novamente levadas ao vortex. As amostras foram centrifugadas em velocidade máxima durante dois minutos e o etanol foi retirado com a pipeta e 20 µL de ácido fórmico a 70% foi adicionado às amostras que passaram pelo vórtex onde 20 µL de acetonitrila a 100% foi adicionado sendo novamente

levadas ao vortex e centrifugadas por dois minutos em velocidade máxima. Depois, 1 µL do sobrenadante foi colocado sobre os anéis da placa em duplicata, que, secaram naturalmente e posteriormente, 1µL da matrix (CHCA) foi adicionada na placa. A planilha de identificação com o desenho da placa foi devidamente preenchida nos respectivos espaços das amostras. A lista de picos obtidos foi exportada ao software Biotyper™ (Biotyper system, versão 3.0). As identificações através do Biotyper™ são baseadas apenas na presença ou ausência de cada pico do espectro (Biotyper Solution Preparation).

O teste de sensibilidade antifúngica *in vitro* foi realizado de acordo com as publicações M27-A3 e M27-S4 do Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2008; CLSI 2014).

Para determinação da resistência pelo MALDI-TOF MS os isolados de *Candida parapsilosis* foram avaliados frente às equinocandinas como descrito por Vella et al., (2013), com pequenas modificações. Os extratos protéicos fúngicos foram preparados a partir de inóculos na concentração de 10⁷ UFC/mL em caldo RPMI, contendo diluições em série de caspofungina, anidulafungina e micafungina em intervalos de 64–0,007 µg/mL, a 37 °C sob agitação de 15 horas. Então, as células fúngicas foram lavadas duas vezes com água estéril (900 µL) e re-suspendido em 10% (vol/vol) de ácido fórmico (20-50 µL). Um µL de cada suspensão de células foi diretamente alicotado em duplicata sobre os anéis da placa de aço polido deixando secar em condições naturais. Foi adicionado em seguida 0,5 µL de etanol absoluto e 1 µL de solução saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) em 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoroacético. Após secagem da placa, espectros foram obtidos entre 2.000 e 8.000 m/z.

A ferramenta do MALDI Biotyper nomeada Índice de Correlação de Composto (ICC) será utilizada como método estatístico para analisar a relação entre os espectros. A composição de correlações cruzadas e auto correlações de todos os intervalos, em termos de médias geométricas, será utilizada como parâmetro de distância entre os espectros. Valores de ICC próximo a um representa elevada conformidade de espectros, enquanto que valores ao redor de zero indica uma clara diversidade entre os espectros (Vella *et al.*, 2013).

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram diagnosticados 38 pacientes com isolados clínicos de *Candida* a partir da hemocultura, os quais foram identificados por MALDI-TOF MS, onde 26 (71%) dos isolados foram de *Candida parapsilosis*, sete (18,4%) *Candida albicans*, dois (5,2%) *Candida tropicalis*, um (2,6%) *Candida glabrata* e um (2,6%) *Candida haemulonii*.

As espécies mais isoladas foram *Candida parapsilosis* e *Candida albicans*. O aumento da espécie de *Candida parapsilosis*, corrobora com a literatura mostrando que a transmissão exógena, por dispositivos médico-hospitalares, além da transmissão pelos profissionais de saúde é um fator de preocupação, sendo a *Candida parapsilosis* umas das principais formadoras de biofilme, o que dificulta a instituição terapêutica eficaz e em

muitos casos a cepa torna-se resistente a determinados fármacos. No complexo *Candida parapsilosis*, não houve identificação de *Candida orthopsilosis* ou *Candida metapsilosis* pelo MALDI-TOF, embora, trabalhos relatem que estas representam cada uma 1-10% das infecções/colonizações atribuídas a *Candida parapsilosis* (Lockhart et al, 2008; Tavanti et al, 2007).

O perfil de susceptibilidade de cada espécie de *Candida parapsilosis* frente às drogas anidulafungina, caspofungina e micafungina permitiu a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a categorização dos isolados em sensível, intermediário ou resistente. Dos 27 isolados testados, quase todos foram considerados sensíveis às equinocandinas, excetuando o isolado 474 que demonstrou perfil intermediário a micafungina com CIM de 4 µg/mL e o isolado 451 que apresentou-se resistente a droga caspofungina com CIM de 8 µg/ML, como sumarizado na Tabela 1.

Amostras	Espécies isoladas	MICs (µg/mL)		
		Anidulafungina Micafungina	Caspofungina	
346 A	<i>C.parapsilosis</i>	0.25 (S)	0.25 (S)	2 (S)
346 B	<i>C.parapsilosis</i>	0.25 (S)	0.25 (S)	2 (S)
474	<i>C.parapsilosis</i>	0.5 (S)	0.5 (S)	4 (I)
595	<i>C.parapsilosis</i>	0.25 (S)	0.25 (S)	1 (S)
596 A	<i>C.parapsilosis</i>	0.25 (S)	0.25 (S)	0.5 (S)
596 B	<i>C.parapsilosis</i>	0.25 (S)	0.25 (S)	0.5 (S)
451	<i>C.parapsilosis</i>	0.5 (S)	8(R)	<0.03125 (S)
122	<i>C.parapsilosis</i>	0.125 (S)	0.25 (S)	0.125 (S)
6085	<i>C.parapsilosis</i>	0.25 (S)	0.5 (S)	1(S)
12680	<i>C.parapsilosis</i>	0.0625 (S)	0.5 (S)	0.0625 (S)
9968	<i>C.parapsilosis</i>	0.25 (S)	1(S)	0.5 (S)
653	<i>C.parapsilosis</i>	0.125 (S)	1 (S)	0.25 (S)
02/09	<i>C.parapsilosis</i>	0.25 (S)	0.0625 (S)	0.25(S)
04/09	<i>C.parapsilosis</i>	0.25 (S)	0.25(S)	0.25 (S)
05/09	<i>C.parapsilosis</i>	0.25 (S)	0.25 (S)	0.25 (S)
121	<i>C.parapsilosis</i>	0.25 (S)	0.0125 (S)	0.0125 (S)
445	<i>C.parapsilosis</i>	0.0125 (S)	0.25 (S)	0.25 (S)
5283	<i>C.parapsilosis</i>	0.0125 (S)	0.0625 (S)	0.25 (S)
5551	<i>C.parapsilosis</i>	0.5 (S)	0.0125 (S)	0.0125 (S)
7398	<i>C.parapsilosis</i>	0.03125 (S)	<0.03125 (S)	<0.03125 (S)
7491	<i>C.parapsilosis</i>	0.03125 (S)	0.03125 (S)	0.03125 (S)
7736	<i>C.parapsilosis</i>	0.25 (S)	0.0625 (S)	0.25 (S)
7755	<i>C.parapsilosis</i>	0.03125 (S)	0.03125 (S)	0.03125 (S)

13477	<i>C.parapsilosis</i>	0.03125 (S)	0.03125 (S)	0.03125 (S)
13531	<i>C.parapsilosis</i>	0.03125 (S)	0.03125 (S)	0.03125 (S)
14495	<i>C.parapsilosis</i>	0.0625 (S)	0.03125 (S)	0.25 (S)
ATCC 22019	<i>C.parapsilosis</i>	0.125 (S)	1 (S)	0.25 (S)

Tabela 1. MICs dos isolados de *Candida parapsilosis* do teste de sensibilidade antifúngica frente às equinocandinas.

As correlações entre as CIM e os espectros proteicos das leveduras após 15 horas de exposição aos antifúngicos demonstraram concordância superior a 90%, sendo mais reprodutível para anidulafungina. Embora os resultados sejam promissores, existe necessidade de aprimoramento da metodologia na redução do tempo de exposição, controles de qualidades e em definições de zonas indeterminadas no mapa de calor.

CONCLUSÕES

Diante do exposto, é observado que nossos resultados estão de acordo com a literatura, mostrando que a maioria das leveduras do gênero *Candida parapsilosis* foram sensíveis as equinocandinas. A utilização do MALDI-TOF MS para identificação de fungos vem sendo ampliada com sucesso para realização de testes de susceptibilidade antifúngica, mostrando que ela pode ser incorporada com sucesso na micologia clínica. Isso beneficiará pacientes em Unidades de Terapia Intensiva através da redução da morbimortalidade, o tempo de internação bem como gastos com procedimentos diagnósticos e terapêuticos. É necessária atenção especial ao complexo *Candida parapsilosis*, seja pelo aumento na incidência de casos, pela capacidade de produzir biofilme ou pela susceptibilidade aos antifúngicos disponíveis.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a PROPESQ pela concessão da bolsa, a Mestranda Ana Emília e a Técnica do CETENE Júlia Campos pelo auxílio, ao Laboratório de Micologia Médica da UFPE e o CETENE pela infraestrutura e aos pacientes que participaram da pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ARENDRUP, M. C.; FUURSTED, K.; GAHRN-HANSEN, B.; et al. (2005). Seminal surveillance of fungemia in denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azoly susceptibility. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.4434-4440.
- LOCKHART, S.R., MESSER, S.A., PFALLER, M.A., DIEKMA, D.J., (2008). Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, 2659–2664.
- TAVANTI, A., HENSGENS, L.A., GHELARDI, E., CAMPA, M., SENESI, S., (2007). Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. **Jornal of Clinical Microbiology**, v.45, 1455–1462.
- VELLA, A.; CAROLIS, E.; FLORIO, A.R.; POSTERARO, P.; PERLIN, D.S.; SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B. (2012). Use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOFMS) for caspofungin susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* species. **Journal of Clinical Microbiology**. v.50:2479–2483.

