

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PATRICIA FERNANDA HERKERT

SUSCETIBILIDADE “in vitro” E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LEVEDURAS
DO GÊNERO *Candida* ISOLADAS DE PACIENTES COM CANDIDEMIA

CURITIBA
2014

PATRICIA FERNANDA HERKERT

SUSCETIBILIDADE “in vitro” E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LEVEDURAS
DO GÊNERO *Candida* ISOLADAS DE PACIENTES COM CANDIDEMIA

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, Área de
concentração em Microbiologia,
Departamento de Patologia Básica, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná, como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Flávio de Queiroz-Telles
Co-orientadora: Profa. Dra. Vânia Aparecida
Vicente

CURITIBA
2014

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Herkert, Patricia Fernanda

Suscetibilidade “in vitro” e caracterização molecular de leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes com candidemia. / Patricia Fernanda Herkert. – Curitiba, 2014.
85 f.: il. ; 30cm.

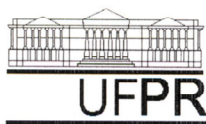
Orientador: Flávio Queiroz-Telles

Co-orientadora: Vânia Aparecida Vicente

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. *Candida*. 2. Candidemia. 3. Antifúngicos. I. Título II. Queiroz-Telles, Flávio. III. Vicente, Vânia Aparecida. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 574.2



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**“SUSCETIBILIDADE “in vitro” E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida* ISOLADAS
DE PACIENTES COM CANDIDEMIA”.**

Por

PATRÍCIA FERNANDA HERKERT

**Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos
professores:**

Prof. Dr. Flávio de Queiroz Telles Filho (presidente)

Profª. Drª. Vânia Aparecida Vicente

Profª. Drª. Gilda Maria Barbaro Del Negro

Drª. Renata Rodrigues Gomes

Curitiba, 19 de março de 2014.

Dedico este trabalho às pessoas mais incríveis que tenho em minha vida, meus pais NELCI e HILÁRIO E. HERKERT, que a cada dia me ensinam a ser uma pessoa melhor, não desistir dos meus objetivos e sonhos. Amo vocês.

Muito obrigada por estarem ao meu lado nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à DEUS por me amparar, dar força, sabedoria e coragem para vencer mais uma etapa em minha vida.

Agradeço meus PAIS por sempre apoiarem minhas escolhas e permitirem que eu siga meu caminho.

Agradeço meus irmãos, JANDREI e PEDRO, que me incentivam a estudar e conquistar meu espaço.

Agradeço ao ANDERSON por não me deixar desistir diante das dificuldades.

Agradeço aos AMIGOS pelo apoio e carinho quando preciso de cuidado.

Agradeço aos COLEGAS de laboratório pelos ensinamentos do dia-a-dia e por estarem sempre prontos para ajudar.

Agradeço aos meus orientadores Dr. FLÁVIO DE QUEIROZ TELLES e Dra. VÂNIA APARECIDA VICENTE por aceitarem me orientar no mestrado e dividirem esta conquista comigo. Espero que possamos continuar trabalhando juntos.

Agradeço à CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Muito obrigada à todos vocês por me ajudarem a realizar mais este sonho em minha vida.

RESUMO

As leveduras do gênero *Candida* representam uma das principais causas de infecção da corrente sanguínea de origem nosocomial. A candidemia tem como principais fatores de risco: nutrição parenteral, permanência na UTI, neutropenia, diabetes, cirurgia abdominal e uso de cateter venoso central. Os antifúngicos mais utilizados para o tratamento da candidemia são as equinocandinas, mas existem relatos de isolados resistentes a estes medicamentos. Este trabalho se propõe a caracterizar por meio de marcadores moleculares isolados clínicos do gênero *Candida* obtidos de pacientes com candidemia, assim como, identificar a suscetibilidade destes à antifúngicos. A caracterização molecular foi realizada por sequenciamento das regiões ITS e D1/D2 do rDNA e os testes de suscetibilidade aos antifúngicos “in vitro” foram realizados pelo método de microdiluição de acordo com o estabelecido pelo CLSI/2008. O total de 80 isolados caracterizados geneticamente eram pertencentes às espécies *C. albicans* (27), *C. parapsilosis* (22), *C. glabrata* (8), *C. tropicalis* (7), *C. guilliermondii* (5), *C. krusei* (3), *C. pelliculosa* (3), *C. lusitaniae* (2), *C. metapsilosis* (1) e *C. orthopsilosis* (1). Quanto à suscetibilidade, observou-se que a espécie *C. glabrata* apresentou o maior número de linhagens com perfil de resistência frente aos antifúngicos testados, sendo 05 resistentes à micafungina e suscetibilidade intermediária à anidulafungina e 07 com suscetibilidade dose-dependente ao fluconazol. A espécie *C. albicans* foi a mais suscetível, onde foi verificado apenas 01 linhagem resistente ao fluconazol. Entre o Complexo Parapsilosis, 05 linhagens da espécie *C. parapsilosis* apresentaram suscetibilidade intermediária à micafungina. As demais linhagens estudadas foram suscetíveis aos antifúngicos testados. De acordo com os resultados concluiu-se que a caracterização molecular e a determinação do perfil de suscetibilidade “in vitro” de isolados clínicos de leveduras do gênero *Candida* têm um papel importante no direcionamento do tratamento de episódios de candidemia e na identificação da epidemiologia da doença.

Palavras-chave: *Candida*, candidemia, suscetibilidade, antifúngico.

ABSTRACT

The yeasts of genus *Candida* are the main cause of hospital acquired bloodstream infections. The main risk factors of candidemia are: parenteral nutrition, long-term stays at Intensive Care Units, neutropenia, diabetes, abdominal surgery and the use of central venous catheter. The most commonly used antifungal agents for the candidemia treatment are echinocandins, but there are reports of isolates resistant to these drugs. This study aims to describe clinical isolates of *Candida* obtained through patients with candidemia by applying molecular markers, along with its susceptibility to antifungal agents. The molecular characterization was performed by sequencing the ITS and D1/D2 regions of the rDNA, and the tests for susceptibility towards antifungals "in vitro" proceeded based on the microdilution method, in accordance with the CLSI/2008. The total of 80 described isolates were part of the species *C. albicans* (27), *C. parapsilosis* (22), *C. glabrata* (8), *C. tropicalis* (7), *C. guilliermondii* (5), *C. krusei* (3), *C. pelliculosa* (3), *C. lusitaniae* (2), *C. metapsilosis* (1) e *C. orthopsilosis* (1) species. Concerning the susceptibility, it was observable that the *C. glabrata* presented a larger proportion of strains resistant to the tested antifungal agents, in which 05 were resistant to micafungin and partially resistant to anidulafungin, and 07 susceptible dose-dependent of fluconazole. The *C. albicans* was the most susceptible species, since only 01 strain was resistant to fluconazole. Between the Parapsilosis Complex, 05 strains of the *C. parapsilosis* species presented partial susceptibility towards micafungin. The remaining studied strains were susceptible to the tested antifungal agents. According to the results, it is possible to conclude that the molecular characterization and the determination of the "in vitro" susceptibility profile of clinical isolates of yeasts of *Candida* species have a crucial role on guiding the treatment of candidemia and identifying the disease epidemiology.

Keywords: *Candida*, candidemia, susceptibility, antifungal.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1-** ÁRVORE FILOGENÉTICA DE MAXIMUM LIKELIHOOD BASEADA NO ALINHAMENTO DAS REGIÕES ITS E 5,8S DO rDNA, CONSTRUÍDO COM 1000 REPETIÇÕES, USANDO O MODELO EVOLUTIVO TAMURA 3-PARAMETROS COM DISTRIBUIÇÃO GAMA, USANDO O PROGRAMA MEGA VERSÃO 5.1. *Neurospora crassa* (MYA-4619) FOI UTILIZADO COMO GRUPO EXTERNO. A/B: GENÓTIPO DE *C. albicans*. *ISOLADOS COM ALTERAÇÃO NO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE. T: “TYPE STRAIN”. VERMELHO: ISOLADOS COM IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DISCORDANTE DA FENOTÍPICA 51
- FIGURA 2-** ÁRVORE FILOGENÉTICA DE MAXIMUM LIKELIHOOD BASEADA NO ALINHAMENTO DA REGIÃO D1/D2 DO rDNA, CONSTRUÍDA COM 1000 REPETIÇÕES, USANDO O MODELO EVOLUTIVO TAMURA-NEI COM DISTRIBUIÇÃO GAMA, USANDO O PROGRAMA MEGA VERSÃO 5.1. *Neurospora crassa* (FGSC 8771) FOI UTILIZADO COMO GRUPO EXTERNO. T: “TYPE STRAIN”. VERMELHO: ISOLADOS COM IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DISCORDANTE DA FENOTÍPICA 52
- FIGURA 3-** GENOTIPAGEM DOS ISOLADOS DE *Candida albicans* PELO SISTEMA ABC 53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ISOLADOS REFERÊNCIA UTILIZADOS NA ANÁLISE FILOGENÉTICA	39
TABELA 2 - ISOLADOS CLÍNICOS UTILIZADOS NO ESTUDO.....	41
TABELA 3 - DADOS DEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES DOS DOIS GRUPOS ABORDADOS	46
TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>Candida</i> * ISOLADAS DE SANGUE DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA DOS PACIENTES	47
TABELA 5 - COMPARAÇÃO DOS DADOS DEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES E DADOS MICROBIOLÓGICOS DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i> EM DIFERENTES PERÍODOS.....	48
TABELA 6 - ISOLADOS QUE APRESENTARAM DISCORDÂNCIA ENTRE A IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA COM A IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	48
TABELA 7 - VARIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS ($\mu\text{g/mL}$) OBTIDAS DE ACORDO COM A ESPÉCIE DE <i>Candida</i> TESTADA.....	54
TABELA 8 - COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA REALIZADA COM EQUINOCANDINAS FORMULAÇÃO COMERCIAL E ANTIFÚNGICO PADRÃO	56
TABELA 9 - CORRELAÇÃO ENTRE OS DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES E O PERFIL DE SUSCETIBILIDADE “IN VITRO” DOS ISOLADOS TESTADOS.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

AFLP – “Amplified Fragment Length Polymorphism”

ALS – “Agglutinin-Like Sequence”

AMB – “amphotericin B”

AND - anidulafungina

ATCC – “American Type Culture Collection”

ATP - adenosina trifosfato

BDA - Ágar Batata Dextrose

BHI – “Brain Heart Infusion”

°C - graus Celsius

cAMP - Adenosina 3,5-monofosfato cíclico

cAMP-PKA – AMP cíclico-dependente “protein kinase A”

CBS – “Centraalbureau Schimmelcultures”

CIA - Clorofórmio-álcool isoamílico

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI – “Clinical and Laboratory Standards Institute”

CSP - caspofungina

CTAB – “hexa decyltrimethylammonium bromide”

DMSO – Dimetil Sulfóxido

DNA – “Deoxyribonucleic Acid”

ECE – “extent of cell elongation 1”

EPA – “anthrax protective antigen”

ERG – “ETS-related gene”

EUA - Estados Unidos da América

FKS – “glucan synthase gene”

FLU – fluconazol

g – gramas

GCPSR – “Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition”

HC – Hospital de Clínicas

HWA – “hyphal wall protein”
HIV – “Human Immunodeficiency Virus”
I – suscetibilidade intermediária
IFF/HYR – “IPF family F/hyphally upregulated protein”
ITS – “Internal Transcribed Spacer”
Kb – Quilo base
LabMicro – Laboratório de Microbiologia
MAPK – “mitogen-activated protein kinase”
MCF – micafungina
MLEE – “Multilocus Enzyme electrophoresis”
MLP – “Microsatellite Length Polymorphism”
MLST – “Multilocus Sequence Typing”
mg – miligrama
min - minuto
mL – mililitro
NCBI – “National Center for Biotechnology Information”
nm – nanômetro
pb – pares de base
PL – “phospholipases”
PCR – “Polimerase Chain Reaction”
PFGE – “Pulsed-Field Gel Electrophoresis”
pH – Potencial Hidrogeniônico
R – resistente/resistência
RAPD – “Random Amplified Polymorphism DNA”
RFLP – “Restriction Fragment Length Polymorphism”
RPB1/2 – “RNA Polymerase II subunit 1/2”
rDNA – “Ribosomal Deoxirribonucleic Acid”
S – suscetibilidade/suscetível
SAP – “secreted aspartyl proteinases”
SDD – suscetibilidade dose-dependente
seg – segundo

TSB – “trypticase soy broth”

UFPR - Universidade Federal do Paraná

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

μL - microlitro

μM – micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i>	17
3.1.1 Fatores de virulência	21
3.1.2 Isolamento e Identificação Fenotípica	23
3.1.3 Identificação molecular	25
3.2 CANDIDEMIA	30
3.2.1 Epidemiologia	31
3.2.2 Diagnóstico	32
3.2.3 Tratamento	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 DESENHO DO ESTUDO	38
4.2 LINHAGENS UTILIZADAS	38
4.3 REVITALIZAÇÃO E CULTIVO DAS LINHAGENS	40
4.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	40
4.4.1 Análise filogenética e construção da árvore filogenética	42
4.4.2 GENOTIPAGEM DE <i>Candida albicans</i> – SISTEMA ABC	43
4.5 TESTE DE MICRODILUIÇÃO	43
4.5.2 Preparo do inóculo	44
4.5.3 Teste de microdiluição e Concentração Inibitória Mínima	44
5 RESULTADOS	46
5.1 EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS	46
5.2 SUSCETIBILIDADE “in vitro”	53
5.2.1 Isolados de <i>Candida</i> resistentes	56
6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICE	79
ANEXOS	81

1 INTRODUÇÃO

Entre os fungos de interesse médico, as leveduras do gênero *Candida* são de grande importância devido à alta frequência de colonização e infecção em hospedeiros humanos (COLOMBO *et al.*, 2012). São micro-organismos com características comensais que podem estar presentes na microbiota humana em diversos sítios anatômicos como pele, mucosa bucal, trato gastrointestinal e geniturinário (GALARZA, 2009). Em condições normais, a maioria não causa danos ao seu hospedeiro, mas pode apresentar características patogênicas quando os mecanismos de defesa do hospedeiro estão debilitados, favorecendo a invasão de tecidos e a produção de infecções sistêmicas (PEREZ; KUMAMOTO; JOHNSON, 2013).

As infecções por *Candida* representam cerca de 80% do total de infecções fúngicas de corrente sanguínea, trato urinário e infecções de sítio cirúrgico (COLOMBO *et al.*, 2012). As infecções de corrente sanguínea causadas por *Candida* são conhecidas também como candidemia, as quais apresentam alta prevalência, morbidade e mortalidade (MONTAGNA *et al.*, 2011) e geram um profundo impacto econômico devido à exigência de hospitalização prolongada, cuidados intensivos e longos tratamentos farmacológicos (OLAECHEA *et al.*, 2004).

A incidência de candidemia nos hospitais brasileiros é de 1,38 episódios para cada 1.000 admissões (NUCCI *et al.*, 2013a) com taxa de mortalidade chegando a 54% (COLOMBO *et al.*, 2006). As doenças frequentemente associadas são câncer, neutropenia, cirurgia (principalmente abdominal), ventilação mecânica, diálise, nutrição parenteral e uso de cateter venoso central (COLOMBO *et al.*, 2006).

No Brasil a espécie *C. albicans* representa o agente causador mais comum das infecções fúngicas de corrente sanguínea, seguida de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Espécies como *C. intermedia*, *C. haemulonii*, *C. lusitaniae*, *C. famata* e *C. norvegensis* são observadas com menor frequência (NUCCI *et al.*, 2013a).

As diferenças na epidemiologia e na abordagem terapêutica para as diferentes espécies de *Candida* justificam a necessidade da identificação da espécie causadora da doença. Essas informações são essenciais não somente para a definição da terapêutica, mas também para o controle de infecções hospitalares. A

realização de testes de suscetibilidade constitui medida necessária para o conhecimento e monitoramento do perfil de suscetibilidade às diferentes drogas antifúngicas nas mais diversas instituições hospitalares (COLOMBO *et al.*, 2012).

O presente trabalho teve como objetivo verificar mudanças na epidemiologia da candidemia em dois períodos de estudo (2001-2004 e 2005-2012), o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos e a caracterização molecular de isolados de leveduras do gênero *Candida* obtidos do Hospital de Clínicas/UFPR e de hospitais terciários de Curitiba-PR.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar mudanças na epidemiologia da candidemia em dois períodos de estudo (2001-2004 e 2005-2012), caracterizar molecularmente e avaliar o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos de leveduras do gênero *Candida* obtidos de episódios de candidemia do Hospital de Clínicas/UFPR e de hospitais terciários de Curitiba-PR, no período de Janeiro de 2005 a Junho de 2012.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar e comparar os dados epidemiológicos de candidemia em dois períodos distintos (2001-2004 e 2005-2012);
- Caracterizar molecularmente os isolados clínicos de diferentes espécies de *Candida* mediante sequenciamento das regiões ITS e D1/D2 do rDNA;
- Realizar testes de suscetibilidade “in vitro” de isolados clínicos do gênero *Candida* aos antifúngicos fluconazol, anfotericina B, micafungina e anidulafungina.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*

O filo Ascomycota é composto por três grandes grupos de fungos: Eufungi, Archiascomycetes e Hemiascomycetes (DIEZMANN *et al.*, 2004). O gênero *Candida* compreende os estágios assexuados (anamórficos) da levedura, é pertencente ao grupo dos Hemiascomycetes. Os estágios sexuais (teleomórficos) são classificados de acordo com as estruturas dos ascósporos produzidos e pertencem aos gêneros *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Hansenula* e *Pichia*, que estão distribuídos na Família Saccharomycetaceae; *Clavispora* e *Metschnikowia* distribuídos na família Metschnikowiaceae (DANIEL *et al.*, 2001).

Estas leveduras podem ser encontradas em diversos substratos, tais como solo, plantas, animais e humanos. Quanto ao metabolismo, são classificadas como heterotróficas, aeróbicas e fermentadoras, podendo ainda suportar condições de microaerofilia (GUARRO *et al.*, 2000). São micro-organismos com características comensais podendo estar presentes na microbiota humana distribuídos na pele, mucosa bucal, faringe, trato gastrointestinal e geniturinário (GALARZA, 2009).

Sob condições que favoreçam sua intensiva multiplicação podem tornar-se patogênicas ocasionando doenças denominadas oportunistas. Estas doenças podem desenvolver-se de forma superficial acometendo pele e mucosas ou sistêmicas, invadindo a corrente sanguínea e órgãos (MORAN *et al.*, 2012). Estas condições estão relacionadas com mudanças nos mecanismos de defesa do hospedeiro (imunossupressão), comprometimento das barreiras anatômicas (queimaduras extensas, procedimentos invasivos) e desequilíbrio da microbiota (uso de antibióticos de amplo espectro) (COLOMBO *et al.*, 2012).

O gênero *Candida* compreende aproximadamente 200 espécies diferentes de leveduras, mas apenas algumas estão relacionadas com micoses oportunistas em humanos. As espécies de maior interesse clínico são: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitanae* (COLOMBO *et al.*, 2012).

A espécie *C. albicans* coloniza as superfícies mucosas do trato gastrointestinal, respiratório e geniturinário humano (SAMPAIO *et al.*, 2010). Pode ser isolada de infecções superficiais dos mais variados sítios anatômicos e invasivas. Exibe diversos fatores de virulência (COLOMBO *et al.*, 2012) e é capaz de sofrer extremas alterações genômicas com o objetivo de sobreviver no hospedeiro humano (SELMECKI; FORCHE; BERMAN, 2010). Os mecanismos envolvidos com estas alterações podem ter evoluído tanto para tolerar situações de estresse no hospedeiro, como para gerar grandes variações genéticas como forma de adaptação a cada microambiente (SELMECKI; FORCHE; BERMAN, 2010).

Esta espécie é naturalmente sensível aos antifúngicos sistêmicos, mas em alguns casos, principalmente quando a exposição prolongada ao antifúngico (principalmente fluconazol), pode haver a seleção de isolados resistentes (COLOMBO *et al.*, 2012). A resistência aos azólicos pode ocorrer quando há o aumento no efluxo de droga da célula, este processo é resultante da superexpressão de genes que codificam as bombas de efluxo (CDR e MDR). Outro mecanismo que pode estar envolvido é o aumento na expressão dos genes ERG responsáveis pela biossíntese de ergosterol, assim como, mutações pontuais específicas nestes genes, levando a modificação da molécula alvo da droga (MARR *et al.*, 2001; MORIO, 2012; CARVALHO *et al.*, 2013; EDDOUZI *et al.*, 2013; YING, 2013). Esta última mutação pode conferir resistência também ao voriconazol (XIANG *et al.*, 2012; COLOMBO *et al.*, 2006).

Uma alternativa para o tratamento desses isolados azóis-resistentes é o uso de equinocandinas, que inibem a produção de 1,3- β -D-glucana (BEN-AMI *et al.*, 2011). Mas, já há evidências de resistência a esta classe de medicamento. Neste caso, a resistência antifúngica está relacionada com mutações no gene FKS1 que codifica a enzima glucano sintase (ESPINEL-INGROFF; CANTÓN, 2011; BALASHOV *et al.*, 2006; PARK *et al.*, 2005).

Candida dubliniensis, por sua vez, é uma espécie emergente cujas características morfológicas e bioquímicas são semelhantes à *C. albicans*. Para a correta diferenciação destas espécies é necessária a identificação molecular dos isolados (COLOMBO *et al.*, 2012). Esta espécie está relacionada com pacientes HIV positivos e limita-se a infecções de orofaringe. Em pacientes neutropênicos pode levar a episódios de candidemia. Grande parte dos isolados desta espécie apresenta suscetibilidade diminuída ao fluconazol (KRCMERY; BARNES, 2002).

A espécie *C. parapsilosis* pode ser encontrada principalmente na pele e possui capacidade de formação de biofilmes em dispositivos médicos, estando relacionada com infecções decorrentes do uso de cateter venoso central e nutrição parenteral total (GOMEZ *et al.*, 2010, LEVY *et al.*, 1998). É responsável por aproximadamente 30% dos episódios de candidemia no Brasil (COLOMBO *et al.*, 2012).

Até 2005 sabia-se que haviam diferenças entre alguns isolados de *C. parapsilosis*, mas que existia uma relação entre eles. Com o trabalho realizado por Tavanti *et al.* (2005) pôde-se concluir que as diferenças moleculares eram suficientes para separá-las em três espécies distintas, agrupadas em um complexo. Ainda, foi sugerido que a espécie mais ancestral fosse *C. metapsilosis* e que esta tenha evoluído para *C. orthopsilosis* e mais recentemente para *C. parapsilosis*. Estas diferenças entre as espécies se estendem aos padrões de suscetibilidade aos antifúngicos e também para a capacidade de produção de biofilme (GONÇALVES *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2011).

A espécie *C. tropicalis* é um importante agente de infecções oportunistas, relacionadas com pacientes neutropênicos, danos na mucosa gastrointestinal, malignidades hematológicas (principalmente leucemias agudas), quimioterapia antineoplásica e desequilíbrio da microbiota pelo intenso uso de antimicrobianos (GOMEZ *et al.*, 2010), apresentando alto potencial de disseminação em neutropênicos e alta taxa de mortalidade (KRCMARY; BARNES, 2002). Esta espécie é suscetível ao tratamento com anfotericina B e à maioria dos azóis (COLOMBO *et al.*, 2012).

Candida krusei é frequentemente isolada de pacientes com neoplasias hematológicas, transplantados de células-tronco (COLOMBO *et al.*, 2012) e de pacientes neutropênicos. As manifestações mais comumente observadas são fungemia e infecção do sistema urinário. Esta espécie geralmente apresenta resistência ao fluconazol, mas suscetibilidade ao itraconazol, cetoconazol e anfotericina B (KRCMERY; BARNES, 2002).

Candida glabrata está intimamente relacionada com *Saccharomyces cerevisiae*, estando dentro do clado de *Saccharomyces* (SINGH-BABAK *et al.*, 2012). Apresenta genoma haplóide que sofre translocações cromossômicas e variação do número de cópias dos genes, que levam ao aumento de sua

diversidade genética. Estes mecanismos contribuem de forma indireta para a resistência aos antifúngicos (SINGH-BABAK *et al.*, 2012).

A incidência de infecções por *C. glabrata* vem aumentando dentre os isolados clínicos, isto é em parte devido à resistência aos azólicos, que são a classe de antifúngicos mais amplamente utilizada nos últimos anos. Como consequências disso, as equinocandinas passaram a ser a droga de escolha para o tratamento de *C. glabrata*, mas já foram documentados alguns isolados de *C. glabrata* resistentes também a esta classe de medicamento (SINGH-BABAK *et al.*, 2012; ALEXANDER *et al.*, 2013).

Candida glabrata é prevalente em adultos, principalmente idosos, isolada com maior frequência de pacientes com malignidades hematológicas, tumores sólidos, transplantados de medula óssea e pacientes que foram submetidos à profilaxia com fluconazol (KRCMARY; BARNES, 2002). Os isolados clínicos desta espécie costumam ser menos suscetíveis ao fluconazol e anfotericina B (COLOMBO *et al.*, 2012).

Candida guilliermondii é pouco frequente em infecções invasivas e está relacionada com pacientes com câncer. Alguns isolados desta espécie são tolerantes e/ou resistentes aos antifúngicos poliênicos, triazóis e equinocandinas (KRCMARY; BARNES, 2002; COLOMBO *et al.*, 2012).

Candida lusitanae representa uma causa ainda pouco frequente de candidemia e está envolvida com malignidades hematológicas, neutropenia e pacientes internados em UTI (CANTÓN *et al.*, 2013). Pode ser isolada de diversos sítios anatômicos, incluindo urina, lavado broncoalveolar, sangue, líquido peritoneal, rim, vagina e pele. Alguns isolados são resistentes à agentes antifúngicos, principalmente à anfotericina B, flucitosina e fluconazol, o que contribui para a dificuldade no tratamento do paciente (ZHANG *et al.*, 2012).

Candida haemulonii foi isolada no Brasil pela primeira vez em 2010 de um paciente com tumor no abdômen atendido no Instituto do Câncer – SP, que após cirurgia, desenvolveu candidemia por esta espécie de levedura. Também tem sido envolvida com infecções superficiais e profundas, relacionadas com uso de cateter venoso central, nutrição parenteral e osteomielite (ALMEIDA *et al.*, 2012).

Há outras espécies de *Candida* que ocasionalmente podem ser causadoras de candidemia, entre elas destacam-se *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*

C. inconspicua, *C. norvegensis*, *C. lipolytica*, *C. zeylanoides* e *C. pelliculosa* (GOMEZ et al., 2010).

3.1.1 Fatores de virulência

A virulência corresponde às características microbianas suportadas pela presença de fatores específicos, tais como toxinas e cápsulas. Estes fatores diferem entre os micro-organismos patogênicos e não patogênicos. Em micro-organismos comensais, o determinante de doença é muitas vezes consequência de uma alteração na interação parasito-hospedeiro. Esta alteração pode ser induzida por antibióticos ou imunossupressão que resulta em aumento da carga fúngica, ocasião em que a resposta imune do hospedeiro não é capaz de controlar esta proliferação. Portanto, apesar de a virulência ser uma propriedade microbiana, ela somente se manifesta em um hospedeiro suscetível (CASADEVALL; PIROFSKI, 2007).

As leveduras do gênero *Candida* expressam vários fatores de virulência que estão relacionados com o processo de patogênese. Entre estes fatores incluem-se as biomoléculas de reconhecimento do hospedeiro, conhecidas como adesinas; dimorfismo celular, que é a transição reversível entre células leveduriformes e crescimento filamentoso e produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas, auxiliares no processo de invasão celular (CALDERONE; FONZI, 2001).

A produção de adesinas confere à levedura a habilidade de adesão às células do hospedeiro, levando também a formação de biofilme, o que é considerado um passo importante para o estabelecimento de infecções fúngicas (HORN et al., 2012).

As principais adesinas em *C. albicans* estão agrupadas em três famílias de genes: ALS, HWP e IFF/HYR (GROOT, 2013). A família ALS codifica glicoproteínas de localização na parede celular, relacionadas com o papel de adesão às células do hospedeiro e a superfícies abióticas (ZHAO et al., 2011).

A família HWP codifica proteínas que se localizam na parede celular das hifas e está relacionada com adesão às células do hospedeiro e formação de biofilme, mas também com o processo de agregação célula-célula e conjugação (GROOT et al., 2013).

Por sua vez, a família de genes HYR/IFF apresenta um importante papel na organização da parede celular. A superexpressão de Iff4 aumenta a adesão às células epiteliais e a materiais plásticos; e Hyr1 está envolvido com resistência à morte por neutrófilos (GROOT *et al.*, 2013).

A presença de adesinas em todas as espécies de *Candida* ainda não foi completamente estudada, mas já se tem confirmada a presença da família ALS em *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii*. Na espécie *C. glabrata* existem outras duas principais famílias com funções de adesinas: EPA, responsável por mediar a aderência nas células epiteliais e endoteliais do hospedeiro humano e PWP que desempenha papel importante na adesão às células epiteliais e agregação durante a formação de biofilme (GROOT *et al.*, 2013).

O polimorfismo celular é observado nas espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis* (CALDERONE; FONZI, 2001). Este processo de alternância entre as formas leveduriformes, pseudohifas e hifas representam um importante traço patogênico. O processo ocorre em resposta a estímulos ambientais como disponibilidade de nutrientes, temperatura, pH, CO₂ e contato com soro. É regulado pela expressão de genes responsáveis pelo desenvolvimento de hifas, envolvendo múltiplas vias de sinalização, entre elas a cAMP-PKA, Cph1p mediada por MAPK e pelas vias cascata de pH mediadas por Rim101p, responsáveis por regular de forma positiva o desenvolvimento de hifas (ZNAIDI *et al.*, 2013).

Em relação às enzimas relacionadas com a virulência de *Candida*, as aspartil proteinases (SAP) e as fosfolipases (PL) compreendem as duas principais famílias de genes envolvidos. A família PL é constituída por quatro grupos de enzimas (PLA, PLB, PLC e PLD), que parecem estar envolvidas com a virulência da levedura. São secretadas nas pontas das hifas durante o processo de invasão tecidual e agem hidrolisando os fosfolípidos de membrana, permitindo sua ruptura e consequente invasão do tecido (GHANNOUM, 2000).

Candida albicans é a mais produtora de fosfolipases, mas outras espécies (*C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* e *C. krusei*) também produzem estas enzimas, porém em quantidades inferiores a *C. albicans* (GHANNOUM, 2000).

A família SAP é composta por dez genes presentes em várias espécies de leveduras do gênero *Candida*, entre elas: *C. albicans*, *C. dubliniensis*,

C. tropicalis e *C. parapsilosis*, mas a quantidade de genes envolvidos varia de acordo com a espécie. Estas enzimas parecem estar relacionadas com a virulência da levedura, pois espécies não patogênicas não produzem quantidades significativas desta enzima. Esta família é responsável por toda a atividade proteolítica extracelular realizada por *C. albicans*, com o objetivo de fornecer nutrição, auxiliar no processo de invasão tecidual, escape das respostas imunológicas do hospedeiro, formação de hifas, adesão às células e mudanças fenotípicas (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003).

3.1.2 Isolamento e Identificação Fenotípica

O isolamento a partir do sangue é realizado através de hemocultura, que se baseia no desenvolvimento de micro-organismos que estejam presentes no sangue, sejam eles bactérias ou fungos. Esta técnica apresenta especificidade de 100%, mas com apenas 50% de sensibilidade e tem a desvantagem de necessitar um período mínimo para positividade de aproximadamente dois dias (CHARLES; BRUYERE; DALLE, 2012).

A pesquisa de *Candida* a partir de amostras de sangue pode ser realizada pelo método manual, com o emprego de meios de cultura como caldo infusão cérebro-coração (BHI) ou caldo caseína digerida de soja (TSB); os métodos semiautomatizados utilizam os sistemas comerciais Hemobac Trifásico (Probac®) e o Septi-Check® (BBL, BD Diagnostic Systems); os métodos automatizados são realizados pelos equipamentos BACTEC® (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, MD, USA) e BacT/ALERT® (bioMérieux, Durham, NC, EUA) disponíveis no Brasil (ARAUJO, 2012).

O isolamento a partir de outros materiais biológicos pode ser realizado em meio Ágar Sabouraud (com adição de cloranfenicol) ou em meio CHROMagar *Candida* (bioMérieux, Durham, USA) quando o material estiver contaminado com outros gêneros de leveduras (LACAZ *et al.*, 2002).

As leveduras do gênero *Candida* apresentam como características macroscópicas a formação de colônias de aspecto cremoso, úmido, coloração branca ou bege, sem produção de hifas aéreas (GUARRO *et al.*, 2000).

A caracterização das estruturas microscópicas pode ser realizada com o cultivo em meio Ágar Fubá e meio Ágar Batata Dextrose, onde se visualiza a presença de blastoconídios com ou sem brotamentos, clamidoconídios, pseudo-hifas e hifas verdadeiras (GUARRO *et al.*, 2000). Ainda, para a identificação, podem ser realizados testes de assimilação de carbono e nitrogênio, fermentação, termotolerância, produção de tubo germinativo, redução de nitrato, entre outros (LACAZ *et al.*, 2002).

Os testes de identificação fenotípica são amplamente utilizados nos laboratórios clínicos para a identificação presuntiva de leveduras isoladas de materiais biológicos. Para isto, são utilizados meios cromogênicos, testes enzimáticos e bioquímicos.

O meio cromogênico CHROMagar *Candida* (bioMérieux, Durham, USA), permite diferenciar *C. albicans* e outras espécies de *Candida* através da alteração na cor das colônias. Isto ocorre pela presença de indicadores de pH presentes no meio, e pela fermentação de substratos cromógenos (COOKE *et al.*, 2002) que permitem a identificação de acordo com a coloração da colônia após 24/48 horas de crescimento. Colônias verde-claras são indicativas de *C. albicans*; verde-escuras *C. dubliniensis* e azuis *C. tropicalis*. As colônias rosa e lilás podem ser indicativo de *C. krusei*, *C. parapsilosis* ou *C. glabrata* (FOTEDAR; AL-HEDAITHY, 2002), e ainda, aproximadamente 10% das colônias de *C. albicans* podem apresentar-se com coloração branca (MURRAY *et al.*, 2007).

A complementação da identificação pode ser realizada por testes enzimáticos e bioquímicos baseados na capacidade de assimilação de carboidratos. Os testes disponíveis no Brasil são: Auxacolor (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette), API 20C Aux (bioMérieux, Durham, USA), API 32 C (bioMérieux, Durham, USA) e Vitek 2 (bioMérieux, Durham, USA) (FREYDIERE; GUINET; BOIRON, 2001).

Os métodos de identificação fenotípica convencionais são utilizados para a identificação de espécies comumente encontradas na rotina, mas falham na identificação de espécies emergentes como *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. nivariensis*, *C. bracarensis*, entre outros. Nestes casos a realização de métodos moleculares pode fornecer uma identificação rápida e precisa (CENDEJAS-BUENO *et al.*, 2010), além de auxiliar na investigação epidemiológica, permitindo verificar se

os novos episódios de candidemia são causadas por recidivas de um mesmo isolado ou provenientes de uma reinfecção (GIAMMANCO *et al.*, 2005).

Para a identificação de *C. dubliniensis* os métodos bioquímicos apresentam limitações. No estudo de Ellepola *et al.* (2003) o teste bioquímico API 20C AUX (BioMerieux) identificou a maioria dos isolados de *C. dubliniensis* como *C. albicans*, enquanto que a análise de ITS2 identificou os mesmos isolados como sendo *C. dubliniensis*.

3.1.3 Identificação molecular

Os marcadores moleculares compreendem um conjunto de técnicas que fornecem ferramentas para evidenciar diversos aspectos relacionados ao DNA. A análise dos ácidos nucleicos tem sido utilizada para identificar e diferenciar indivíduos, como também para o esclarecimento da relação filogenética entre os mesmos.

Com esse objetivo, uma variedade de técnicas de tipagem molecular foram desenvolvidas e passaram a ser utilizadas para distinguir isolados de *Candida*, como Eletroforese de Enzimas Multilocus (MLEE), Análise por Enzimas de Restrição (REA), DNA Polimórfico Amplificado Aleatoriamente (RAPD), Polimorfismo de Fragmentos de Amplificação (AFLP), Polimorfismo de Microssatélites (MLP) (SAGHROUNI *et al.*, 2013), DNA “fingerprinting”, eletroforese de campo pulsado (PFGE), Tipagem por Sequenciamento Multilocus (MLST) (HEO *et al.*, 2011), Polimorfismo de Fragmentos de Restrição (RFLP) (VIJAYAKUMAR; GIRI; KINDO, 2012) e “Southern blotting” (MYOUNG *et al.*, 2011).

Outro marcador amplamente utilizado para a identificação de espécies de *Candida* é o sequenciamento do DNA ribossômico e espaçador interno transcrito. A análise das sequências do rDNA correspondentes às subunidades 18S, 5,8S e 26S, são regiões conservadas que fornecem uma base molecular para o estabelecimento de relações filogenéticas entre organismos pouco relacionados, permitindo inferir a posição taxonômica de gênero. Já as regiões ITS1 e ITS2 fornecem uma separação adequada de espécies, pois são regiões que apresentam a característica de evoluir rapidamente (GIANNINO *et al.*, 2011).

Outros genes que podem ser utilizados concomitantemente para a confirmação das espécies são os que codificam para β -tubulina (KIM *et al.*, 2011), subunidades da RNA polimerase, actina e citocromo-oxidase (TSUI *et al.*, 2008; DANIEL *et al.*, 2001).

3.1.3.1 Filogenia de fungos

Historicamente, a sistemática fúngica se desenvolveu a partir de análises das características observacionais do crescimento e reprodução, considerando o esporo, sua produção e liberação. Estes métodos tornavam difícil a identificação de fungos que não produziam estruturas reprodutivas. Com o passar dos anos surgiram estratégias para contornar este problema através do desenvolvimento de análises das características bioquímicas e moleculares dos micro-organismos (BRIDGE; SPOONER; ROBERTS, 2005).

A filogenia molecular é utilizada para avaliar a distância genética de indivíduos relacionados, contando com a construção de árvores filogenéticas que são utilizadas para diferenciar os organismos. A sequência do DNA é utilizada para o estudo da história evolutiva auxiliando na reclassificação taxonômica e na identificação de espécies, populações e indivíduos (BRIDGE; SPOONER; ROBERTS, 2005).

A definição de espécie varia de acordo com a abordagem. Os conceitos mais comumente relacionados envolvem características morfológicas, biológicas ou filogenéticas dos micro-organismos. O conceito morfológico de espécie que considera as características morfológicas de cada indivíduo, foi utilizado para a descrição de grande parte dos fungos (TAYLOR *et al.*, 2000).

O conceito biológico de espécie considera o potencial de cruzamento entre diferentes populações naturais com capacidade reprodutiva, porém esse critério é frágil em fungos homotáticos (autoférteis) ou fungos assexuados e dessa forma não pode ser aplicado para eles o conceito biológico de espécie (REYNOLDS 1993; TAYLOR *et al.*, 2000). Outro problema na delimitação das espécies baseado no critério biológico é que os métodos convencionais são trabalhosos para demonstrar “in vitro” o cruzamento que ocorre em muitos fungos.

Para superar essas dificuldades trabalhos têm sido realizados usando sequências do tipo de acasalamento (MAT - *mating-type*) para auxiliar na definição biológica das espécies e/ou Concordância Genealógica Filogenética no Reconhecimento de Espécie (GCPSR) (GOMES *et al.*, 2013).

O terceiro, conceito filogenético de espécie permite analisar grupos geneticamente isolados uma vez que descendentes com mudanças nas sequências genéticas podem ser reconhecidos, auxiliando na identificação de espécies crípticas (TAYLOR *et al.*, 2000).

O GCPSR usa a concordância filogenética de múltiplos genes não ligados para indicar a ausência de troca de material genético e, portanto, a independência evolutiva das linhagens. Quando os diferentes genes são concordantes há a formação de uma mesma topologia, quando discordantes há um conflito entre as árvores de genes (TAYLOR *et al.*, 2000). Este conceito é muito útil em fungos, pois se apresenta mais discriminatório em situações onde as espécies são incapazes de cruzarem ou apresentam deficiências na distinção de caracteres morfológicos ou esterilidade (GOMES *et al.*, 2013).

A análise de sequências de DNA vem sendo eficaz na elucidação de filogenias fúngicas (DANIEL *et al.*, 2001; DIEZMANN *et al.*, 2004; TSUI *et al.*, 2007). Diezmann *et al.* (2004) realizaram uma filogenia multigênica das famílias de Saccharomycetales incluindo isolados clínicos e ambientais com o objetivo de observar as relações evolutivas de *Candida*. Os resultados de filogenia resultaram em um significativo suporte da origem monofilética das duas famílias de Saccharomycetales, a Metschnikowiaceae e Saccharomycetaceae. Três grandes clados foram formados dentro de Saccharomycetacea, onde grande parte das espécies patogênicas foram agrupadas dentro do clado 1 (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. maltosa*, *C. tropicalis*, *C. viswanathii* e *C. parapsilosis*). Esta filogenia permitiu elucidar as relações filogenéticas entre importantes espécies de interesse médico.

A sistemática molecular de fungos se baseia principalmente na análise dos genes do rDNA e DNA mitocondrial. O rDNA compreende um conjunto de genes repetitivos que codificam a subunidade ribossomal menor, subunidade ribossomal maior e a subunidade 5,8S localizada entre as duas anteriores. Estes três genes são separados por duas regiões espaçadoras internas transcritas, conhecidas como ITS1 e ITS2 (BRIDGE; SPOONER; ROBERTS, 2005).

Como resultado obtido das relações filogenéticas a partir de sequências ITS, foram identificadas quatro espécies relacionadas com *C. rugosa* e que agora fazem parte de um complexo composto por *C. rugosa* sensu stricto, *C. pseudorugosa*, *C. neorugosa* e *C. mesorugosa*, cuja identificação pode ser confundida com a espécie *C. rugosa*, quando utilizados apenas testes fenotípicos e bioquímicos para sua caracterização (PADOVAN; MELO; COLOMBO, 2013).

A diversidade dentro das regiões ITS1 e ITS2 permite fazer uma identificação de espécies fúngicas, pois são regiões altamente informativas e hipervariáveis flanqueadas por genes ribossomais altamente conservados, alvos desejáveis também para o desenvolvimento de iniciadores e sondas espécie-específicas (BOYANTON *et al.*, 2008). O sequenciamento das regiões ITS é uma ferramenta robusta e eficaz, capaz de identificar e diferenciar muitos isolados clinicamente relevantes (CENDEJAS-BUENO *et al.*, 2010).

Leaw *et al.* (2006) procuraram estabelecer se sequências de ITS1 e ITS2 separadas eram suficientes para a identificação de espécie. Para isto testaram 373 cepas de leveduras de 86 espécies. Puderam observar que a sequência da região ITS2 parece apresentar maior especificidade para identificação de espécies quando comparado com a região ITS1, pois quase todas as espécies de relevância clínica puderam ser identificadas usando apenas ITS2. Uma cepa de *C. intermedia* e três cepas de *Pichia ohmeri* não foram identificadas apenas pela análise da sequência ITS1, mas foram identificadas corretamente através de suas sequências ITS2.

Segundo Borman *et al.* (2009), o sequenciamento e a análise da região ITS2 é suficiente para realizar a diferenciação das espécies do complexo *C. parapsilosis* sensu lato.

A região D1/D2 localizada na subunidade maior do ribossomo é variável e tem sido amplamente utilizada para o estabelecimento das relações evolutivas de espécies de *Candida*, levando a uma melhor compreensão da ecologia, além de auxiliar no diagnóstico. Mas, as sequências da região D1/D2 isoladas não são suficientes para distinguir espécies estreitamente relacionadas (TSUI *et al.*, 2007). O uso de outro gene, como por exemplo, actina oferecem melhor resolução filogenética entre espécies de *Candida* colaborando para o estabelecimento de grupos bem suportados (DANIEL *et al.*, 2001). O uso de um único gene para análises filogéticas pode não fornecer informações suficientes para a resolução da

filogenia de fungos (TAYLOR *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2013), isto se aplica também para leveduras do gênero *Candida* (TSUI *et al.*, 2007; ROKAS *et al.*, 2003).

Tavanti *et al.* (2005) realizaram a determinação do complexo *C. parapsilosis* sensu lato (*C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*) por meio da análise de sequências do rDNA, RAPD, MSLT, entre outros. Puderam observar que a partir da análise da sequência da região 5,8S do rDNA entre as três espécies foram 100% idênticas. Pequenas diferenças foram observadas nas sequências da região ITS2, e na região ITS1 foram encontradas diferenças significativas entre as três espécies, com similaridade de 82,5% entre *C. parapsilosis* e *C. metapsilosis*, 88,1% entre *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*, e 86,1% entre *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*.

Cendejas-Bueno *et al.* (2012) estudaram as relações filogenéticas entre 30 isolados de *C. haemulonii*, uma espécie raramente isolada de amostras clínicas, mas que pode estar envolvida com episódios de candidemia. Para isto, realizaram sequenciamento das regiões ITS, D1/D2, RPB1 e RPB2, utilizados também para a confirmação da espécie. Puderam observar que o complexo *C. haemulonii* compreende duas espécies divididas em grupo I e II, diferindo nas sequências dos quatro genes estudados, em algumas características fenotípicas e AFLP.

3.1.3.3 Genotipagem de *Candida albicans* – Sistema ABC

Os métodos moleculares de tipagem são utilizados com frequência na investigação epidemiológica com o objetivo de desenvolver medidas de controle de infecção (McCULLOUGH; CLEMONS; STEVENS, 1999a).

A genotipagem pelo Sistema ABC foi descrita inicialmente por Stevens, Odds e Scherer (1990) baseada na presença ou ausência de uma inserção de 379 nucleotídeos no rDNA que codifica para a subunidade maior do ribossomo de *C. albicans*. Esta inserção é ausente no genótipo A e presente no genótipo B. Estudos posteriores relataram a presença de outros dois genótipos C e D (CLEMONS *et al.*, 1997; McCULLOUGH *et al.*, 1998). O genótipo C é um híbrido dos genótipos A e B, pois apresenta o íntron em apenas um alelo, isto leva a observação das duas bandas polimórficas (ABDULRAHIM *et al.*, 2013); e o genótipo

D apresenta um íntron maior em aproximadamente 300 nucleotídeos em relação ao genótipo B (McCULLOUGH; CLEMONS; STEVENS, 1999b).

A amplificação desta região resulta em um produto único para o genótipo A (~450 bp) e B (~840 pb). *Candida stellatoidea* tipo 1 (~840 pb) é considerada sinônima de *C. albicans* genótipo B. O genótipo D pertence a espécie *C. dubliniensis* (~1080 pb). Todos os genótipos C apresentam duas bandas com tamanhos idênticos aos observados para os genótipos A (450 pb) e B (840 pb) (McCULLOUGH, CLEMONS, STEVENS, 1999b).

Odds *et al.* (2006) compararam a concordância entre MLST e genotipagem ABC, e puderam afirmar que o Sistema ABC é confiável quando utilizada para isolados que diferem em vários polimorfismos de nucleotídeo único, mas deve ser utilizada em associação com outro marcador molecular.

3.2 CANDIDEMIA

A candidemia é definida como a presença de leveduras do gênero *Candida* na corrente sanguínea (EVANS, 2010). Ocorre previamente à disseminação e infecção de órgãos profundos (GOMEZ *et al.*, 2010). Esta doença fúngica pode ser adquirida por via endógena quando o micro-organismo transita do trato gastrointestinal para a corrente sanguínea. Alguns fatores relacionados com o aumento da colonização intestinal por *Candida* ou que levam a danos e atrofia de mucosa intestinal podem facilitar este processo, como uso de antibióticos de amplo espectro, corticosteróides, obstrução intestinal, nutrição parenteral total, cirurgias abdominais e mucosites (COLOMBO *et al.*, 2012).

A doença também pode ser adquirida por via exógena por meio da contaminação de procedimentos médicos invasivos, próteses ou soluções de infusão e ainda pela colonização de cateteres vasculares (COLOMBO *et al.*, 2012; TAMURA *et al.*, 2007). Os cateteres representam uma porta de entrada para a ocorrência de candidemia. Em alguns casos, a remoção deste pode diminuir o risco de mortalidade do paciente (TAUR *et al.*, 2010).

Os episódios de candidemia podem ser provenientes de infecções adquiridas por isolados da comunidade, assim denominada quando é detectada logo após a admissão do paciente no ambiente hospitalar, ou de origem nosocomial,

quando se desenvolve alguns dias após o internamento (PFALLER *et al.*, 2011). Pfaller *et al.* (2011) avaliaram a origem da infecção e puderam observar que os episódios adquiridos a partir da comunidade foram maiores para a América do Norte (50,8%) quando comparado com a Europa (22,4%) e América Latina (28,0%).

As manifestações clínicas observadas em pacientes candidêmicos são inespecíficas e indistinguíveis das observadas em pacientes com sepse bacteriana. Usualmente são descritas durante o episódio de candidemia febre alta, moderada ou baixa como sendo o sinal mais frequentemente observado, podendo ainda estar associado com hipotensão, taquicardia persistente, calafrios, endocardite, endoftalmite, peritonite, lesões cutâneas de tronco e extremidades (COLOMBO *et al.*, 2006; GOMEZ *et al.*, 2010), além disso, pode-se observar falência renal aguda, diarreia, síndrome da angústia respiratória aguda, leucocitose e trombocitopenia (CHEN *et al.*, 2005).

Os grupos mais vulneráveis a este tipo de infecção são pacientes neonatos, internados em UTI e os que apresentam malignidades hematológicas e de órgãos sólidos (CHAVES; SANTOS; COLOMBO, 2012).

No Paraná, um estudo realizado no Hospital de Clínicas – UFPR por França, Ribeiro e Queiroz-Telles (2006) revelou que as condições frequentemente associadas com a candidemia foram uso de antibióticos (97%), uso de cateter venoso central (77%), uso de bloqueador de H₂ (57%), nutrição parenteral total (49%), permanência em UTI (41%), terapia com corticosteróides (39%) e cirurgia do sistema digestório (35%).

Bassetti *et al.* (2011) em um hospital da Itália, observaram que a maioria dos pacientes com esta infecção fúngica apresentavam outras doenças associadas no momento do diagnóstico da candidemia. Aproximadamente 45% passaram por uma intervenção cirúrgica, 41% possuíam tumor de órgão sólido, 11% eram diabéticos, 7% tinham malignidades hematológicas, 1% recebeu transplante de órgão sólido e 1% eram portadores do vírus HIV.

3.2.1 Epidemiologia

Os principais fatores de risco para candidemia em geral são quimioterapia, uso de antibióticos de amplo espectro (DIZBAY *et al.*, 2008),

permanência na UTI, cirurgias, neoplasias, neutropenia (NUCCI *et al.*, 2010), hemodiálise, ventilação mecânica, transplante de órgãos e uso de cateteres (CHANG *et al.*, 2008).

Em pacientes pediátricos os principais fatores de risco envolvem a antibioticoterapia, administração de corticosteróides, granulocitopenia, colonização fúngica prévia, permanência prolongada em UTI, baixo peso ao nascer e prematuridade (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2008).

A epidemiologia da candidemia varia entre as regiões e o período de estudo. Blyth *et al.* (2009) observaram que a incidência de candidemia entre os hospitais pediátricos da Austrália foi de 0,46 a cada 1.000 admissões. Santolaya *et al.* (2013) observaram entre os hospitais pediátricos da América Latina a incidência média de 0,81 para 1.000 admissões. Motta *et al.* (2010) observaram que a incidência de candidemia entre os adultos do estado de São Paulo foi de 1,87 por 1.000 admissões. Já Bassetti *et al.* (2011) identificaram aumento da incidência em um hospital da Itália, passando de 1,18 em 2008 para 2,37 episódios a cada 1.000 admissões em 2010.

No trabalho realizado por Colombo *et al.* (2006), no qual avaliaram a epidemiologia da candidemia no Brasil, identificaram as leveduras do gênero *Candida* como o quarto patógeno mais frequentemente isolado de hemoculturas, ficando atrás somente de estafilococos coagulase-negativo, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*.

A incidência de candidemia nos hospitais brasileiros é 1,38 episódios a cada 1.000 admissões, e tem como espécies mais frequentes *C. albicans* (40,5%), *C. parapsilosis* (25,8%), *C. tropicalis* (13,2%), *C. glabrata* (10%), *C. krusei* (4,7%) e *C. guilliermondii* (1,6%). Outras espécies são observadas com menor frequência, é o caso de *C. intermedia*, *C. haemulonii*, *C. lusitaniae*, *C. famata* e *C. norvegensis* (NUCCI *et al.*, 2013a).

3.2.2 Diagnóstico

O diagnóstico precoce e correto da candidemia é crucial para o aumento da sobrevivência do paciente (CORTES *et al.*, 2011). O diagnóstico clínico se torna difícil principalmente pelo fato de que os sinais e sintomas da doença podem ser

confundidos com vários outros processos infecciosos e não infecciosos. O diagnóstico laboratorial é frequentemente realizado pelos métodos tradicionais de cultura de micro-organismos, mas estes apresentam baixa sensibilidade e necessitam de vários dias para a detecção de positividade. Outros fatores ainda podem influenciar no resultado deste diagnóstico, como profilaxia ou tratamento empírico com antifúngicos (MONTAGNA *et al.*, 2011).

O diagnóstico pode ser realizado através da hemocultura, método baseado no isolamento das leveduras do gênero *Candida* que estejam presentes no sangue. Apresenta especificidade de 100%, mas sensibilidade de apenas 50% e desvantagem de ter um período médio para positividade de dois dias (CHARLES; BRUYERE; DALLE, 2012; CAREY; SAIMAN; POLIN, 2008). O período de incubação da hemocultura está diretamente relacionado com o aumento da taxa de mortalidade do paciente, pois para cada hora adicional necessária na cultura aumenta o risco de morte do paciente em 1,025 vezes. Para auxiliar o diagnóstico, podem ser utilizados métodos moleculares e sorológicos que necessitam menor tempo para a detecção do micro-organismo (TAUR *et al.*, 2010).

Uma técnica auxiliar para o diagnóstico de candidemia é a pesquisa de β -D-glucana, principal componente da parede celular fúngica, que está circulante no soro do paciente durante a infecção fúngica invasiva (POSTERARO *et al.*, 2011).

Os resultados da pesquisa deste componente são obtidos de 24-72 horas antes da positividade da hemocultura, com sensibilidade e especificidade de 93,7% e 93,6% respectivamente (POSTERARO *et al.*, 2011). A pesquisa de β -D-glucana, assim como o uso de PCR, é útil como teste complementar a hemocultura no diagnóstico de candidemia (NGUYEN *et al.*, 2012), podendo ser utilizada no acompanhamento dos níveis deste antígeno ao longo do tempo, aliado às informações microbiológicas e clínicas permitindo um diagnóstico precoce e preciso, minimizando o uso inadequado de drogas (MONTAGNA *et al.*, 2011).

Outra alternativa que vem sendo estudada para auxiliar no diagnóstico é a pesquisa do antígeno manana e de anticorpos anti-manana. A manana é um dos principais antígenos de *Candida* circulante durante a infecção. Este antígeno e seus anticorpos podem ser pesquisados no soro do paciente por testes de aglutinação em látex e ensaios imunoenzimáticos. Podem ser úteis para auxiliar na confirmação ou na exclusão do diagnóstico de candidemia junto com os resultados da hemocultura (MIKULSKA *et al.*, 2010).

A pesquisa de outros anticorpos pode ser relacionada com o diagnóstico precoce de candidemia, entre eles a detecção de anticorpos dirigidos contra antígenos da superfície da parede celular do micélio de *C. albicans* (GOMEZ *et al.*, 2010). Vários genes relacionados com a expressão destes antígenos foram identificados, entre eles destacam-se HWP-1, ALS3, ECE1 e HYR1. Para os pacientes infectados com espécies não-*albicans*, os títulos de anti-HWP-1 foram mais baixos do que para os pacientes infectados com *C. albicans*. Os anticorpos anti-HWP-1 foram detectados também em infecções causadas pelas espécies *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. utilis* e *C. dublinensis* (LAIN *et al.*, 2007).

Ainda há a possibilidade de aliar as técnicas moleculares. A técnica de PCR pode detectar a presença de *Candida* em um período de 24-48 horas, com sensibilidade de 100% e especificidade de 97% quando comparada com a hemocultura. A PCR pode detectar quantidades muito pequenas de DNA, o equivalente ao material genético presente em 5-25 células fúngicas, que em uma hemocultura possivelmente não seria detectado (ÇERIKÇIOĞLU *et al.*, 2010). Apresenta maior sensibilidade quando realizado com amostras de plasma (NGUYEN *et al.*, 2012). Isto facilita o diagnóstico precoce da doença, bem como o monitoramento de persistência e resolução da mesma (AVNI; LEBOVICI; PAUL, 2011).

3.2.3 Tratamento

Atualmente vários estudos preconizam o uso de uma das três equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina) como a primeira linha de escolha para o início do tratamento dos episódios de candidemia, visto seu baixo espectro antifúngico e baixa toxicidade (COLOMBO *et al.*, 2012; CORNELLY *et al.*, 2012; NUCCI *et al.*, 2013b).

As equinocandinas constituem uma classe de antifúngicos disponibilizada para administração exclusivamente parenteral. Atuam como inibidores direcionados da biossíntese de um componente da parede celular dos fungos, o 1,3- β -D-glucana. As enzimas 1,3- β -D-glucana sintases são responsáveis pela síntese deste polissacarídeo, codificado pelos genes FKS1, FKS2, e FKS3 em *S. cerevisiae*,

C. glabrata e *C. albicans*. Acredita-se que as equinocandinas ligam-se à proteína FKS e desta forma inibam sua atividade (KATIVAR; PFALLER; EDLIND, 2006).

Apesar desta classe de medicamentos ser nova, há relatos na literatura de resistência em *C. glabrata* (KATIVAR; PFALLER; EDLIND, 2006; CLEARY *et al.*, 2008; PFEIFFER *et al.*, 2010). Até o momento o único mecanismo de resistência às equinocandinas encontrado está associado às mutações no alvo da droga, os genes FKS em regiões conhecidas como “hot spots”, que são altamente conservadas. Mas além deste, outros mecanismos podem estar envolvidos, apesar de ainda não serem conhecidos, uma vez que mutações em FKS não foram identificadas em alguns isolados resistentes às equinocandinas (SHAPIRO; ROBBINS; COWEN, 2011; PFEIFFER *et al.*, 2010; CASTANHEIRA *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2009). Ainda, mutações idênticas em FKS podem apresentar diferentes perfis de resistência (SINGH-BABAK *et al.*, 2012).

Após o tratamento inicial com equinocandinas pode-se realizar o descalonamento terapêutico para outras drogas caso o paciente apresente melhoras no quadro clínico. Esta continuação do tratamento pode ser realizada com triazólicos, principalmente o fluconazol quando o isolado apresentar suscetibilidade a esta droga, ou voriconazol. Pode-se considerar ainda o uso de poliênicos como a anfotericina B na sua formulação lipídica, porém com cautela devido à sua nefrotoxicidade (CORNELLY *et al.*, 2012; ULLMANN *et al.*, 2012; NUCCI *et al.*, 2013).

Os azóis são divididos em dois grupos: os imidazóis (clotrimazol), com ação tópica utilizada para o tratamento de candidíase superficial e os triazóis que são divididos em 1ª geração (itraconazol e fluconazol) e 2ª geração (voriconazol e posaconazol). Têm como mecanismo de ação a seletiva inibição da produção do ergosterol pela inibição da enzima 14- α -demetilase e consequentemente, impedimento da conversão de lanosterol em ergosterol (COLOMBO *et al.*, 2012).

O fluconazol (FLU) é utilizado para o tratamento de todas as formas de candidíase. É comercializado nas formulações para administração oral ou endovenosa, apresenta boa absorção pelo trato gastrointestinal e não sofre alterações por mudanças no pH gástrico ou presença de alimentos. O efeito colateral que pode ser observado é a hepatite induzida por drogas, que frequentemente não apresenta sintomas (COLOMBO *et al.*, 2012).

Os mecanismos de resistência aos azóis são estudados há décadas e ainda há novos mecanismos sendo descobertos, revelando a expansão no número

de estratégias empregadas pelos fungos a fim de resistir à exposição às drogas antifúngicas. Dentre estas estratégias encontram-se mutações nas moléculas alvo da droga (enzima lanosterol 14- α -desmetilase), superexpressão de bombas de efluxo e alterações metabólicas, responsáveis por minimizar o efeito tóxico destas drogas nas células fúngicas (SINGH-BABAK *et al.*, 2012).

Os poliênicos possuem amplo espectro de atividade antifúngica. A anfotericina B (AMB) é o principal representante desta classe de medicamento. Tem como mecanismo de ação a interação com os esteróis da membrana de células eucarióticas, levando ao desequilíbrio da permeabilidade da membrana plasmática e sua consequente ruptura (COLOMBO *et al.*, 2012).

A AMB é administrada via parenteral combinada com deoxicolato, que auxilia na solubilidade da droga. Os principais efeitos colaterais são nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, mielotoxicidade e, em alguns casos, cardiotoxicidade. Pode ocorrer também o aparecimento de anemia e trombocitopenia (FRATTARELLI *et al.*, 2004). Existem preparações lipídicas que apresentam mesma resposta ao tratamento com menor nefrotoxicidade, mas com a desvantagem do custo ser mais alto que a formulação com deoxicolato (PAPPAS *et al.*, 2009).

A escolha da melhor terapia antifúngica para pacientes com candidemia deve considerar a presença de infecções complicadas em órgãos, gravidade do episódio, espécie de *Candida* envolvida, risco para toxicidade renal, exposição prévia a antifúngicos, presença de cateter venoso central e necessidade de cirurgia para remoção de focos infecciosos (COLOMBO *et al.*, 2012).

Em uma meta-análise realizada por Andes *et al.* (2012) avaliou-se o impacto das estratégias de tratamento dos pacientes com candidemia, relacionadas com as taxa de mortalidade, observando que os pacientes que receberam tratamento com equinocandinas apresentaram taxa de sobrevivência maiores que aqueles que receberam um polieno ou triazol. A sobrevivência também foi melhor para os pacientes que foram submetidos à remoção do cateter venoso central durante o tratamento. Em contrapartida, o aumento da idade, o uso concomitante de terapias imunossupressoras e infecção por *C. tropicalis* estavam associados com maior taxa de mortalidade.

3.2.3.1 Suscetibilidade aos antifúngicos

A resposta ao tratamento às drogas antifúngicas varia de acordo com a espécie fúngica causadora da infecção. *Candida albicans* e *C. parapsilosis* geralmente são suscetíveis ao fluconazol, enquanto que a *C. glabrata* possui suscetibilidade dose-dependente ou resistência ao mesmo. Já *C. krusei* é considerada intrinsecamente resistente ao fluconazol (SHAH *et al.*, 2011). A espécie *C. dubliniensis* pode apresentar resistência aos derivados azólicos (BOSCO-BORGEAT *et al.*, 2011). Isolados clínicos da espécie *C. tropicalis* respondem bem ao tratamento com anfotericina B e azólicos, mas diversos estudos apontam o desenvolvimento de resistência ao fluconazol (BASSETTI *et al.*, 2011; COLOMBO *et al.*, 2012). Em contrapartida, no trabalho realizado por Chen *et al.* (2005) em Taiwan, de 17 isolados de *C. tropicalis*, 6 apresentaram resistência ao tratamento por anfotericina B.

Pfaller *et al.* (2008) observaram 93% de suscetibilidade ao fluconazol em *C. parapsilosis*, ausência de resistência aos antifúngicos anidulafungina, caspofungina, micafungina, posaconazol e voriconazol para as espécies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, e poucos isolados de *C. glabrata* resistentes aos antifúngicos citados.

Em um trabalho realizado por Pfaller *et al.* (2011), o qual avaliou a suscetibilidade de isolados de candidemia adquiridos fora do ambiente hospitalar, pôde-se observar ausência de resistência à anidulafungina, caspofungina, micafungina, posaconazol ou voriconazol dentre os isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ou *C. krusei*. A única resistência ao fluconazol detectada no estudo para os isolados citados foi observada em *C. parapsilosis*. Entre os isolados da espécie *C. glabrata*, um pequeno número de isolados foi resistente à anidulafungina, caspofungina e aos triazóis. Entre os isolados nosocomiais de *C. albicans*, um isolado foi resistente a todas as equinocandinas avaliadas, mas não houve nenhuma resistência aos azólicos testados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Esta pesquisa tem caráter retrospectivo e experimental, na qual realizou-se um levantamento dos isolados de leveduras do gênero *Candida*, obtidos a partir de amostras de sangue e depositados na micoteca do Laboratório de Micologia do Hospital de Clínicas/UFPR no período de janeiro de 2005 a junho de 2012. Este levantamento resultou em um total de 430 isolados que foram utilizados para o estudo epidemiológico. No estudo epidemiológico utilizou-se os prontuários dos pacientes para a obtenção de informações como gênero, idade e indicação clínica. Destes, foram selecionados 80 para a realização dos testes de suscetibilidade “in vitro” e variabilidade genética do presente estudo. Para a seleção levou-se em consideração dados como identificação presuntiva da espécie, ano de isolamento, idade e gênero do paciente.

Os dados demográficos dos pacientes e os dados epidemiológicos dos isolados de leveduras do gênero *Candida* analisados neste estudo, foram comparados com um período de 2001-2004. As variáveis foram analisadas através do teste Qui-quadrado, o valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

O projeto foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná com parecer de número 52515, relatado no dia 06 de julho de 2012, recebeu aprovação para o início da pesquisa (ANEXO 1).

4.2 LINHAGENS UTILIZADAS

Para a realização dos testes de suscetibilidade “in vitro” e caracterização molecular utilizou-se 80 isolados de leveduras do gênero *Candida* procedentes de amostras de sangue de paciente com candidemia, identificados inicialmente de forma presuntiva por meio de CHROMagar *Candida* (bioMérieux, Durham, USA) e API 20C Aux (bioMérieux, Durham, USA) e depositados na micoteca do Laboratório de Micologia do Hospital de Clínicas/UFPR.

Um total de 36 linhagens de referências de diferentes espécies do gênero *Candida* foram incluídas no estudo para as análises filogenéticas (TABELA 1).

TABELA 1 - ISOLADOS REFERÊNCIA UTILIZADOS NA ANÁLISE FILOGENÉTICA

ESPÉCIE	FONTE DE ISOLAMENTO	ORIGEM	N° DE REFERÊNCIA	GENBANK	
				ITS	D1/D2
<i>Candida albicans</i>	Interdígito	Uruguai	CBS 562	AB018037	AY497682
<i>Candida albicans</i>	Broncomicose	-	ATCC 10231	FJ159643	-
<i>Candida albicans</i> †	Isolado clínico	Holanda	CBS 1905	-	AY497673
<i>Candida dubliniensis</i>	Cavidade oral	Austrália	CBS 7988	AB035590	-
<i>Candida dubliniensis</i> †	Cavidade oral	Irlanda	CBS 7987	NR103562	U57685
<i>Candida dubliniensis</i>	-	-	IFM 5422	-	AB828136
<i>Candida parapsilosis</i>	-	-	WM 0295	EF568035	-
<i>Candida parapsilosis</i> †	Fezes humanas	Porto Rico	CBS 604T	AJ635316	CPU45754
<i>Candida parapsilosis</i> †	Lavado bronquico	USA	ATCC 96138	-	AY497665
<i>Candida metapsilosis</i>	Escarro	Noruega	CBS 2916	AY391844	-
<i>Candida metapsilosis</i> †	Mão	USA	ATCC 96144T	AJ698049	FJ746055
<i>Candida metapsilosis</i>	Isolado clínico	USA	ATCC 14054	-	KC881060
<i>Candida orthopsilosis</i>	CVC	USA	CBS 10906	FJ872018	-
<i>Candida orthopsilosis</i> †	CVC	USA	ATCC 96139T	AJ698048	FJ746056
<i>Candida orthopsilosis</i>	Ambiental	Austrália	CBS 8825	-	AJ508575
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	WM 233	EF568042	-
<i>Candida tropicalis</i> †	Broncomicose	USA	IFM 5446	AB437068	-
<i>Candida tropicalis</i> †	Bronquite	Holanda	CBS 94	-	U45749
<i>Candida tropicalis</i>	-	Tailândia	DMKUXE318	-	AB847528
<i>Candida glabrata</i> †	Fezes humanas	-	CBS 138	AY198398	-
<i>Candida glabrata</i>	-	-	WM 02.57	EF568002	-
<i>Candida famata</i> †	Mão	-	CBS 1795T	AM992910	AJ508559
<i>Candida famata</i> †	Mão	-	CBS 767	GU246256	AY497693
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> †	Inseto	USA	WM 02374	EF568007	-
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Inseto	USA	CBS 2030	EF568003	AY497675
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Mel	Tailândia	HB 31-2	-	AB568329
<i>Pichia anomala</i> †	Alimento	Tailândia	PY1	AB331898	-
<i>Pichia anomala</i> †	-	-	CBS 5759	DQ249196	-
<i>Candida lusitanae</i> †	Ceco de suíno	Portugal	CBS 4413	EF568024	AJ508571
<i>Candida lusitanae</i> †	Citrus	Israel	CBS 6936	AY321464	U44817
<i>Pichia kudriavzevii</i>	-	-	WM 03.204	EF568016	-
<i>Pichia kudriavzevii</i> †	Escarro	Sri Lanka	CBS 573	EF568018	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cerveja	Holanda	CBS 1171	AB018043	-
<i>Neurospora crassa</i>	-	-	MYA-4619	GU327635	-
<i>Neurospora crassa</i>	-	-	FGSC8771	-	FR774249

†: type; - :DADO NÃO INFORMADO. **CVC:** cateter venoso central

FONTE: GENBANK - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (2014)

4.3 REVITALIZAÇÃO E CULTIVO DAS LINHAGENS

A revitalização dos 80 isolados previamente armazenados em Skim Milk (Difco®) foi realizada por meio de repiques em meio Ágar Batata Dextrose (Potato Dextrose Agar, Difco®), incubadas a 30°C por 48h e conservadas sob refrigeração para a realização dos testes.

4.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Para a extração de DNA utilizou-se a metodologia descrita por Vicente *et al.* (2008), que consiste basicamente em maceração de cada isolado com sílica/celite (2:1) na presença de CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio) e a extração do DNA realizada em CIA (solução ácida de clorofórmio álcool isoamílico). Em seguida o DNA é precipitado em álcool 96% e lavado a 70%.

Para o sequenciamento das regiões ITS foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE; LEE; TAYLOR, 1990). O produto da amplificação foi purificado com Sephadex®-GE (CROUS *et al.*, 2009). A obtenção das sequências foi realizada através do Sequenciador Genético de DNA ABI3500.

A amplificação do domínio variável de D1/D2 foi utilizada para confirmar a identificação apenas dos isolados que apresentaram discordância entre a identificação fenotípica e molecular. Para isto, foi utilizado o par de oligonucleotídeos iniciadores NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (O'DONNELL, 1993), seguindo as mesmas condições utilizadas para ITS (WHITE; LEE; TAYLOR, 1990). O produto da amplificação foi purificado com Sephadex®-GE (CROUS *et al.*, 2009). A obtenção das sequências foi realizada através do Sequenciador Genético de DNA ABI3500.

A edição das sequências obtidas foi realizada com o auxílio do programa BioEdit (HALL, 1999) e após a edição foi realizado o depósito das sequências no banco de dados do GenBank (NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), cujo os números de acesso foram apresentados na tabela 2.

TABELA 2 - ISOLADOS CLÍNICOS UTILIZADOS NO ESTUDO

ESPÉCIE	FONTE DE ISOLAMENTO	ORIGEM	DEPÓSITO COLEÇÃO	Nº DE REFERÊNCIA	GENBANK	
					ITS	D1/D2
<i>C. lusitaniae</i>	Sangue	Brasil	LMICRO110	E2	KJ451634	-
<i>C. tropicalis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO111	HC4	KJ451635	KJ451714
<i>C. glabrata</i>	Sangue	Brasil	LMICRO112	HC14	KJ451636	-
<i>C. glabrata</i>	Sangue	Brasil	LMICRO113	HC18	KJ451637	-
<i>C. glabrata</i>	Sangue	Brasil	LMICRO114	E27	KJ451638	-
<i>C. glabrata</i>	Sangue	Brasil	LMICRO115	HC32	KJ451639	-
<i>C. glabrata</i>	Sangue	Brasil	LMICRO116	HC46	KJ451640	-
<i>C. glabrata</i>	Sangue	Brasil	LMICRO117	HC47	KJ451641	-
<i>C. tropicalis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO118	E48	KJ451642	-
<i>C. tropicalis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO119	HC49	KJ451643	-
<i>C. guilliermondii</i>	Sangue	Brasil	LMICRO120	E50	KJ451644	-
<i>C. krusei</i>	Sangue	Brasil	LMICRO121	E51	KJ451645	-
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO122	HC52	KJ451646	-
<i>C. tropicalis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO123	E53	KJ451647	-
<i>C. tropicalis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO124	HC54	KJ451648	-
<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO125	HC55	KJ451649	-
<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO126	HC56	KJ451650	-
<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO127	HC57	KJ451651	-
<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO128	HC58	KJ451652	-
<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO129	E59	KJ451653	-
<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO130	HC60	KJ451654	-
<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO131	E61	KJ451655	-
<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO132	HC62	KJ451656	-
<i>C. lusitaniae</i>	Sangue	Brasil	LMICRO133	HC63	KJ451657	KJ451715
<i>C. tropicalis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO134	HC64	KJ451658	KJ451716
<i>C. guilliermondii</i>	Sangue	Brasil	LMICRO135	HC65	KJ451659	-
<i>C. krusei</i>	Sangue	Brasil	LMICRO136	HC66	KJ451660	-
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO137	HC67	KJ451661	-
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO138	HC68	KJ451662	-
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO139	HC69	KJ451663	-
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO140	HC70	KJ451664	-
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO141	HC71	KJ451665	-
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO142	HC72	KJ451666	-
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO143	HC73	KJ451667	-
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO144	HC74	KJ451668	-
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO145	HC75	KJ451669	-
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO146	HC76	KJ451670	-
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO147	HC77	KJ451671	-
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO148	HC78	KJ451672	-
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO149	E79	KJ451673	-
<i>C. pelliculosa</i>	Sangue	Brasil	LMICRO150	E80	KJ451674	-
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO151	HC81	KJ451675	-
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO152	HC82	KJ451676	-
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO153	HC83	KJ451677	-
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO154	HC84	KJ451678	-
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO155	HC85	KJ451679	-
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO156	HC86	KJ451680	-
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO157	HC87	KJ451681	-
<i>C. dubliniensis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO158	HC88	KJ451682	KJ451717
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO159	HC89	KJ451683	-
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO160	HC90	KJ451684	-
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO161	HC91	KJ451685	-
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO162	HC92	KJ451686	-
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO163	HC93	KJ451687	-
<i>C. albicans</i>	Sangue	Brasil	LMICRO164	HC94	KJ451688	-
<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO165	HC95	KJ451689	-

Continua

ESPÉCIE	FONTE DE ISOLAMENTO	ORIGEM	DEPÓSITO COLEÇÃO	Nº DE REFERÊNCIA	Continuação GENBANK	
					ITS	D1/D2
<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO166	HC96	KJ451690	-
<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO167	HC97	KJ451691	-
<i>C. metapsilosis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO168	HC98	KJ451692	KJ451718
<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO169	HC99	KJ451693	-
<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO170	HC100	KJ451694	-
<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO171	HC101	KJ451695	-
<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO172	HC102	KJ451696	-
<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO173	HC103	KJ451697	-
<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO174	HC104	KJ451698	-
<i>C. orthopsilosis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO175	HC105	KJ451699	KJ451719
<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO176	HC106	KJ451700	-
<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO177	HC107	KJ451701	-
<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO178	HC108	KJ451702	-
<i>C. krusei</i>	Sangue	Brasil	LMICRO179	HC109	KJ451703	-
<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO180	HC110	KJ451704	KJ451720
<i>C. guilliermondii</i>	Sangue	Brasil	LMICRO181	HC111	KJ451705	-
<i>C. guilliermondii</i>	Sangue	Brasil	LMICRO182	HC112	KJ451706	-
<i>C. guilliermondii</i>	Sangue	Brasil	LMICRO183	E113	KJ451707	-
<i>C. tropicalis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO184	HC115	KJ451708	-
<i>C. glabrata</i>	Sangue	Brasil	LMICRO185	HC116	KJ451709	-
<i>C. glabrata</i>	Sangue	Brasil	LMICRO186	HC117	KJ451710	-
<i>C. pelliculosa</i>	Sangue	Brasil	LMICRO187	E118	KJ451711	-
<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	Brasil	LMICRO188	HC119	KJ451712	-
<i>C. pelliculosa</i>	Sangue	Brasil	LMICRO189	E120	KJ451713	-

-: SEM SEQUENCIAMENTO DE D1/D2

FONTE: O AUTOR (2014)

4.4.1 Análise filogenética e construção da árvore filogenética

Após a edição e depósito, as sequências foram comparadas com sequências referência do banco de dados do GenBank e a detecção de identidade pelo programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997). O alinhamento foi realizado com o auxílio do programa MAFFT (MISAWA; MIYATA, 2002) e inspeção visual com auxílio do programa MEGA versão 5.1 (TAMURA *et al.*, 2011).

Para a análise filogenética foram utilizados 80 isolados clínicos de leveduras do gênero *Candida* caracterizados molecularmente (TABELA 2), incluindo as linhagens referência (TABELA 1). Como grupo externo para comparação utilizou-se a sequência de *Neurospora crassa* (DANIEL *et al.*, 2001; DIEZMANN *et al.*, 2004; TSUI *et al.*, 2008). O melhor modelo evolutivo foi calculado pelo programa MEGA versão 5.1, assim como a construção das árvores filogenéticas baseada em Maximum Likelihood, utilizando análise de bootstrap com 1000 repetições (TAMURA *et al.*, 2011). A relação entre os isolados foi realizada

com os dados genéticos visualizados na árvore filogenética, dados clínicos e epidemiológicos.

Para a construção da árvore filogenética utilizou-se também sequências de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. tropicalis*, *C. famata*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia anomala*, *Clavispora lusitaniae*, *P. kudriavzevii* e *S. cereveisiae* depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para comparação com as sequências obtidas. Como grupo externo utilizou-se *Neurospora crassa*. A linhagem *C. albicans* ATCC 10231 (TABELA 1) também foi utilizada como referência para os testes de suscetibilidade “in vitro”.

4.4.2 GENOTIPAGEM DE *Candida albicans* – SISTEMA ABC

Para a determinação da genotipagem pelo sistema ABC, realizou-se a amplificação da região de interesse com o par de oligonucleotídeos iniciadores: CA-int-L (5'-ATAAGGGAAGTCGGCAAAATAGATCCGTAA-3') e CA-int-R (5'-CCTTGGCTGTGGTTTCGCTAGATAGTAGAT-3') descritos por McCullough *et al.* (1999b).

O genótipo A apresenta um fragmento de ~450 pb, genótipo B ~840 pb, genótipo C apresenta os dois produtos, uma banda de ~450 pb e outra de ~840 pb e o genótipo D apresenta um fragmento de ~1.080pb (McCullough *et al.*, 1999b).

4.5 TESTE DE MICRODILUIÇÃO

Os testes de suscetibilidade aos antifúngicos anfotericina B (Sigma-Aldrich Quimica, Madrid, Spain – antifúngico padrão); fluconazol (Sigma-Aldrich Quimica, Madrid, Spain – antifúngico padrão); micafungina (Mycamine®; Astellas Pharma Inc., Toyama, Japan – formulação comercial) e anidulafungina (Ecalta-Pfizer, Kent, United Kingdom – formulação comercial) foram realizados pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com as normas M27-A3 e M27-S3 estabelecidas pelo “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2008). Para o controle de qualidade do teste foi utilizada a linhagem *C. albicans* ATCC 10231, sensível à todos os antifúngicos testados. Os valores de CIM para equinocandinas

foram confirmados pelo Laboratório Especial de Micologia, laboratório de referência para os testes de suscetibilidade (LEMI – UNIFESP – São Paulo).

4.5.1 Preparo dos antifúngicos

Os antifúngicos foram diluídos seguindo as normas M27-A3 e M27-S3 do CLSI (CLSI, 2008). A partir das soluções padrões, foram preparadas 10 diluições com RPMI 1640 a fim de obter 10 concentrações decrescentes de cada droga, variando de 0,3 a 160µg/mL para as equinocandinas, 0,03 a 16µg/mL para anfotericina B e 0,125 a 64µg/mL para fluconazol, distribuídas nos poços 1 a 10 da microplaca.

4.5.2 Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo, os isolados previamente recuperados, foram repicados novamente em meio Ágar Sabouraud e incubados a 35°C±2 por 24 horas. Foram realizadas suspensões em solução salina (0,85%) para uma concentração final de $1,5 \times 10^8$ cels/mL. A partir desta concentração foram realizadas as diluições 1:5 em solução salina (0,85%) e desta, uma diluição 1:20 em RPMI 1640 para distribuição na placa de microdiluição.

4.5.3 Teste de microdiluição e Concentração Inibitória Mínima

Para a montagem do teste foram adicionados 100µL da diluição dos antifúngicos nos poços 1 a 10. Onde a primeira coluna corresponde a maior concentração da droga e a décima, a menor concentração. Cada um destes poços recebeu ainda 100µL do inóculo de levedura.

A coluna 11 correspondeu ao controle de crescimento, onde foram adicionados 100µL de RPMI e 100µL do inóculo. A décima segunda foi utilizada para o controle de esterilidade, nesta foi colocado apenas 200µL do meio de cultura. As placas foram incubadas a 35°C±2 por 48 horas. Após esse período de

incubação, a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada visualmente com um espelho invertido.

A CIM foi definida como a menor concentração de cada antifúngico, capaz de reduzir em 50% o crescimento da levedura para azólicos (fluconazol) e equinocandinas (micafungina e anidulafungina), e ausência de crescimento para poliênicos (anfotericina B) em comparação com o controle de crescimento. A interpretação das CIMs e pontos de corte para cada antifúngico e cada espécie foi considerada de acordo com a norma vigente do documento M27-S4 (CLSI, 2012), que leva em consideração cada espécie; no entanto, para as espécies não consideradas pela norma vigente, utilizou-se a norma anterior (M27-A3/M27-S3 - CLSI, 2008 – ANEXO 2).

5 RESULTADOS

5.1 EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS

O levantamento de todos os isolados resultou em um total de 430 isolados. Destes, 288 (67%) são de pacientes do Hospital de Clínicas/UFPR e 142 (33%) de pacientes de hospitais terciários privados de Curitiba-PR. Esta porcentagem dos hospitais terciários privados não representa a totalidade de episódios de candidemia destes hospitais, mas apenas os que foram enviados para o Laboratório de Micologia/HC durante o período de estudo.

A idade dos pacientes envolvidos com os episódios de candidemia, cujo material de análise resultou nos isolados, variou de 01 dia a 95 anos, com maior número de adultos (64,3%) na população do HC/UFPR e crianças (38,8%) no grupo dos hospitais terciários privados de Curitiba-PR (dado limitado visto o grande número de fichas sem informação da idade do paciente). A prevalência de idade entre as crianças foi de 01 ano (3,95% - 17 episódios) e entre os adultos 56 anos (2,55% - 11 episódios), para os dois grupos de hospitais. Em relação ao gênero pode-se observar que entre os dois grupos 222 (51,6%) dos pacientes eram do gênero masculino (TABELA 3).

TABELA 3 - DADOS DEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES DOS DOIS GRUPOS ABORDADOS

VARIÁVEIS	HC/UFPR		PRIVADOS	
Gênero	N	%	N	%
Feminino	135	47	66	46
Masculino	148	51	74	52
SI*	5	2	2	2
Grupo Etário				
Adulto	185	64,3	48	33,8
Criança	103	35,7	55	38,8
SI**	0	0	39	27,4

SI*: SEM INFORMAÇÃO DE GÊNERO; **SI****: SEM INFORMAÇÃO DE IDADE; **N**: NÚMERO DE INDIVÍDUOS.

FONTE: O AUTOR (2014)

Entre as espécies observou-se que *C. albicans* foi a mais isolada entre os pacientes do Hospital de Clínicas/UFPR, tanto em adultos quanto em crianças (55,2% e 40,7%, respectivamente). Entre os adultos, as espécies seguintes foram *C. glabrata* (14%), *C. parapsilosis* (13,6%), *C. krusei* (6,5%) e *C. tropicalis* (5,5%). Entre as crianças foram *C. parapsilosis* (35%), *C. tropicalis* (7,7%) e *C. guilliermondii* (5,8%) (TABELA 4).

Entre os isolados do grupo dos hospitais terciários privados de Curitiba-PR a espécie mais frequente foi *C. parapsilosis*, tanto em adultos quanto em crianças (43,8% e 50,9%, respectivamente). Seguido de *C. albicans* (14,5%) e *C. guilliermondii* (10,9%) entre as crianças; *C. glabrata* (20,8%) e *C. tropicalis* (12,5%) entre os adultos (TABELA 4).

TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Candida ISOLADAS DE SANGUE DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA DOS PACIENTES**

ESPÉCIES	CRIANÇAS				ADULTOS				SI			
	HC/UFPR		PRIVADOS		HC/UFPR		PRIVADOS		HC/UFPR		PRIVADOS	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>C. albicans</i>	42	40,7	8	14,5	102	55,1	4	8,3	-	-	13	33,4
<i>C. parapsilosis</i>	36	35	28	50,9	25	13,6	21	43,8	-	-	7	18
<i>C. glabrata</i>	5	4,8	-	-	26	14	10	20,8	-	-	3	7,7
<i>C. krusei</i>	2	2	1	1,9	12	6,5	1	2,1	-	-	2	5,1
<i>C. tropicalis</i>	8	7,7	5	9	10	5,5	6	12,5	-	-	7	18
<i>C. famata</i>	2	2	2	3,6	5	2,7	1	2,1	-	-	3	7,7
<i>C. guilliermondii</i>	6	5,8	6	10,9	4	2,1	1	2,1	-	-	1	2,5
<i>Candida sp.</i>	2	2	3	5,4	-	-	1	2,1	-	-	-	-
<i>C. pelliculosa</i>	-	-	1	1,9	1	0,5	3	6,2	-	-	2	5,1
<i>C. lusitaniae</i>	-	-	1	1,9	-	-	-	-	-	-	1	2,5
TOTAL	103	100	55	100	185	100	48	100	0	0	39	100

*IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DA ESPÉCIE

SI: SEM INFORMAÇÃO DE IDADE; N: NÚMERO DE ISOLADOS

FONTE: O AUTOR (2014)

A tabela 5 sumariza a comparação dos dados demográficos dos pacientes e dados microbiológicos dos isolados do presente estudo com os resultados encontrados em estudo anterior no mesmo hospital público, nos anos de 2001-2004.

TABELA 5 - COMPARAÇÃO DOS DADOS DEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES E DADOS MICROBIOLÓGICOS DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida* EM DIFERENTES PERÍODOS

Variáveis	2001-2004†	2005-2012‡
Idade (n.s.)		
Adultos	60	233
Crianças (≤ 14 anos)	40	158
Gênero (n.s.)		
Masculino	60	222
Feminino	40	201
Espécies (adulto**/criança**)		
<i>C. albicans</i>	33/26	106/50
<i>C. glabrata</i>	7/0	36/5
<i>C. parapsilosis</i>	3/6	46/64
<i>C. tropicalis</i>	12/3	16/13

* $p \leq 0,01$, n.s.: NÃO SIGNIFICATIVO

FONTE: †FRANÇA, RIBEIRO E QUEIROZ-TELLES, (2008); ‡O AUTOR (2014)

Não houve variação em relação a frequência de idade e gênero dos pacientes envolvidos com episódios de candidemia nos dois períodos de estudo. Quanto às espécies, observou-se que a frequência no período de 2001-2004 diferiu significativamente do período de 2005-2012, mas *C. albicans* continuou como a mais frequente entre os episódios de candidemia.

A identificação molecular corroborou os dados fenotípicos em 91,3% dos 80 isolados avaliados e caracterizados molecularmente neste estudo (TABELA 2). Apenas 07 isolados apresentaram discordância entre a identificação fenotípica com a identificação molecular (TABELA 6).

TABELA 6 - ISOLADOS QUE APRESENTARAM DISCORDÂNCIA ENTRE A IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA COM A IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

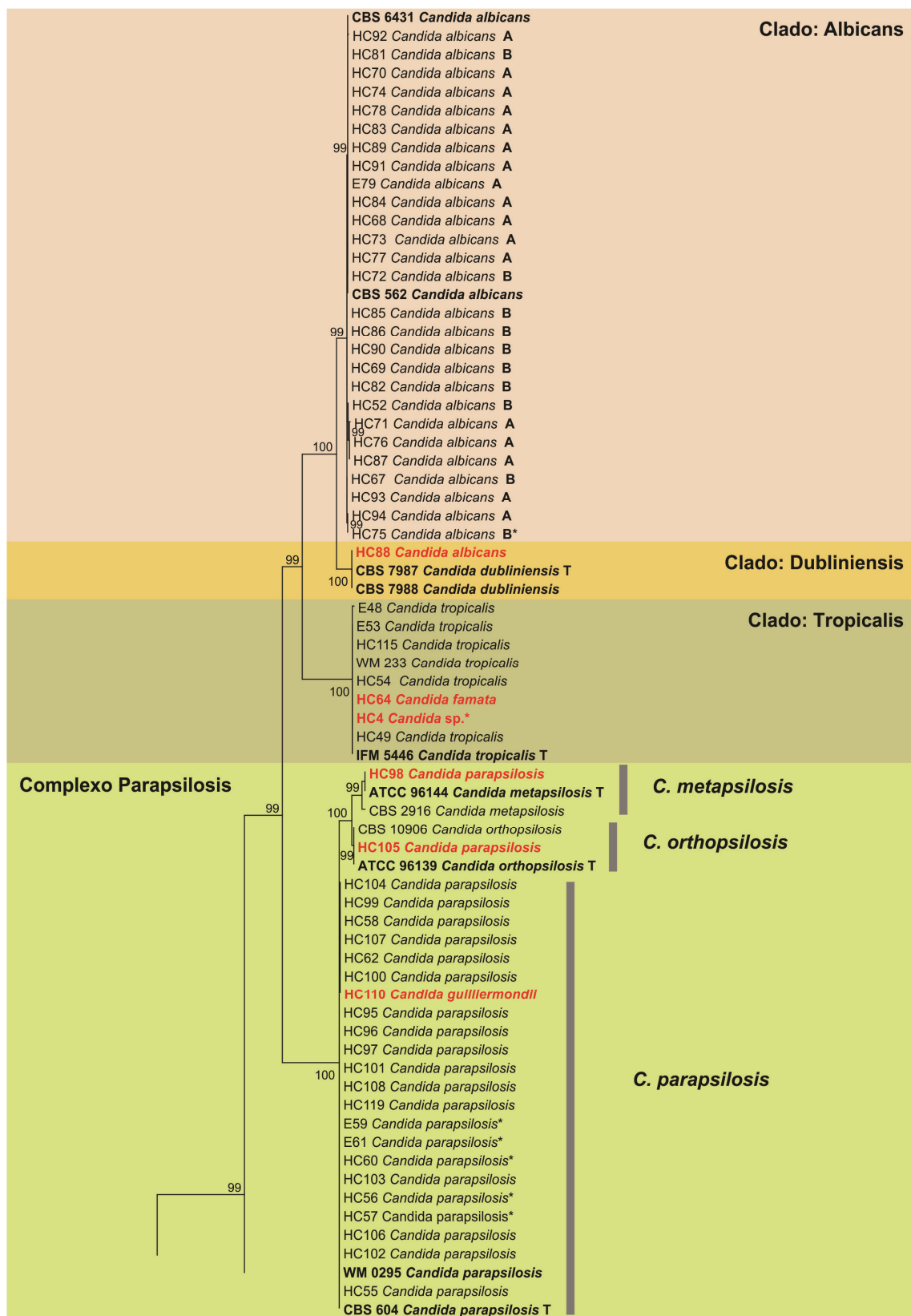
N° DE REFERÊNCIA	DEPÓSITO COLEÇÃO	ID* FENOTÍPICA	ID* MOLECULAR
HC4	LMICRO111	<i>Candida</i> sp.	<i>C. tropicalis</i>
HC63	LMICRO133	<i>C. famata</i>	<i>C. lusitaniae</i>
HC64	LMICRO134	<i>C. famata</i>	<i>C. tropicalis</i>
HC88	LMICRO158	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
HC98	LMICRO168	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>
HC105	LMICRO175	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>
HC110	LMICRO180	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. parapsilosis</i>

*ID: IDENTIFICAÇÃO **FONTE:** O AUTOR (2014)

De acordo com a análise de Maximum Likelihood com base no sequenciamento das regiões ITS, verificou-se que os isolados foram agrupados em nove diferentes clados denominados como Albicans, dubliniensis, Tropicalis, Complexo Parapsilosis, Glabrata, Pelliculosa, Guilliermondii, Lusitaniae e Krusei suportados com valores de bootstrap (FIGURA 1). O total de 863 sítios foi avaliado, destes, 340 pertenciam a sítios conservados, 502 sítios variáveis, 402 sítios parcimoniosos informativos e 100 sítios únicos. A frequência das bases foi 30,6% (T); 21,2% (C); 26,9% (A); 21,2% (G).

Pela análise de sequenciamento da região variável D1/D2 verificou-se que os isolados discordantes agruparam-se em quatro diferentes clados denominados como Complexo Parapsilosis, Tropicalis, Dubliniensis e Lusitaniae suportados com valores de bootstrap (FIGURA 2). O total de 598 sítios foi avaliado, 339 pertenciam a sítios conservados, 238 sítios variáveis, 178 sítios parcimoniosos informativos e 60 sítios únicos. A frequência de bases foi 26,1% (T); 17,2% (C); 27,2% (A); 29,6% (G).

Através das sequências obtidas dos isolados de *C. albicans*, avaliou-se 693 sítios, destes, 687 eram conservados e 5 variáveis, sendo que 3 foram parcimoniosos informativos e 2 de sítio único. A partir desta análise, observou-se baixa variabilidade genética entre os isolados do clado Albicans.



Continua

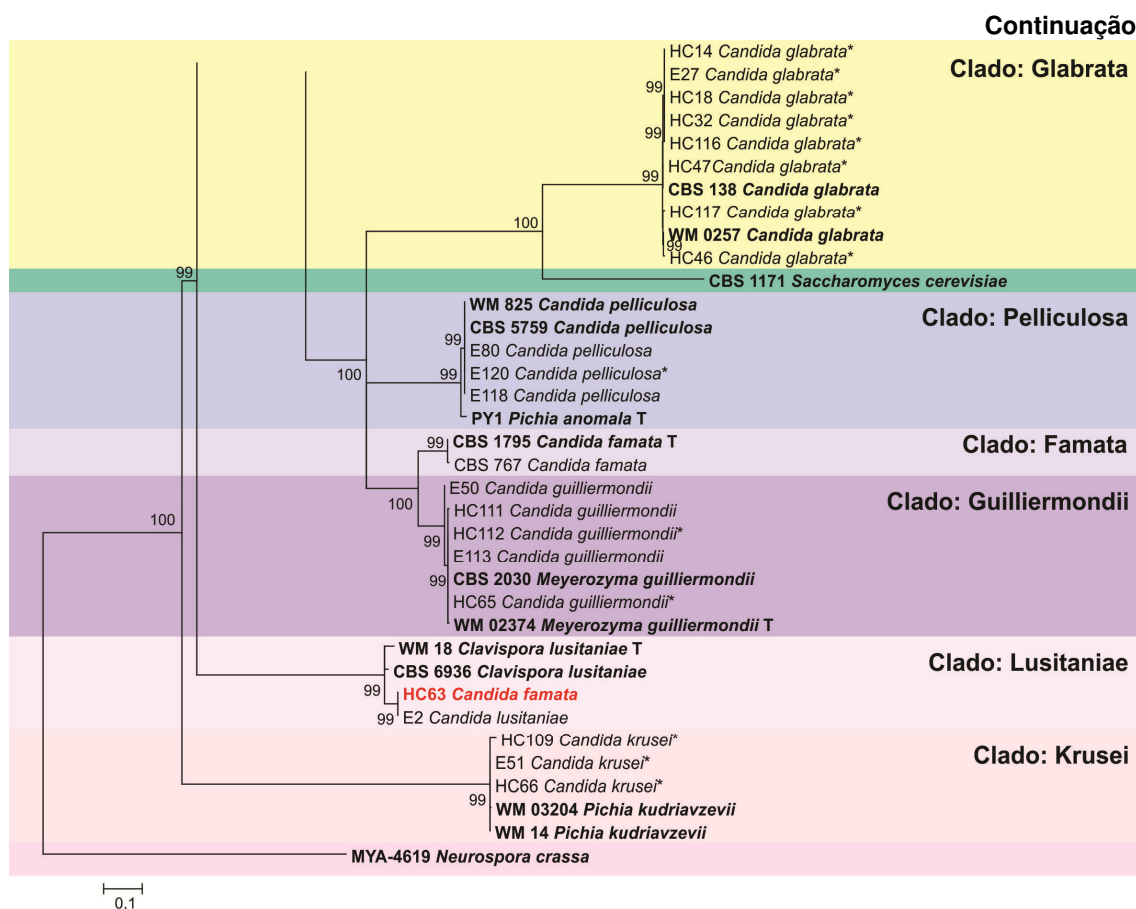


FIGURA 1- ÁRVORE FILOGENÉTICA DE MAXIMUM LIKELIHOOD BASEADA NO ALINHAMENTO DAS REGIÕES ITS E 5,8S DO rDNA, CONSTRUÍDO COM 1000 REPETIÇÕES, USANDO O MODELO EVOLUTIVO TAMURA 3-PARAMETROS COM DISTRIBUIÇÃO GAMA, USANDO O PROGRAMA MEGA VERSÃO 5.1. *Neurospora crassa* (MYA-4619) FOI UTILIZADO COMO GRUPO EXTERNO. A/B: GENÓTIPO DE *C. albicans*. *ISOLADOS COM ALTERAÇÃO NO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE. T: "TYPE STRAIN". VERMELHO: ISOLADOS COM IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DISCORDANTE DA FENOTÍPICA

FONTE: O AUTOR (2014)

A análise das sequências dos isolados do Complexo Parapsilosis resultou em um total de 696 sítios analisados, destes 657 foram conservados e 37 variáveis, dos quais 27 foram parcimoniosos informativos e 10 sítios únicos. Observaram-se diferenças consideráveis dentro do Complexo Parapsilosis, onde se observou a nítida divisão das três espécies deste complexo: *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*.

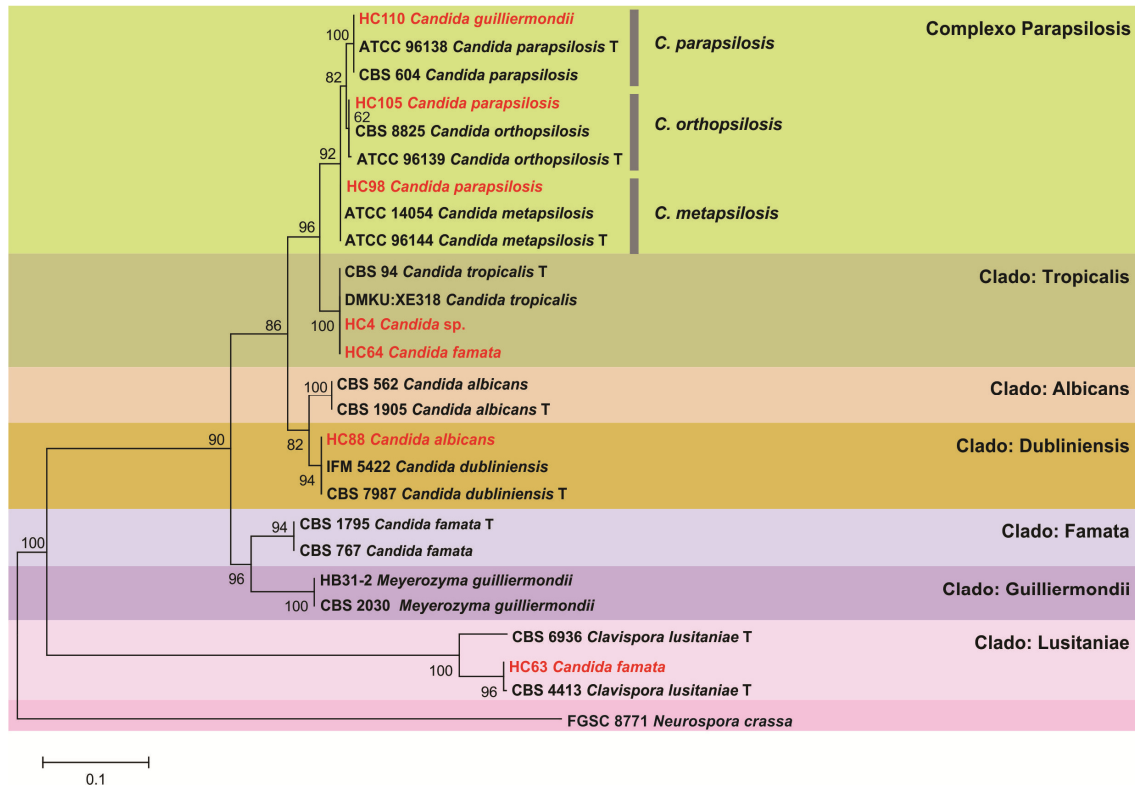


FIGURA 2- ÁRVORE FIOGENÉTICA DE MAXIMUM LIKELIHOOD BASEADA NO ALINHAMENTO DA REGIÃO D1/D2 DO rDNA, CONSTRUÍDA COM 1000 REPETIÇÕES, USANDO O MODELO EVOLUTIVO TAMURA-NEI COM DISTRIBUIÇÃO GAMA, USANDO O PROGRAMA MEGA VERSÃO 5.1. *Neurospora crassa* (FGSC 8771) FOI UTILIZADO COMO GRUPO EXTERNO. T: "TYPE STRAIN". VERMELHO: ISOLADOS COM IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DISCORDANTE DA FENOTÍPICA
FONTE: O AUTOR (2014)

A genotipagem de *C. albicans* pelo sistema ABC identificou a presença dos genótipos A e B entre os isolados estudados, com maior prevalência do genótipo A (62%) (FIGURA 3). Ambos foram suscetíveis aos antifúngicos testados com exceção de um isolado do genótipo B (LMICRO145) resistente ao fluconazol.

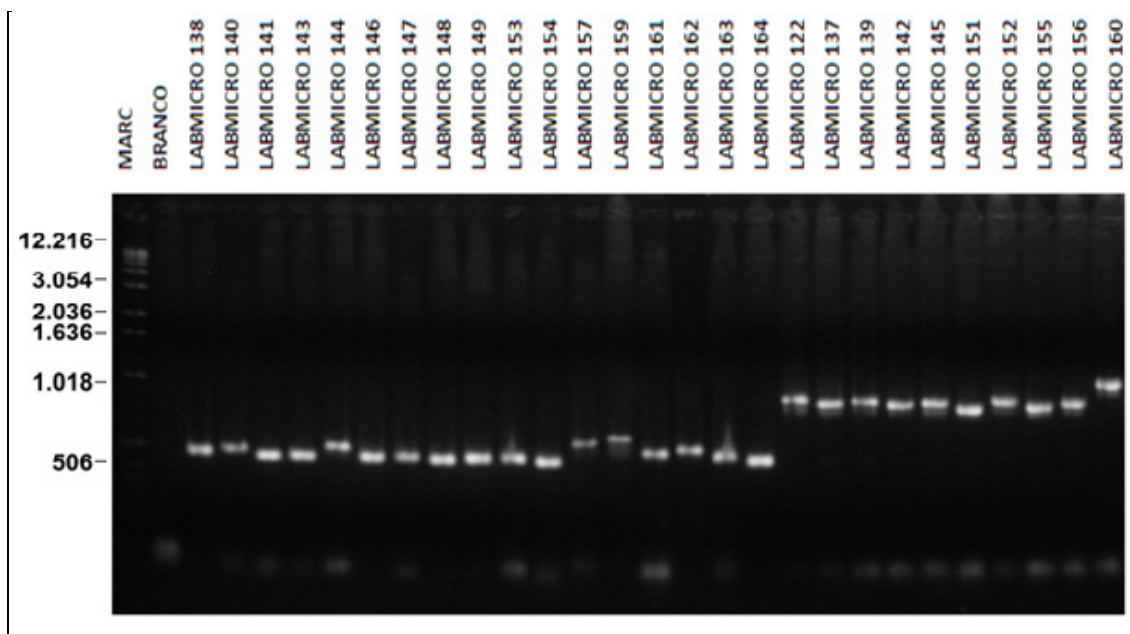


FIGURA 3- GENOTIPAGEM DOS ISOLADOS DE *Candida albicans* PELO SISTEMA ABC

5.2 SUSCETIBILIDADE “in vitro”

Com o estudo da suscetibilidade observou-se que a espécie *C. glabrata* apresentou o maior número de linhagens com perfil de resistência frente aos antifúngicos testados, onde se pode observar que 05 linhagens apresentaram resistência à micafungina e suscetibilidade intermediária à anidulafungina. Além disso, 07 apresentaram suscetibilidade dose-dependente ao fluconazol. A espécie *C. albicans* foi a mais suscetível, onde se verificou 01 linhagem resistente apenas ao fluconazol. Entre o Complexo Parapsilosis 05 linhagens da espécie *C. parapsilosis* apresentaram suscetibilidade intermediária à micafungina. As demais linhagens estudadas foram suscetíveis aos antifúngicos (TABELA 7).

Entre as linhagens de *C. glabrata*, 05 apresentaram resistência à micafungina. O isolado LMICRO116 apresentou resistência as duas equinocandinas e ao fluconazol, concomitantemente. A espécie *C. albicans* foi a que menos apresentou resistência, apenas o isolado LMICRO145 foi resistente ao fluconazol. *Candida parapsilosis* apresentou apenas perfil de suscetibilidade intermediária à micafungina em 05 isolados, os demais foram suscetíveis aos outros antifúngicos.

TABELA 7 - VARIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS (µg/mL) OBTIDAS DE ACORDO COM A ESPÉCIE DE *Candida* TESTADA

Espécies	Antifúngicos (no. testado)	No. de isolados por CIM (µg/mL)											
		0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
<i>C. albicans</i>	Anidulafungina (27)	-	2	-	24	1	-	-	-	-	-	-	-
	Micafungina (27)	6	17	3	-	-	-	1	-	-	-	-	-
	Anfotericina B (27)	-	2	3	14	8	-	-	-	-	-	-	-
	Fluconazol (27)	-	-	4	11	6	1	4	-	1	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	Anidulafungina (22)	-	1	1	1	11	6	2	-	-	-	-	-
	Micafungina (22)	-	-	-	-	3	6	8	5	-	-	-	-
	Anfotericina B (22)	-	1	-	14	7	-	-	-	-	-	-	-
	Fluconazol (22)	-	-	2	5	8	6	1	-	-	-	-	-
<i>C. metapsilosis</i>	Anidulafungina (1)	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
	Micafungina (1)	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
	Anfotericina B (1)	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
	Fluconazol (1)	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>C. orthopsilosis</i>	Anidulafungina (1)	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
	Micafungina (1)	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
	Anfotericina B (1)	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
	Fluconazol (1)	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	Anidulafungina (8)	-	-	-	7	-	-	1	-	-	-	-	-
	Micafungina (8)	2	1	-	4	-	1	-	-	-	-	-	-
	Anfotericina B (8)	-	-	-	3	5	-	-	-	-	-	-	-
	Fluconazol (8)	-	-	-	-	-	-	-	-	1	6	-	1
<i>C. tropicalis</i>	Anidulafungina (7)	-	3	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	Micafungina (7)	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-
	Anfotericina B (7)	-	1	1	3	2	-	-	-	-	-	-	-
	Fluconazol (7)	-	-	-	2	2	1	1	-	-	-	1	-
<i>C. guilliermondii</i>	Anidulafungina (5)	-	1	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-
	Micafungina (5)	-	-	-	-	-	1	2	2	-	-	-	-
	Anfotericina B (5)	-	-	-	1	4	-	-	-	-	-	-	-
	Fluconazol (5)	-	-	-	-	-	2	1	-	-	-	-	2
<i>C. krusei</i>	Anidulafungina (3)	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	Micafungina (3)	-	-	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-
	Anfotericina B (3)	-	-	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-
	Fluconazol (3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-
<i>C. pelliculosa</i>	Anidulafungina (3)	1	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	Micafungina (3)	-	-	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-
	Anfotericina B (3)	1	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-

Continua

		Continuação											
Espécies	Antifúngicos (no. testado)	No. de isolados por CIM (µg/mL)											
		0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
<i>C. lusitaniae</i>	Fluconazol (3)	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-
	Anidulafungina (2)	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	Micafungina (2)	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-
	Anfotericina B (2)	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	Fluconazol (2)	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>C. dubliniensis</i>	Anidulafungina (1)	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Micafungina (1)	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Anfotericina B (1)	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
	Fluconazol (1)	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-

AND: ANIDULAFUNGINA, **MCF:** MICAUFUNGINA, **AMB:** ANFOTERICINA B, **FLU:** FLUCONAZOL, **S:** SUSCETÍVEL, **SDD:** SUSCETIBILIDADE DOSE-DEPENDENTE, **I:** SUSCETIBILIDADE INTERMEDIÁRIA, **R:** RESISTENTE
FONTE: O AUTOR (2014)

Cinco isolados foram selecionados para serem enviados ao Laboratório Especial de Micologia (LEMI – UNIFESP – São Paulo) a fim de comparar as CIMs obtidas com as formulações comerciais de anidulafungina e micafungina utilizadas no presente estudo, com as CIMs dos antifúngicos padrões de anidulafungina e caspofungina (TABELA 8).

Para anidulafungina, formulação comercial e antifúngico padrão, 03 isolados (LMICRO113, LMICRO135 e LMICRO179) apresentaram os mesmos valores de CIM (TABELA 8). Os valores de CIM obtidos para os isolados LMICRO116 e LMICRO145 apresentaram pouca variação, entretanto isso não representou alteração na interpretação do perfil de suscetibilidade. Já para micafungina (formulação comercial), esta relação não pôde ser realizada diretamente, pois entre caspofungina (antifúngico padrão) e micafungina todos os valores de CIM foram diferentes. Mas estas diferenças não alteraram a interpretação do perfil de suscetibilidade dos isolados LMICRO113, LMICRO116 e LMICRO145.

TABELA 8 - COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA REALIZADA COM EQUINOCANDINAS FORMULAÇÃO COMERCIAL E ANTIFÚNGICO PADRÃO

	CIM (µg/mL) Formulação comercial*		CIM (µg/mL) Antifúngico padrão**	
	AND	MCF	AND	CSP
LMICRO113	0,25	0,25	0,25	0,5
LMICRO116	2,0	0,25	1,0	1,0
LMICRO135	2,0	4,0	2,0	1,0
LMICRO145	0,25	0,06	0,03	0,03
LMICRO179	0,25	0,25	0,25	0,5

*TESTE COM FORMULAÇÃO COMERCIAL DE EQUINOCANDINAS REALIZADA NO PRESENTE ESTUDO. **TESTE COM O ANTIFÚNGICO PADRÃO DE EQUINOCANDINAS REALIZADA PELO LEMI

FONTE: O AUTOR (2014)

5.2.1 Isolados de *Candida* resistentes

Os isolados que apresentaram resistência a pelo menos um antifúngico (LMICRO112, LMICRO113, LMICRO115, LMICRO116, LMICRO117, LMICRO135 e LMICRO145) foram avaliados quanto a relação entre os dados clínicos e os valores de CIM obtidos (TABELA 9).

O paciente do isolado LMICRO112, gênero feminino, nascimento em 01/08/46, foi internada no dia 02/09/06 na unidade de cirurgia geral devido à um quadro de suboclusão intestinal. O paciente foi submetido a sigmoidectomia e colostomia terminal no dia 04/09/06, havendo evolução para necrose intestinal sendo necessária a retirada da área necrosada, nova colostomia e cecostomia descompressiva em 11/09/06. No dia 19/09/06 foi submetida à ventilação mecânica e no mesmo dia uma amostra de sangue foi coletada para a realização da hemocultura e início de tratamento com piperacilina, tazobactam e vancomicina por sepse bacteriana, e fluconazol por peritonite. No dia 21/09/06 apresentou choque séptico, disfunção renal, parada cardíaca irreversível que resultou em óbito, antes que se soubesse do resultado da hemocultura. Apesar da paciente já estar sob tratamento com fluconazol há três dias, este foi prescrito para outra condição e não para candidemia, por este motivo não foi possível determinar a resposta ao tratamento. O resultado da hemocultura foi positivo para *C. glabrata*, com resultado emitido dia 29/09/06.

TABELA 9 - CORRELAÇÃO ENTRE OS DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES E O PERFIL DE SUSCETIBILIDADE “IN VITRO” DOS ISOLADOS TESTADOS

ISOLADO	DOENÇA ASSOCIADA DO PACIENTE	TRATAMENTO	REPOSTA	PERFIL DE SUSCETIBILIDADE
LMICRO112 <i>C. glabrata</i>	Subocclusão intestinal, cirurgia abdominal	FLU	Indeterminado	AND (I) MCF (R) AMB (S) FLU (SDD)
LMICRO113 <i>C. glabrata</i>	Doença metabólica, cirurgia abdominal	FLU	Favorável	AND (I) MCF (R) AMB (S) FLU (SDD)
LMICRO115 <i>C. glabrata</i>	Doença de Crohn, adenocarcinoma tubular	Sem tratamento*	-	AND (I) MCF (R) AMB (S) FLU (SDD)
LMICRO116 <i>C. glabrata</i>	Tumor de Burkitt, diálise	AMB	Favorável	AND (R) MCF (R) AMB (S) FLU (R)
LMICRO117 <i>C. glabrata</i>	Úlcera gástrica, doença diverticular, cirurgia abdominal	Sem tratamento**	-	AND (I) MCF (R) AMB (S) FLU (SDD)
LMICRO135 <i>C. guilliermondii</i>	LLA, transplante de medula óssea	FLU, voriconazol	Indeterminado	AND (S) MCF (I) AMB (S) FLU (R)
LMICRO145 <i>C. albicans</i>	Anomalia anorretal, cirurgia abdominal	FLU+AMB	Favorável	AND (S) MCF (S) AMB (S) FLU (R)

*: OBITO ANTES DO INÍCIO DO TRATAMENTO; **: CANDIDEMIA TRANSITÓRIA;
INDETERMINADO: ÓBITO; **LLA:** LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA
FONTE: O AUTOR (2014)

O paciente do isolado LMICRO113, gênero masculino, nascimento em 18/01/07, foi internado no dia 25/02/07 na unidade de terapia intensiva pediátrica, com indicação de má rotação intestinal, fenilcetonúria, hemoglobinopatia e hipotireoidismo congênito. Recebeu nutrição parenteral prolongada e várias infusões de hemácias, plaquetas e plasma. Foi detectada infecção de cateter por *Staphylococcus* coagulase negativo, iniciou tratamento com vancomicina e troca de cateter. Detectaram-se aderências de alça, hérnia interna e estenose de jejuno necessitando de cirurgia para correções. Após este procedimento houve piora do quadro infeccioso e crescimento de *Klebsiella pneumoniae* na hemocultura,

associou-se imipenem à vancomicina. No dia 31/03/07 foi coletada uma amostra de sangue para a realização de hemocultura, com resultado positivo para *C. glabrata*, recebendo tratamento com fluconazol no dia 02/04/07. No dia 10/04/07 continuou com hemocultura positiva para *C. glabrata*, que negativou em 16/04/07. Ainda no dia 16/04/07 recebeu nistatina para tratamento de micose superficial. Dia 17/04/07 recebeu alta com transferência para hospital da cidade natal, com a orientação de continuar o tratamento com fluconazol.

Paciente do isolado LMICRO115, gênero masculino, nascimento em 06/09/83, foi internado dia 23/03/09 na unidade de cirurgia geral, é portador de doença de Crohn, adenocarcinoma tubular infiltrativo, tumor sigmóide, metástase em 2/3 dos linfonodos, cirrose hepática e colangite esclerosante. No dia 23/04/09 suspeitou-se de metástase hepática, dia 27/04/09 laudo da imagenologia confirmou presença de nódulo no fígado. Dia 06/07/09 biópsia confirmou a presença de hepatocarcinoma, e o paciente apresentou piora clínica progressiva desde então. No dia 28/09/09 foi solicitado hemocultura e dia 29/09/09 iniciou quadro de candidíase oral. Dia 01/10/09 o paciente foi a óbito antes do início do tratamento para candidemia, pois o resultado foi liberado apenas dia 10/10/09.

O paciente do isolado LMICRO116, gênero masculino, nascimento em 17/11/86, foi internado no dia 03/01/12 na unidade quimioterapia de alto risco, paciente portador de tumor de Burkitt, neutropenia febril e mucosite. No dia 06/01/12 iniciou tratamento com micafungina terapêutica. Dia 15/01/12 foi coletada amostra de sangue para a realização de hemocultura, que foi positiva para *C. glabrata*, permanecendo positiva até o dia 18/01/12. Dia 21/01/12 iniciou tratamento de mucosite com nistatina. Dia 22/01/12 foi coletada uma nova amostra de sangue para hemocultura, esta continuava positiva para *C. glabrata*. Dia 26/01/12 retirou-se micafungina e iniciou-se o tratamento com anfotericina B, no dia 31/01/12 a hemocultura foi negativa. O paciente recebeu alta no dia 13/02/12, com retorno marcado em duas semanas.

Paciente do isolado LMICRO117, gênero feminino, nascimento em 20/10/43, foi internado dia 13/05/11 na unidade de clínica geral, com indicação de úlcera gástrica com a presença de hemorragia, além de apresentar hipertensão arterial, diabetes e doença diverticular. Realizou gastrectomia parcial dia 16/06/11, iniciou uso de antibióticos e necessitou de cateter venoso central. Entre os dias 18/05/11 a 16/06/11 recebeu tratamento de micose superficial com nistatina, no

mesmo dia 16/06/11 foi coletado sangue de cateter para a realização de hemocultura. A paciente recebeu alta no dia 29/06/11. Este episódio de candidemia pode ter sido transitório como resultado de colonização do cateter, visto que a paciente não apresentava qualquer sintoma associado à candidemia. Paciente não recebeu tratamento para a candidemia transitória.

O paciente do isolado LMICRO135, gênero masculino, nascimento em 30/04/91, foi internado dia 03/11/11, na unidade de quimioterapia de alto risco, paciente possui leucemia linfocítica aguda e neutropia grave. Dia 05/11/11 iniciou tratamento com fluconazol por infecção superficial por *Candida*. Dia 07/11/11 iniciou radioterapia e foi submetido à transplante de medula óssea no dia 11/11/11. Evoluiu para um quadro de mucosite grau 4 no dia 17/11/11, recebendo tratamento com meropenem e vancomicina. No dia 21/11/11 apresentou lesões de pele sugestivas de fusariose e lesões em face, axilas e região genital sugestivas de queimadura por radiodermite. Dia 27/11/11 iniciou insuficiência respiratória, necessitando de ventilação mecânica. Solicitaram hemocultura de sangue de cateter em 28/11/11 positivo para *Fusarium* sp., e nos dias 29 e 30/11/11 a hemocultura foi positiva para *C. guilliermondii*. Dia 30/11/11 iniciaram tratamento para fusariose com voriconazol, mas no dia 02/12/11 houve piora da insuficiência respiratória, redução do volume de diurese, hipotensão refratária sem resposta, resultando em óbito. No ano de 2010 o paciente também foi internado, onde foi exposto ao fluconazol por 25 dias.

O paciente do isolado LMICRO145, gênero feminino, nascimento em 25/02/10, foi admitido dia 03/03/10 na unidade de cirurgia pediátrica por apresentar anomalia anorretal com fístula retovesicular, diagnosticado também dextrocardia. No dia 08/03/10 iniciou nistatina para o tratamento de candidíase oral. Dia 11/03/10 fez cirurgia de anoretoplastia sagital posterior e dia 25/03/10 foi submetida a enteroanastomose duodenal de apendicectomia. No dia 29/03/10 iniciou tratamento com fluconazol profilático que foi suspenso no dia 07/04/10. Dia 10/04/10 fez outra cirurgia de enteroanastomose duodenal. Dia 12/04/10 apresentou hemocultura positiva para *Staphylococcus* coagulase negativo recebendo tratamento com vancomicina, piperacilina e tazobactam. No dia 15/04/10 foi coletada uma nova amostra de sangue para hemocultura, esta positivou no dia 18/04/10. Dia 19/04/10 recebeu tratamento para candidemia com a associação de anfotericina B e fluconazol. Outra hemocultura foi solicitada e apresentou-se negativa no dia

26/04/10, neste dia, a anfotericina B foi suspensa e fluconazol foi mantido. O paciente recebeu alta no dia 18/05/10 com retorno ambulatorial agendado.

Observou-se em relação à resposta clínica ao tratamento e os resultados dos testes de suscetibilidade “in vitro” que o isolado LMICRO116 (*C. glabrata*) foi obtido de um paciente que durante o tratamento com micafungina (MCF) permanecia com hemoculturas positivas e após a substituição para anfotericina B apresentou sucesso terapêutico. Os testes de suscetibilidade revelaram que este isolado era resistente à MCF e a anidulafungina e suscetível à anfotericina B.

6 DISCUSSÃO

A frequência de micoses invasivas por fungos oportunistas tem aumentado significativamente ao longo dos últimos anos, e mais de 17 espécies diferentes de *Candida* foram identificadas como agentes etiológicos de infecções da corrente sanguínea (PFALLER; DIEKEMA, 2004).

Quando se compara a distribuição das espécies associadas aos episódios de candidemia ocorridos no HC/UFPR, observa-se que a distribuição de espécies se manteve no decorrer dos anos, mas com diferentes frequências nos períodos de estudo. Sendo *C. albicans* a espécie mais frequentemente isolada (40,7% em crianças e 55,1% em adultos), *C. parapsilosis* (35%) com predomínio entre as crianças e *C. glabrata* (13,6%) entre os adultos. O mesmo foi observado no período anterior a este estudo por França, Ribeiro e Queiroz-Telles (2008). Entre os hospitais privados, a distribuição das espécies diferiu do HC/UFPR, apresentando *C. parapsilosis* como mais frequente em adultos (43,8%) e crianças (50,9%), seguido de *C. glabrata* (20,8%) e *C. tropicalis* (12,5%) em adultos e *C. albicans* (14,5%) e *C. guilliermondii* (10,9%) em crianças. Este dados diferem de Colombo *et al.* (2013), que obtiveram *C. albicans* como a mais prevalente em ambos os grupos (hospital público (35%), hospital privado (33%)), seguida das espécie *C. parapsilosis* (33%) e *C. tropicalis* (20%) nos hospitais públicos e *C. tropicalis* (29%) e *C. parapsilosis* (16%) nos privados. O motivo para essa mudança é que os isolados oriundos de hospitais privados não correspondem a totalidade de episódios de candidemia ocorridos neste período nos hospitais privados, pois o presente estudo considerou apenas os foram depositados na micoteca do Hospital de Clínicas/UFPR.

A espécie *C. albicans* ainda é considerada a causa mais comum de candidemia em hospitais terciários brasileiros, com frequência de aproximadamente 40% dos episódios (PASSOS *et al.*, 2007; FRANÇA; RIBEIRO; QUEIROZ-TELLES, 2008; GIRÃO *et al.*, 2008; NUCCI *et al.*, 2013), os resultados obtidos a partir deste estudo corroboram esta evidência. Entretanto, tem-se observado um aumento de infecções causadas por espécies de *Candida* não-*albicans*, destacando *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (COLOMBO *et al.*, 2006; COLOMBO *et al.*,

2007; XAVIER *et al.*, 2008; GIRÃO *et al.*, 2008; PFALLER *et al.*, 2011; NUCCI *et al.*, 2013). Estas espécies também foram encontradas pelo presente estudo.

Existe uma dificuldade na identificação rotineira de espécies agrupadas em complexos ou que apresentam semelhanças morfológicas e bioquímicas com outras espécies (COLOMBO *et al.*, 2012; MOTA *et al.*, 2012; XAFRANSKI *et al.*, 2013), havendo necessidade de complementação da identificação através de métodos moleculares. Neste estudo isto foi observado para os isolados do Complexo Parapsilosis e as espécies *C. dubliniensis* e *C. lusitanae*, confirmando assim, a necessidade de complementação da identificação presuntiva com a molecular (TABELA 6).

A precisa diferenciação das espécies do Complexo Parapsilosis é necessária, uma vez que estas apresentam variações quanto ao perfil de suscetibilidade aos antifúngicos (VAN ASBECK *et al.*, 2008; LOCKHART *et al.*, 2008). Observou-se que os isolados da espécie *C. parapsilosis* apresentaram suscetibilidade intermediária à micafungina, corroborando os dados da literatura que sugerem menor suscetibilidade de *C. parapsilosis* em relação às demais espécies do complexo (LOCKHART *et al.*, 2008; CANTÓN *et al.*, 2011; GARCIA-EFFRON *et al.*, 2012). Os resultados do presente estudo mostraram que os valores de CIM para anfotericina B entre as três espécies do Complexo Parapsilosis foram semelhantes. No entanto, Lockart *et al.* (2008) observaram valores de CIM mais elevados para *C. parapsilosis*. Isto reforça a importância da realização de testes de suscetibilidade “in vitro” para monitorar os valores de CIMs para diferentes antifúngicos permitindo identificar e caracterizar o surgimento de patógenos resistentes, contribuindo para uma indicação segura da terapia.

Os isolados de *C. parapsilosis* do presente estudo com sensibilidade intermediária, foram provenientes de crianças com malignidades hematológicas, que fizeram transplante de medula óssea ou que faziam uso de antibióticos. Esta espécie é frequentemente relacionada com infecções em pacientes neonatos, prematuros, uso de antibióticos de amplo espectro, uso de cateter venoso central e nutrição parenteral total (MIRANDA *et al.*, 2012), pois é capaz de proliferar e aderir melhor a superfícies acrílicas que as outras espécies de *Candida* (LEVY *et al.*, 1998).

A genotipagem ABC dos isolados de *C. albicans* foi incluída no estudo para fornecer mais dados discriminatórios à respeito desta espécie. O genótipo A é

mais frequentemente identificado a partir de isolados clínicos, além de estar relacionado com menor suscetibilidade ao antifúngico flucytosina (McCULLOUGH *et al.*, 1999a; McCULLOUGH *et al.*, 1999b; ABDULRAHN *et al.*, 2013). Da mesma forma que nos estudos anteriores, os resultados deste trabalho mostraram que o genótipo A predominou entre os isolados analisados, e verificou-se que independente do genótipo, todos foram suscetíveis aos antifúngicos testados, com exceção de um isolado do genótipo B que apresentou resistência ao fluconazol. O fluconazol tem atividade terapêutica satisfatória frente a esta espécie e tem sido utilizado para a prevenção e tratamento de candidíase sistêmica por muitos anos, nestes casos a suscetibilidade ao fluconazol pode atingir 95%, sendo eficaz contra a maioria dos casos de infecção por esta espécie (YING *et al.*, 2013). Entretanto, o uso repetitivo e prolongado para o tratamento de infecções crônicas e seu uso profilático tem favorecido o aparecimento de isolados de *C. albicans* resistentes.

As infecções por *C. glabrata* estão aumentando nos últimos anos, isso está aparentemente relacionado com o elevado uso de fluconazol nos hospitais e a ocorrência de isolados resistentes a este antifúngico (PASQUALOTTO *et al.*, 2008). Consequentemente, as equinocandinas foram recentemente indicadas como primeira linha de escolha para o tratamento de candidemia (COLOMBO *et al.*, 2012), mas tem sido observado isolados da espécie *C. glabrata* resistentes a esta classe de antifúngico (HEALEY *et al.*, 2011). No presente estudo esta foi a espécie com o maior número de isolados com resistência antifúngica, apresentando resistência ao fluconazol e às equinocandinas. Um destes isolados (*C. glabrata* HC46), com perfil de resistência elevado foi utilizado por Bizerra *et al.* (2014) para a investigação de mutações envolvidas com as resistências observadas. Os autores confirmaram a presença de uma mutação pontual no gene FKS2 na posição S663F, conferindo a produção de uma enzima D-glucano 1,3- β -sintase com sensibilidade reduzida à ação das equinocandinas, e forte potencial de falha terapêutica.

No período de 2001-2004 no HC/UFPR observou-se somente SDD aos antifúngicos testados para as espécies *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. pelliculosa* (FRANÇA; RIBEIRO; QUEIROZ-TELLES, 2008). No presente trabalho observou-se que houve isolados de *C. krusei* com SDD ao FLU, para a espécie *C. glabrata* além do perfil de SDD ao FLU, observou-se R ao FLU e suscetibilidade intermediária e resistência à MCF e AND. Além disso, outras espécies apresentaram valores de CIM altos como *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis*, dados

que não haviam sido relatados em estudo anterior realizado no mesmo hospital (FRANÇA; RIBEIRO; QUEIROZ-TELLES, 2008). Esta diminuição da suscetibilidade aos antifúngicos se deve ao aumento no uso de terapias profiláticas e empíricas com fluconazol e equinocandinas nos últimos anos.

Os isolados da espécie *C. guilliermondii* que apresentaram suscetibilidade intermediária à MCF e resistência ao FLU pertenciam ao mesmo paciente, que apresentava leucemia linfocítica aguda e passou por transplante de medula óssea, recebeu tratamento com fluconazol por apresentar infecção superficial por *Candida*, e voriconazol por apresentar fusariose. Esta resistência observada ao fluconazol pode ter sido decorrente do contato com o antifúngico durante o tratamento da infecção superficial por *Candida*, como também a associação com voriconazol, levando a resistência cruzada entre as duas drogas, dados observados também por Colombo *et al.* (2006).

Comparando-se os testes de suscetibilidade com a formulação comercial das equinocandinas (AND e MCF) e o antifúngico padrão (AND e CSP) pode-se observar que embora houvesse variação na CIM para AND em dois isolados (HC46 e HC75) a interpretação do perfil de suscetibilidade apresentou-se igual. Em relação à MCF não foi possível realizar uma comparação adequada, pois não foi realizado um teste de comparação com o antifúngico padrão de MCF, mas apenas com AND e CSP. De qualquer forma, comparando a interpretação do perfil de suscetibilidade entre MCF e CSP, pode-se observar que apesar dos valores de CIMs serem variáveis, a interpretação foi igual em três isolados analisados (HC18, HC46 e HC75). Embora pertença a mesma classe antifúngica, a caspofungina costuma apresentar valores de CIM até quatro vezes mais altos que AND e MCF (ESPINEL-INGROFF; CANTÓN, 2011).

7 CONCLUSÃO

Os dados analisados, nos dois períodos compreendidos, neste estudo mostraram diferenças microbiológicas nos episódios de candidemia. Porém, a espécie *C. albicans* continua como a mais frequente, e entre as espécies *Candida* não-albicans, *C. glabrata* continua sendo a mais prevalente em adultos e *C. parapsilosis* em crianças.

Os resultados indicaram a necessidade de complementar, por meio de marcadores moleculares, a identificação de espécies com grande semelhança morfológica e bioquímica com outras espécies, como *C. dubliniensis*, assim como aquelas agrupadas dentro de complexos, como o Complexo Parapsilosis, verificado neste estudo, uma vez que estas não puderam ser identificadas de forma precisa pelos marcadores fenotípicos, normalmente adotados como critérios de identificação de rotina.

A maioria dos isolados das diferentes espécies de *Candida* identificadas neste trabalho apresentarem-se suscetíveis aos antifúngicos testados. Entretanto, a espécie *C. glabrata* apresentou o maior número de isolados resistentes às equinocandinas. Observou-se também que espécies não envolvidas com resistência antifúngica em um período anterior, foram resistentes no período deste estudo. Isto se deve ao aumento no uso de terapias profiláticas e empíricas com fluconazol e equinocandinas.

De acordo com os resultados, a caracterização molecular, juntamente com os testes de suscetibilidade apresentam importante papel no direcionamento para o tratamento dos episódios de candidemia.

REFERÊNCIAS

- ABDULRAHIM, M.H.; MCMANUS, B.A; FLINT, S.R.; COLEMAN, D.C. Genotyping *Candida albicans* from *Candida Leukoplakia* and Non-*Candida Leukoplakia* shows no enrichment of multilocus sequence typing clades but enrichment of ABC genotype C in *Candida Leukoplakia*. **PloS one**, v.8, n.9, p.e73738, 2013.
- ALEXANDER, B.D.; JOHNSON, M.D.; PFEIFFER, C.D.; JIMÉNEZ-ORTIGOSA, C.; CATANIA, J.; BOOKER, R.; CASTANHEIRA, M.; MESSER, S.A.; PERLIN, D.S.; PFALLER, M.A. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated MIC. **Clinical Journal Diseases**, v.56, n.12, p.1724-1734, 2013.
- ALMEIDA, J.N.; MOTTA, A.L.; ROSSI, F.; ABDALA, E.; PIERROTTI, L.C.; KONO, A.S.G.; DIZ, M.D.P.E.; BENARD, G.; DEL NEGRO, G.M.B. First report of a clinical isolate of *Candida haemulonii* in Brazil. **Clinics**, v.67, n.10, p.1229-1231, 2012.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389- 3402, 1997.
- ANDES, D.R. et.al. Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: a patient-level quantitative review of randomized trials. **CID**. v.54, p.1110-1122, 2012.
- AQUINO, V.R; LUNARDI, L.W; GOLDANI, L.Z; BARTH, A.L. Prevalence, Susceptibility Profile for Fluconazole and Risk Factors for Candidemia in a Tertiary Care Hospital in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.9, n.5, p.411-418, 2005.
- ARAUJO, M.R.E. Hemocultura: recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados. **J Infect Control**, v.1, n.1, p.08-19, 2012.
- AVNI, T.; LEIBOVICI, L.; PAUL, M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic Review and meta-analysis. **Journal of clinical microbiology**. p.665–670, 2011.
- BASSETTI, M.; TARAMASSO, L.; NICCO, E.; MOLINARI, M.P.; MUSSAP, M.; VISCOLI, C. Epidemiology, Species Distribution, Antifungal Susceptibility and Outcome of Nosocomial Candidemia in a Tertiary Care Hospital in Italy. **PLoS One**. v.6, n.9, p.1-6, 2011.
- BALASHOV, S.V.; PARK, S.; PERLIN, D.S. Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin in *Candida albicans* by profiling mutations in *FKS*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.6, p.2058–2063, 2006.

BEN-AMI, R.; GARCIA-EFFRON, G.; LEWIS, R.E.; GAMARRA, S.; LEVENTAKOS, K.; PERLIN, D.S.; KONTOYIANNIS, D.P. Fitness and virulence costs of *Candida albicans* FKS1 hot spot mutations associated with echinocandin resistance. **The Journal of Infectious Diseases**, v.204, p.626-635, 2011.

BIZERRA, F.C.; JIMENEZ-ORTIGOSA, C.; SOUZA, A.C.R.; BREDÁ, G.L.; QUEIROZ-TELLES, F.; PERLIN, D.S.; COLOMBO, A.L. Breakthrough candidemia due to multidrug resistant *C. glabrata* during prophylaxis with low dose of micafungin. **AAC**, v.58, n.4, p.2438-2440, 2014.

BLYTH, C.C. *et.al.* Not Just Little Adults: Candidemia Epidemiology, Molecular Characterization, and Antifungal Susceptibility in Neonatal and Pediatric Patients. **Pediatrics**. n.123, p.1360-1368, 2009.

BORMAN, A. M.; LINTON, C. J.; OLIVER, D. *et al.* Pyrosequencing analysis of 20 nucleotides of internal transcribed spacer 2 discriminates *Candida parapsilosis*, *Candida metapsilosis*, and *Candida orthopsilosis*. **Journal of clinical microbiology**, v.47, n.7, p.2307–10, 2009.

BOSCO-BORGEAT, M.E.; TAVERNA, C.G.; CORDOBA, S.; ISLA, M.G.; MURISENGO, O.A.; SZUSZ, W.; VIVOT, W.; DAVEL, G. Prevalence of *Candida dubliniensis* Fungemia in Argentina: Identification by a Novel Multiplex PCR and Comparison of Different Phenotypic Methods. **Mycopathologia**. n.172, p.407–414, 2011.

BOYANTON, B.L.; LUNA, R.A.; FASCIANO, L.R.; MENNE, K.G.; VERSALOVIC, J. DNA Pyrosequencing–based identification of pathogenic *Candida* species by using the internal transcribed spacer 2 region. **Arch Pathol Lab Med.**, v.132, p.667-674, 2008.

BRIDGE, P.D.; SPOONER, B.M.; ROBERTS, P.J. The impact of molecular data in fungal systematic. **Advances in Botanical Research**, v. 42, p.34-68, 2005.

CALDERONE, R.A.; FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v.9, n.7, p.327-335, 2001.

CANTÓN, E.; PEMÁN, J.; QUINDÓS, G. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, n.12, p.5590–5596, 2011.

CANTÓN, E.; PERMÁN, J.; HERVÁS, D.; ESPINEL-INGROFF, A. Examination of the in vitro fungicidal activity of echinocandins against *Candida lusitanae* by time–killing methods. **J Antimicrob Chemother.** v.68, p.864–868, 2013.

CAREY, A.J.; SAIMAN, L.; POLIN, R.A. Hospital-acquired infections in the nicu: epidemiology for the new millennium. **Clin Perinatol.** 2008. 35:223-49.

CARVALHO, V.O.; OKAY, T.S.; MELHEM, M.S.C.; SZESZS, M.W.; DEL NEGRO, G.M.B. The new mutation L321F in *Candida albicans* ERG11 gene may be associated with fluconazole resistance. **Rev Iberoam Micol.**, v.30, n.3, p.209-212, 2013.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L.A. Accidental virulence, cryptic pathogenesis, martians, lost hosts, and the pathogenicity of environmental microbes. **Eukaryotic Cell**, v.6, n.12, p.2169–2174, 2007.

CASTANHEIRA, M.; WOOSLEY, L.N.; DIEKEMA, D.J.; MESSER, S.A.; JONES, R.N.; PFALLER, M.A. Low Prevalence of *fkp1* Hot Spot 1 Mutations in a Worldwide Collection of *Candida* Strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, n.6, p.2655–2659, 2010.

CENDEJAS-BUENO, E.; GOMEZ-LOPEZ, A.; MELLADO, E.; RODRIGUEZ-TUDELA, L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Identification of pathogenic rare yeast species in clinical samples: comparison between phenotypical and molecular methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.5, p.1895–1899, 2010.

CENDEJAS-BUENO, E.; KOLECKA, A.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; THEELEN, B.; GROENEWALD, M.; KOSTRZEWA, M.; CUENCA-ESTRELLA, M.; GOMEZ-LOPEZ, A.; BOEKHOUT, T. Reclassification of the *Candida haemulonii* Complex as *Candida haemulonii* (*C. haemulonii* Group I), *C. duobushaemulonii* sp. nov. (*C. haemulonii* Group II), and *C. haemulonii* var. *vulnera* var. nov.: Three Multiresistant Human Pathogenic Yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50, n.11, p. 3641–3651, 2012.

ÇERİKÇIOĞLU, N.; AKSU, B.; DAL, T.D.; DENİZ, U.; BILGEN, H.S.; ÖZEK, E.; SÖYLETİR, G. Seminested PCR for detection and identification of *Candida* species directly from blood culture bottles. **New microbiologica**. n.33, p.57-62, 2010.

CHANG, M.R. et.al. *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop.** v.50, n.5, p.265-268, 2008.

CHARLES, P.E.; BRUYERE, R.; DALLE, F. Early recognition of invasive candidiasis in the ICU. **Intensive Care and Emergency Medicine**. p.311-323, 2012.

CHAVES, G.M.; SANTOS, F.P.; COLOMBO, A.L. The persistence of multifocal colonization by a single ABC genotype of *Candida albicans* may predict the transition from commensalism to infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.107, n.2, p.198-204, 2012.

CHEN, T.C.; CHEN, T.H.; TSAI, J.J.; PENG, C.F.; LU, P.L.; CHANG, K.; HSIEH, H.C.; CHEN, T.P. Epidemiologic analysis and antifungal susceptibility of *Candida* blood isolates in southern Taiwan. **J. Microbiol. Immunol. Infect.** v.38, p.200-210, 2005.

CLEARY, J.D.; GARCIA-EFFRON, G.; CHAPMAN, S.W.; PERLIN, D.S. Reduced *Candida glabrata* susceptibility secondary to an *FKS1* mutation developed during

candidemia treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, n.6, p. 2263–2265, 2008.

CLEMONS, K.V.; FERROZE, F.; HOLMBERG, K.; STEVENS, D.A. Comparative analysis of genetic variability among *Candida albicans* isolates from different geographic locales by three genotypic methods. **J Clin Microbiol.**, v.35, p.1332–1336, 1997.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition*. CLSI document M27-A3 (ISBN 1-56238-666-2). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Informational Supplement*. CLSI document M27-S4 (ISBN 1-56238-667-0). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2012.

COLOMBO, A.L. et.al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of Candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**. v.44, n.8, p.2816-2823, 2006.

COLOMBO, A.L. et.al. Prospective Observational Study of Candidemia in São Paulo, Brazil: Incidence Rate, Epidemiology, and Predictors of Mortality. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v.28, n.5, p.570-576, 2007.

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, Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v.16, (Supl.1) p.S1-S34, 2012.

COLOMBO, A.L.; GARNICA, M.; CAMARGO, L.F.A.; CUNHA, C.A.C.; BANDEIRA, A.C.; BORGHI, D.; CAMPOS, T.; SENNA, A.L.; DIDIER, M.E.V.; DIAS, V.C.; NUCCI, M. *Candida glabrata*: an emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, v.51, p.38–44, 2013.

COOKE, V.M. et al. New chromogenic agar medium for the identification of *Candida* spp. **Appl Envir Microbiol.**, v. 68, p.3622-3627, 2002.

CORNELY, A.O. et al. ESCMID* Guideline for the Diagnosis and Management of *Candida* Diseases 2012: Non-Neutropenic Adult Patients. **Clin Microbiol Infect.**, v.18, suppl. 7, p.19-37, 2012.

CORTÉS, J.A.; CONCHA, A.M.; CEDIEL, L.E.T.; CASTILLO, J.S. Métodos diagnósticos en candidemia: una revisión sistemática de la literatura con meta-análisis. **Rev Chil Infect**. v.28, n.5, p.423-428, 2011.

CROUS, P.W.; VERKLEY, G.J.M.; GROENEWALD, J.Z.; SAMSON, R.A. (eds). **Fungal Biodiversity**. CBS Laboratory Manual Series 1: 1– 269. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands. 2009b.

DANIEL, H.M.; SORRELL, T.C.; MEYER, W. Partial sequence analysis of the actin gene and its potential for studying the phylogeny of *Candida* species and their teleomorphs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 51, 1593–1606, 2001.

DIEZMANN, S.; COX, C.J.; SCHOENIAN, G.; VILGALYS, R.J.; MITCHELL, T.G. Phylogeny and Evolution of Medical Species of *Candida* and Related Taxa: a Multigenic Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n.12, p. 5624–5635, 2004.

DIZBAY, M.; KALKANCI, A.; SEZER, B.E.; AKTAS, F.; AYDOGAN, S.; FIDAN, I.; KUSTIMUR, S.; SUGITA, T. Molecular Investigation of a Fungemia Outbreak Due to *Candida parapsilosis* in an Intensive Care Unit. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v.12, n.5, p.395-399, 2008.

EDDOUZI, J.; PARKER, J.E.; VALE-SILVA, L.A.; COSTE, A.; ISCHER, F.; KELLY, S.; MANAI, M.; SANGIARD, D. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Clinical *Candida* Species Isolated from Tunisian Hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.57, n.7, p.3182–3193, 2013.

ELLEPOLA, A.N.B.; HURST, S.F.; ELIE, C.M.; MORRISON, C.J. Rapid and unequivocal differentiation of *Candida dubliniensis* from other *Candida* species using species-specific DNA probes: comparison with phenotypic identification methods. **Oral Microbiol. Immunol.** v.18, p.379–388, 2003.

ESPINEL-INGROFF, A.; CANTÓN, E. In vitro activity of echinocandins against non-*Candida albicans*: is echinocandin antifungal activity the same? **Enferm. Infecc. Microbiol Clin.**, v.29, n.2, p.3-9, 2011.

EVANS, S.E. Coping with *Candida* Infections. **Proc Am Thorac Soc**. v.7, p.197–203, 2010.

FOTEDAR, R.; AL-HEDAITHY, S.S.A. Identification of chlamydospore-negative *Candida albicans* using CHROMagar *Candida* medium. **Mycoses**, v.46, p.96-103, 2002.

FRANÇA, J. C.B.; RIBEIRO, C.E.L.; QUEIROZ-TELLES, F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.41, n.1, p.23-28, 2008.

FRATTARELLI, D.A. *et al.* Antifungals in systemic neonatal candidiasis. **Drugs**, v.64, p.949-68, 2004.

FREYDIERE, A.M.; GUINET, R.; BOIRON, P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. **Med Mycol.**, v.39, p.9-33, 2001.

GALARZA, J lio C sar Chávez. *Phylogenetic relationships of the most common pathogenic Candida species inferred by sequence analysis of nuclear genes*. 2009. 172 f. Dissertação. Mestrado em Genética Molecular – Escola de Ciências. Universidade do Minho, Portugal.

GARCIA-EFFRON, G; CANTON, E; PEMA N, J; DILGER, A; ROMA, E; PERLIN, D.S. Epidemiology and echinocandin susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu lato species isolated from bloodstream infections at a Spanish university hospital. **J Antimicrob Chemother**, n.67, p2739–2748, 2012.

GHANNOUM, M.A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.1, p.122–143, 2000.

GIAMMANCO, G.M.; LOPES, M.M.; COIMBRA, R.S.; PIGNATO, S.; GRIMONT, P.A.D.; GRIMONT, F.; FREITAS, G.; GIAMMANCO, G. Value of morphotyping for the characterization of *Candida albicans* clinical isolates. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.100, n.5, p.483-490, 2005.

GIANNINO, A.L.; BUFFONI, J.N.; MASSONE, E.; FELIGINI, M. Internal transcribed spacer as a target to assess yeast biodiversity in Italian taleggio PDO cheese. **Journal of food science**, v.76, n.7, p.511-514, 2011.

GIR O, E.; LEVIN, A.S.; BASSO, M.; GOBARA, S.; GOMES, L.B.; MEDEIROS E.A.S.; COSTA, S.F. Seven-year trend analysis of nosocomial candidemia and antifungal (fluconazole and caspofungin) use in Intensive Care Units at a Brazilian University Hospital. **Medical Mycology**. v.46, p.581-588, 2008.

GOMES, R.R.; GLIENKE, C.; VIDEIRA, S.I.R. *et al.* *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia**, v.31, p.1–41, 2013.

G MEZ, J.; GARCÍA-VÁZQUEZ, E.; HERNÁNDEZ, A.; ESPINOSA, C.; RUIZ, J. Candidemias nosocomiales: nuevos retos de um problema emergente. **Rev Esp Quimioter**. v.23, n.4, p.158-168, 2010.

GONÇALVES, S.S.; AMORIM, C.S.; NUCCI, M.; PADOVAN, A.C.B.; BRIONES, M.R.S.; MELO, A.S.A.; COLOMBO, A.L. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v.16, n.7, p.885-887, 2010.

GROOT, P.W.J.; BADER, O.; BOER, A.D.; WEIG, M.; CHAUHAN, N. Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. **Eukaryotic Cell**, v.12, n.4, p.470–481, 2013.

GUARRO, J.; HOOG, G. S.; GENE, M. J; FIGUERAS. **Atlas of Clinical Fungi**. ed. 2, 2000.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98, 1999.

HEALEY, K.R.; KATIVAR, S.K.; CASTANHEIRA, M.; PFALLER, M.A.; EDLIND, T.D. *Candida glabrata* Mutants Demonstrating Paradoxical Reduced Caspofungin Susceptibility but Increased Micafungin Susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, n.8, p.3947–3949, 2011.

HEO, S.M.; SUNG, R.S.; SCANNAPIECO, F.A.; HAASE, E.M. Genetic relationships between *Candida albicans* strains isolated from dental plaque, trachea, and bronchoalveolar lavage fluid from mechanically ventilated intensive care unit patients. **Journal of Oral Microbiology**, v.3, n.6362, 2011.

HORN, F.; HEINEKAMP, T.; KNIEMEYER, O.; POLLMÄCHER, J.; VALIANTE, V.; BRAKHAGE, A.A. Systems biology of fungal infection. **Frontiers in microbiology**, v.3, p.1-20, 2012.

KATIVAR, S.; PFALLER, M.; EDLIND, T. *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting reduced echinocandin susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.8, p.2892–2894, 2006.

KIM, J.Y.; YEO, S.H.; BAEK, S.Y.; CHOI, H.S. Molecular and Morphological Identification of Fungal Species Isolated from *Bealmijang Meju*. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v.21, n.12, p.1270–1279, 2011.

KCRMERY, V.; BARNES, A.J. Non-albicans *Candida* spp. Causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **Journal of Hospital Infection**, v.50, p.243-260, 2002.

LACAZ, C. S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C., HEINZ_VACCARI E.M., MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. 9a edição, 2002. São Paulo, SP: Sarvier.

LAIN, A.; ELGUEZABAL, N.; BRENA, S.; GARCÍA-RUIZ, J.C.; PALACIO, A.; MORAGUES, M.D.; PONTÓN, J. Diagnosis of invasive candidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay using the N-terminal fragment of *Candida albicans* hyphal wall protein 1. **BMC Microbiology**, v.7, n.35, 2007.

LEAW, S.N.; CHANG, H.C.; SUN, H.F.; BARTON, R.; BOUCHARA, J.P.; CHANG, T.C. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. **J Clin Microbiol.**, v.44, p.693–699, 2006.

LEVY, I.; RUBIN, L.G.; VASISHTHA, S.; TUCCI, V.; SOOD, D.K. Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia in children. **CID**, v.26, p. 1086-8, 1998.

LIN, D.; WU, L.C.; RINALDI, M.G.; LEHMANN, P.F. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.7, p. 1815-1821, 1995.

LOCKHART, S.R.; MESSER, S.A.; PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida*

orthopsilosis, in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. **J Clin Microbiol.**, v.46, p.2659–2664, 2008.

MARR, K.A.; LYONS, C.N.; HA, K.; RUSTAD, T.R.; WHITE, T.C. Inducible Azole Resistance Associated with a Heterogeneous Phenotype in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.1, p.52–59, 2001.

McCULLOUGH, M.J.; CLEMONS, K.V.; DEL PALACIO, A.; STEVENS, D.A. Epidemiology of *Candida albicans* isolates from heroin addicts analyzed by DNA typing. **Med Mycol.**, v.36, p.213–217, 1998.

McCULLOUGH, M.J.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A. Molecular Epidemiology of the Global and Temporal Diversity of *Candida albicans*. **Clinical Infectious Diseases**, v.29, p.1220–1225, 1999a.

McCULLOUGH, M.J.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A. Molecular and Phenotypic Characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.2, p.417–421, 1999b.

MELO, A.S.; BIZERRA, F.C.; FREYMÜLLER, E.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; COLOMBO, A.L. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. **Medical Mycology**, v.49, p.253–262, 2011.

MIKULSKA, M.; CALANDRA, T.; SANGUINETTI, M.; POULAIN, D.; VISCOLI, C. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. **Critical Care**. v.14, R.222, 2010.

MIRANDA, L.M.; RODRIGUES, E.C.A.; COSTA, S.F.; HEIJDEN, M.; DANTAS, K.C.; LOBO, R.D.; BASSO, M.; VARKULJA, G.F.; KREBS, V.L.J.; GIBELLI, M.A.B.C.; CRIADO, P.R.; LEVIN, A.S. *Candida parapsilosis* in a neonatal unit over 7 years: a case series study. **BMJ Open**, e000992, 2012.

MISAWA, K.; MIYATA, K. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment base donfast Fourier transform. **Nucleic Acids Res**, v. 30, p.3059–3066, 2002.

MONTAGNA, M.R.; CORETTI, C.; LOVERO, G.; DE GIGLIO, O.; MONTAGNA, O.; LAFORGIA, N.; SANTORO, N.; CAGGIANO, G. Diagnostic performance of 1→3-β-D-Glucan in neonatal and pediatric patients with candidemia. **Int. J. Mol. Sci.** v.12, p.5871–5877, 2011.

MORAN, G. P.; COLEMAN, D. C.; SULLIVAN, D. J. *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: Why is *C. albicans* more pathogenic? **Journal of microbiology**, 2012.

MORIO, F.; PAGNIEZ, F.; LACROIX, C.; MIEGEVILLE, M.; LE PAPE, P. Amino acid substitutions in the *Candida albicans* sterol D5,6-desaturase (Erg3p) confer azole

resistance: characterization of two novel mutants with impaired virulence. **J Antimicrob Chemother.**, 2012.

MOTA, A.J.; BACK-BRITO, G.N.; NOBREGA, F.G. Molecular identification of *Pichia guilliermondii*, *Debaryomyces hansenii* and *Candida palmioleophila*. **Genetics and Molecular Biology**, v.35, n.1, p.122-125, 2012.

MOTTA, A.L.; ALMEIDA, G.M.D.; ALMEIDA, J.N.; BURATTINI, M.N.; ROSSI, F. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. **Braz J Infect Dis.** v.14, n.5, p.441-448, 2010.

MURRAY, P.R. *et al.* **Manual of clinical microbiology**. 9th ed. ASM Press, Washington, DC, 2007.

MYOUNG, Y., SHIN, J.H.; LEE, J.S.; KIM, S.H.; SHIN, M.G.; SUH, S.P.; RYANG, D.W. Multilocus sequence typing for *Candida albicans* isolates from candidemic patients: comparison with southern blot hybridization and pulsed-field gel electrophoresis analysis. **Korean J Lab Med**, v.31, p.107-114, 2011.

NAGLIK, J.R.; CHALLACOMBE, S.J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, n.3, p.400–428, 2003.

NGUYEN, M.H. *et al.* Performance of *Candida* real-time polymerase chain reaction, β -D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. **CID**. v.54, p.1240-1248, 2012.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBO'N, A.M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A.L. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. **Opportunistic Fungal Infections in Latin America**. n.51, p.561-570, 2010.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; ALVARADO-MATUTE, T.; TIRABOSCHI, I.N.; CORTES, J.; ZURITA, J.; GUZMAN-BLANCO, M.; SANTOLAYA, M.E.; THOMPSON, L.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; ECHEVARRIA, J.I.; COLOMBO, A.L. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. **PLoS ONE**, v.8, n.3, p.e59373, 2013a.

NUCCI, M.; THOMPSON-MOYA, L.; GUZMAN-BLANCO, M.; TIRABOSCHI, I.N.; CORTES, J.A.; ECHEVARRÍA, J.; SIFUENTES, J.; ZURITA, J.; SANTOLAYA, M.E.; MATUTE, T.A.; QUEIROZ-TELLES, F.; COLOMBO, A.L. Recommendations for the management of candidemia in adults in Latin America. **Rev Iberoam Micol.** v.30, n.3, p.179–188, 2013b.

ODDS, F.C.; DAVIDSON, A.D.; JACOBSEN, M.D.; TAVANTI, A.; WHYTE, J.A. *et al.* *Candida albicans* strain maintenance, replacement, and microvariation demonstrated by multilocus sequence typing. **J Clin Microbiol.**, v.44, p.3647–3658, 2006.

O'DONNELL K. *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds DR & Taylor JW (Eds) *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*. p 225–233, 1993.

OLAECHEA, P.M.; PALOMAR, M.; LEÓN-GIL, C.; ÁLVAREZ-LERMA, F.; JORDÁ, R.; NOLLA-SALAS, J.; LEÓN-REGIDOR. Economic impact of *Candida* colonization and *Candida* infection in the critically ill patient. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.23, n.4. p.323-330, 2004.

PADOVAN, A.C.; MELO, A.S.; COLOMBO, A.L.; Systematic review and new insights into the molecular characterization of the *Candida rugosa* species complex. **Fungal Genet Biol.**, v.61, p.33-41, 2013.

PAPPAS, P.G. et.al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**. n.48, p.503–35, 2009.

PARK, S.; KELLY, R.; KAHN, J.N. et al. Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.8, p.3264–3273, 2005.

PASSOS, X.S. et.al. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp. bloodstream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. **Mycopathologia**. n.163. p.145–151, 2007.

PÉREZ, J.C.; KUMAMOTO, C.A.; JOHNSON, A.D. *Candida albicans* commensalism and pathogenicity are intertwined traits directed by a tightly knit transcriptional regulatory circuit. **PLoS Biol.**, v.11, n.3, e1001510, 2013.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.42, n.10, p.4419–4431, 2004.

PFALLER, M.A. et al. *Candida krusei*, a Multidrug-Resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program, 2001 to 2005. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, n. 2, p. 515–521, 2008.

PFALLER, M.A.; MOET, G.J.; MESSER, S.A.; JONES, R.N.; CASTANHEIRA, M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY antimicrobial surveillance program, 2008-2009. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.55, n.10, p. 561–566, 2011.

PFEIFFER, C.D.; GARCIA-EFFREON, G.; ZAAS, A.K.; PERFECT, J.R.; PERLIN, D.S.; ALEXANDER, B.D. Breakthrough Invasive Candidiasis in Patients on Micafungin. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.7, p.2373–2380, 2010.

POSTERARO, B. et.al. Early diagnosis of candidemia in intensive care unit patients with sepsis: a prospective comparison of (1,3)-b-D-glucan assay, *Candida* score, and colonization index. **Critical Care**. v.15, r.249, p.1-10, 2011.

QUEIROZ-TELLES, F. *et.al.* Micafungin Versus Liposomal Amphotericin B for pediatric patients with invasive candidiasis substudy of a randomized double-blind trial. **Pediatr Infect Dis J.** n.27, p.820–826, 2008.

REYNOLDS, D. R. The fungal holomorph: An overview. In *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics* (D. R. Reynolds and J. W. Taylor, Eds.), pp. 15–25. CAB International, Wallingford, UK, 1993.

ROKAS, A.; WILLIAMS, B.L.; KING, N.; CARROLL, S.B. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. **NATURE.** v.425, p.798-804, 2003.

SAGHROUNI, F.; ABDELJELIL, J.B.; BOUKADIDA, J.; SAID, M.B. Molecular methods for strain typing of *Candida albicans*: a review. **Journal of Applied Microbiology**, 2013.

SAMPAIO, P.; SANTOS, M.; CORREIA, A.; AMARAL, F.E.; GALARZA, J.C.; OLIVEIRA, S.C.; CASTRO, A.G.; PEDROSA, J.; PAIS, C. Virulence attenuation of *Candida albicans* genetic variants isolated from a patient with a recurrent bloodstream infection. **PLoS One.** v.5, n.4, p.1-10, 2010.

SANTOLAYA, M.E.; ALVARADO, T.; QUEIROZ-TELLES, F.; COLOMBO, A.L.; ZURITA, J.; TIRABOSCHI, I.N.; CORTES, J.A.; THOMPSON, L.; GUZMAN, M.; SIFUENTES, J.; ECHEVARRÍA, J.I.; NUCCI, M. Active surveillance of candidemia in children from latin america: a key requirement for improving disease outcome. **Pediatric Infectious Disease Journal**, 2013.

SELMECKI, A.; FORCHE, A.; BERMAN, J. Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell.** v.9, n.7, p.991-1008, 2010.
 SHAH, D.N.; YAU, R.; WESTON, J.; LASCO, M.; SALAZAR, M.; PALMER, H.R.; GAREY, K.W. Evaluation of antifungal testing results: implications for antimicrobial stewardship programmes. **J Antimicrob Chemother.** v.66, p.2146-2151, 2011.

SHAH, D.N.; YAU, R.; WESTON, J.; LASCO, T.M.; SALAZAR, M.; PALMER, H.R.; GAREY, K.W. Evaluation of antifungal therapy in patients with candidaemia based on susceptibility testing results: implications for antimicrobial stewardship programmes. **J Antimicrob Chemother.** v.66, p. 2146–2151, 2011.

SHAPIRO, R.S.; ROBBINS, N.; COWEN, E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.75, n.2, p.213–267, 2011.

SINGH, S.D.; ROBBINS, N.; ZAAS, A.K.; SCHELL, W.A.; PERFECT, J.R.; COWEN, L.E. Hsp90 governs echinocandin resistance in the pathogenic yeast *Candida albicans* via Calcineurin. **PLoS Pathog.**, v.5, n.7, p.e1000532, 2009.

SINGH-BABAK, S.; BABAK, T.; DIEZMANN, S.; HILL, J.A.; XIE, J.L.; CHEN, Y.L.; POUTANEN, S.M.; RENNIE, R.P.; HEITMAN, J.; COWEN, L.E. Global analysis of the evolution and mechanism of echinocandin resistance in *Candida glabrata*. **PLoS Pathog.** v.8, n.5, e1002718, 2012.

STEVENS, D.A.; ODDS, F.C.; SCHERER, S. Application of DNA typing methods to *Candida albicans* epidemiology and correlation with phenotype. **Rev Infect Dis.**, v.12, p.258–66, 1990.

TAMURA, N.K.; NEGRI, M.F.N.; BONASSOLI, L.A.; SVIDZINSKI, T.I.E. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Rev. Soc. Bras. Med. Tropical.** v.40, n.1, p.91-93, 2007.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Mol. Biol. Evol.**, v.28, n.10, p.2731–2739, 2011.

TAUR, Y.; COHEN, N.; DUBNOW, S.; PASKOVATY, A.; SEO, S.K. Effect of antifungal therapy timing on mortality in cancer patients with candidemia. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p.184–190, 2010.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A.D.; GOW, N.A.R.; MAIDEN, M.C.J.; ODDS, F.C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To Replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.1, p. 284–292, 2005.

TAYLOR, J.W.; JACOBSON, D.J.; KROKEN, S.; KASUGA, T.; GEISER, D.M.; HIBBERTT, D.S.; FISHER, M.C. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v.31, p.21-32, 2000.

TSUI, C.K.M.; DANIEL, H.M.; ROBERT, V.; MEYER, W. Re-examining the phylogeny of clinically relevant *Candida species* and allied genera based on multigene analyses. **FEMS Yeast Res**, n.8, p. 651–659, 2008.

ULLMANN, A.J.; AKOVA, M.; HERBRECHT, R.; VISCOLI, C. *et al.* ESCMID* Guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT). **Clin Microbiol Infect.** v.18, n.7, p.53-67, 2012.

VAN ASBECK, E.; CLEMONS, K.V.; MARTINEZ, M.; TONG, A.J.; STEVENS, D. Significant differences in drug susceptibility among species in the *Candida parapsilosis* group. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v.62, p.106–109, 2008.

VICENTE, V.A.; ATTILI-ANGELIS, D.; PIE, M.R.; QUEIROZ-TELLES, F.; CRUZ, L.M.; NAJAFZADEH, M.J.; DE HOOG, G.S.; ZHAO, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology.** v.61, p.137–144, 2008.

VIJAYAKUMAR, R.; GIRI, S.; KINDO, A.J. Molecular species identification of *Candida* from blood samples of intensive care unit patients by polymerase chain reaction – restricted fragment length polymorphism. **Journal of Laboratory Physicians**, v.4, n.1, p.1-4, 2012.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications (eds Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ), pp. 315–322. Academic Press, San Diego, 1990.

XAFRANSKI, H.; MELO, A.S.A.; MACHADO, A.M.; BRIONES, M.R.S.; COLOMBO, A.L. A quick and low-cost PCR-based assay for *Candida* spp. identification in positive blood culture bottles. **BMC Infectious Diseases**, 2013.

XAVIER, P.C.N.; CHANG, M.R.; NUNES, M.O.; PALHARES, D.B.; SILVA, R.A.; BONFIM, G.F.; ALMEIDA JUNIOR, N.F. Candidemia neonatal, em hospital publico do Mato Grosso do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.41, n.5, p.459-463, 2008.

XIANG, M.J.; LIU, J.Y.; NI, P.H.; WANG, S.; SHI, C.; WEI, B.; NI, Y.X.; GE, H.L. Erg 11 mutation associated with azole resistance in clinical isolates of *Candida albicans* running title: Erg 11 mutations in *Candida albicans*. **FEMS Yeast Res.** v.13, n.4, p.386-396, 2013.

YING, Y.; ZHAO, Y.; HU, X.; CAI, Z.; LIU, X.; JIN, G.; ZHANG, J.; ZHANG, J.; LIU, J.; HUANG, X. In Vitro Fluconazole Susceptibility of 1,903 clinical Isolates of *Candida albicans* and the Identification of ERG11 Mutations. **Microbial Drug Resistance**, v.19, n.4, p.266-273, 2013.

ZHANG, J.; SILAO, F.G.S.; BIGOL, U.G.; BUNGAY, A.A.C.; NICOLAS, M.G.; HEITMAN, J.; CHEN, Y.L. Calcineurin Is Required for Pseudohyphal Growth, Virulence, and Drug Resistance in *Candida lusitanae*. **PLoS ONE**. v.7, n.8, e44192, 2012.

ZHAO, X.; OH, S.H.; COLEMAN, D.A.; HOYER, L.L. ALS51, A newly discovered gene in the *Candida albicans* ALS family, created by intergenic recombination: analysis of the gene and protein, and implications for evolution of microbial gene families. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.61, p.245–257, 2011.

ZNAIDI, S.; NESSEIR, A.; CHAUVEL, M.; ROSSIGNOL, T.; D'ENFERT, C. A comprehensive functional portrait of two heat shock factor-type transcriptional regulators involved in *Candida albicans* morphogenesis and virulence. **PLoS Pathog**, n.9, v.8, e1003519, 2013.

APÊNDICE

TABELA 1 - DESCRIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS DOS ANTIFÚNGICOS TESTADOS FRENTE AOS ISOLADOS DE *Candida*

CODIGO COLEÇÃO	Nº DE REFERÊNCIA	ESPÉCIE	AND		MCF		AMB		FLU	
			CIM	SUS	CIM	SUS	CIM	SUS	CIM	SUS
LMICRO110	E2	<i>C. lusitaniae</i>	0,25	S	0,25	S	0,12	S	2	S
LMICRO111	HC4	<i>C. tropicalis</i>	0,25	S	0,25	S	0,12	S	32	SDD
LMICRO112	HC14	<i>C. glabrata</i>	0,25	I	0,25	R	0,5	S	16	SDD
LMICRO113	HC18	<i>C. glabrata</i>	0,25	I	0,25	R	0,25	S	16	SDD
LMICRO114	E27	<i>C. glabrata</i>	0,25	I	0,06	S	0,25	S	16	SDD
LMICRO115	HC32	<i>C. glabrata</i>	0,25	I	0,25	R	0,5	S	16	SDD
LMICRO116	HC46	<i>C. glabrata</i>	2	R	0,25	R	0,5	S	64	R
LMICRO117	HC47	<i>C. glabrata</i>	0,25	I	1	R	0,5	S	16	SDD
LMICRO118	E48	<i>C. tropicalis</i>	0,25	S	0,25	S	0,5	S	0,25	S
LMICRO119	HC49	<i>C. tropicalis</i>	0,25	S	0,25	S	0,5	S	0,5	S
LMICRO120	E50	<i>C. guilliermondii</i>	0,06	S	1	S	0,5	S	1	S
LMICRO121	E51	<i>C. krusei</i>	0,25	S	0,5	S	0,5	S	16	SDD
LMICRO122	HC52	<i>C. albicans</i>	0,06	S	0,06	S	0,5	S	0,25	S
LMICRO123	E53	<i>C. tropicalis</i>	0,06	S	0,25	S	0,25	S	0,25	S
LMICRO124	HC54	<i>C. tropicalis</i>	0,12	S	0,25	S	0,06	S	2	S
LMICRO125	HC55	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	S	0,5	S	0,5	S	0,25	S
LMICRO126	HC56	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	S	4	I	0,5	S	0,5	S
LMICRO127	HC57	<i>C. parapsilosis</i>	1	S	4	I	0,5	S	0,5	S
LMICRO128	HC58	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	S	1	S	0,25	S	0,5	S
LMICRO129	E59	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	S	4	I	0,5	S	0,5	S
LMICRO130	HC60	<i>C. parapsilosis</i>	0,12	S	4	I	0,25	S	1	S
LMICRO131	E61	<i>C. parapsilosis</i>	0,06	S	4	I	0,5	S	0,12	S
LMICRO132	HC62	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	S	0,5	S	0,5	S	0,25	S
LMICRO133	HC63	<i>C. lusitaniae</i>	0,25	S	0,5	S	0,25	S	0,12	S
LMICRO134	HC64	<i>C. tropicalis</i>	0,06	S	0,25	S	0,25	S	0,5	S
LMICRO135	HC65	<i>C. guilliermondii</i>	2	S	4	I	0,5	S	64	R
LMICRO136	HC66	<i>C. krusei</i>	0,25	S	0,5	I	0,5	S	32	SDD
LMICRO137	HC67	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,03	S	0,25	S	0,25	S
LMICRO138	HC68	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,03	S	0,12	S	0,5	S
LMICRO139	HC69	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,06	S	0,25	S	0,25	S
LMICRO140	HC70	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,06	S	0,12	S	0,25	S
LMICRO141	HC71	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,03	S	0,25	S	0,5	S
LMICRO142	HC72	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,06	S	0,25	S	1	S
LMICRO143	HC73	<i>C. albicans</i>	0,06	S	0,03	S	0,25	S	0,5	S
LMICRO144	HC74	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,06	S	0,25	S	2	S
LMICRO145	HC75	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,06	S	0,25	S	8	R
LMICRO146	HC76	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,06	S	0,25	S	0,5	S
LMICRO147	HC77	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,06	S	0,25	S	0,25	S
LMICRO148	HC78	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,06	S	0,25	S	0,25	S
LMICRO149	E79	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,06	S	0,25	S	0,12	S

Continua

CODIGO COLEÇÃO	N° DE REFERÊNCIA	ESPÉCIE	Continuação							
			AND		MCF		AMB		FLU	
			CIM	SUS	CIM	SUS	CIM	SUS	CIM	SUS
LMICRO150	E80	<i>C. pelliculosa</i>	0,03	S	0,5	S	0,5	S	2	S
LMICRO151	HC81	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,06	S	0,25	S	0,25	S
LMICRO152	HC82	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,06	S	0,5	S	0,25	S
LMICRO153	HC83	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,06	S	0,5	S	2	S
LMICRO154	HC84	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,12	S	0,5	S	0,12	S
LMICRO155	HC85	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,06	S	0,5	S	0,25	S
LMICRO156	HC86	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,06	S	0,5	S	0,12	S
LMICRO157	HC87	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,12	S	0,5	S	0,25	S
LMICRO158	HC88	<i>C. dubliniensis</i>	0,06	S	0,12	S	0,5	S	0,25	S
LMICRO159	HC89	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,12	S	0,25	S	0,25	S
LMICRO160	HC90	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,06	S	0,25	S	0,12	S
LMICRO161	HC91	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,03	S	0,5	S	2	S
LMICRO162	HC92	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,03	S	0,12	S	0,5	S
LMICRO163	HC93	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,06	S	0,06	S	0,5	S
LMICRO164	HC94	<i>C. albicans</i>	0,5	S	2	S	0,06	S	2	S
LMICRO165	HC95	<i>C. parapsilosis</i>	1	S	2	S	0,06	S	1	S
LMICRO166	HC96	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	S	2	S	0,25	S	0,5	S
LMICRO167	HC97	<i>C. parapsilosis</i>	1	S	2	S	0,25	S	0,12	S
LMICRO168	HC98	<i>C. metapsilosis</i>	0,5	S	1	S	0,5	S	1	S
LMICRO169	HC99	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	S	2	S	0,25	S	0,5	S
LMICRO170	HC100	<i>C. parapsilosis</i>	1	S	1	S	0,25	S	0,5	S
LMICRO171	HC101	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	S	1	S	0,25	S	0,5	S
LMICRO172	HC102	<i>C. parapsilosis</i>	1	S	1	S	0,25	S	1	S
LMICRO173	HC103	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	S	2	S	0,25	S	2	S
LMICRO174	HC104	<i>C. parapsilosis</i>	1	S	0,5	S	0,25	S	1	S
LMICRO175	HC105	<i>C. orthopsilosis</i>	0,5	S	2	S	0,5	S	2	S
LMICRO176	HC106	<i>C. parapsilosis</i>	2	S	2	S	0,25	S	0,25	S
LMICRO177	HC107	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	S	1	S	0,25	S	0,25	S
LMICRO178	HC108	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	S	2	S	0,25	S	0,25	S
LMICRO179	HC109	<i>C. krusei</i>	0,25	S	0,25	S	1	S	32	SDD
LMICRO180	HC110	<i>C. parapsilosis</i>	2	S	2	S	0,25	S	1	S
LMICRO181	HC111	<i>C. guilliermondii</i>	2	S	2	S	0,5	S	1	S
LMICRO182	HC112	<i>C. guilliermondii</i>	2	S	4	I	0,5	S	64	R
LMICRO183	E113	<i>C. guilliermondii</i>	2	S	2	S	0,25	S	2	S
LMICRO184	HC115	<i>C. tropicalis</i>	0,06	S	0,25	S	0,25	S	1	S
LMICRO185	HC116	<i>C. glabrata</i>	0,25	S	0,03	S	0,25	S	16	SDD
LMICRO186	HC117	<i>C. glabrata</i>	0,25	S	0,03	S	0,5	S	8	SDD
LMICRO187	E118	<i>C. pelliculosa</i>	0,25	S	0,12	S	0,03	S	2	S
LMICRO188	HC119	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	S	1	S	0,5	S	1	S
LMICRO189	E120	<i>C. pelliculosa</i>	0,25	S	0,12	S	1	S	2	S

HC: ISOLADOS DE PACIENTES DO HC/UFPR, **E:** ISOLADOS DE PACIENTES DE OUTROS HOSPITAIS, **AND:** ANIDULAFUNGINA, **MCF:** MICAFAFUNGINA, **AMB:** ANFOTERICINA B, **FLU:** FLUCONAZOL, **CIM:** CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA, **SUS:** SUSCETIBILIDADE. **S:** SENSÍVEL, **SDD:** SUSCETIBILIDADE DOSE-DEPENDENTE, **I:** SUSCETIBILIDADE INTERMEDIÁRIA, **R:** RESISTENTE

FONTE: O AUTOR (2014)

ANEXOS

ANEXO 1 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, Hospital de Clínicas/UFPR.....	82
ANEXO 2 - Pontos de corte considerados nos testes de suscetibilidade “in vitro”	84

ANEXO 1 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, Hospital de Clínicas/UFPR

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná - HCUFPR

PROJETO DE PESQUISA

Título: SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS *in vitro*, VARIABILIDADE GENÉTICA E PRODUÇÃO DE BIOFILME DE LEVEDURAS CANDIDA ISOLADAS DE PACIENTES COM

Área Temática:

Pesquisador: Patrícia Fernanda Herkert

Versão: 2

Instituição: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

CAAE: 04414812.1.0000.0096

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 52515

Data da Relatoria: 06/07/2012

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa com DESENHO RETROSPECTIVO para avaliar a sensibilidade a antifúngicos *in vitro* das amostras de *Candida* spp isoladas da corrente sanguínea de pacientes com candidemia, comparando amostras isoladas de veia periférica e de cateter venosa.

Todas as amostras utilizadas serão provenientes de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da UFPR no período de JANEIRO DE 2005 A JUNHO DE 2012, conforme ofício de esclarecimento apresentado pela pesquisadora, e já se encontram armazenadas no laboratório de micologia.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar as espécies de *Candida* obtidas de pacientes com candidemia através de métodos microbiológicos convencionais e por PCR e sequenciamento, avaliar a variabilidade genética das espécies isoladas nestas amostras e testar a capacidade de produção do biofilme das leveduras isoladas de amostras de cateter e de sangue periférico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

NÃO HAVERÁ CONTATO COM PACIENTES NEM INCLUSÃO DE NOVOS CASOS, segundo ofício da pesquisadora.

Não há riscos diretos aos pacientes, visto que as amostras que serão utilizadas já estão armazenadas. Os benefícios serão indiretos e poderão mostrar o panorama geral das candidemias hospitalares e melhorar as futuras escolhas medicamentosas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Caso seja detectada a variabilidade genética entre as leveduras, poderá se conhecer melhor o seu perfil de sensibilidade aos antifúngicos comumente utilizados, identificar sua habilidade de adesão as células do hospedeiro ou a materiais plásticos, como cateteres levando a produção de biofilmes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os demais termos de apresentação obrigatória e justificada a solicitação de dispensa do TCLE

Recomendações:

Apresentar relatórios do trabalho e no caso de eventual modificação na pesquisa contatar o CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram respondidas satisfatoriamente.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

CURITIBA, 09 de Julho de 2012

Assinado por:

Renato Tambara Filho

ANEXO 2 - Pontos de corte considerados nos teste de suscetibilidade “in vitro”

TABELA 1 – GUIA DE INTERPRETAÇÃO PARA TESTES DE SUSCETIBILIDADE “IN VITRO” PARA *Candida* spp

Antifúngico	S	SDD	I	R	NS
Anidulafungina	≤2	-	-	-	>2
Caspofungina	≤2	-	-	-	>2
Micafungina	≤2	-	-	-	>2
Fluconazol	≤8	16-32	-	≥64	-
Flucitosina	≤4	-	8-16	≥32	-
Itraconazol	≤0.125	0.25-0.5	-	≥1	-
Voriconazol	≤1	2	-	≥4	-
Anfotericina B	<1	-	-	>1	-

S: SUSCETÍVEL; **SDD:** SUSCETIBILIDADE DOSE-DEPENDENTE; **I:** INTERMEDIÁRIO; **R:** RESISTENTE; **NS:** NÃO-SUSCETÍVEL.

FONTE: TABELA ADAPTADA DE ACORDO COM O DOCUMENTO M27-A3/M27-S3 DO CLSI (2008)

TABELA 2: PONTOS DE CORTE ESTABELECIDOS PARA LEVEDURAS PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

Antifúngico/Espécies	CIM (µg/mL)		
	S	SDD ou I	R
Fluconazol			
<i>C. albicans</i>	≤2	4	≥8
<i>C. tropicalis</i>	≤2	4	≥8
<i>C. parapsilosis</i>	≤2	4	≥8
<i>C. glabrata</i>		≤32	≥64
<i>C. krusei</i> ^a	-	-	-
Voriconazol			
<i>C. albicans</i>	≤0.125	0.25–0.5	≥1
<i>C. tropicalis</i>	≤0.125	0.25–0.5	≥1
<i>C. parapsilosis</i>	≤0.125	0.25–0.5	≥1
<i>C. glabrata</i> ^b	nd	nd	nd
<i>C. krusei</i>	≤0.5	1	≥2
Anidulafungina			
<i>C. albicans</i>	≤0.25	0.5	≥1
<i>C. tropicalis</i>	≤0.25	0.5	≥1
<i>C. parapsilosis</i>	≤2	4	≥8
<i>C. glabrata</i>	≤0.12	0.25	≥0.5
<i>C. krusei</i>	≤0.25	0.5	≥1
<i>C. guilliermondii</i>	≤2	4	≥8
Caspofungina			
<i>C. albicans</i>	≤0.25	0.5	≥1
<i>C. tropicalis</i>	≤0.25	0.5	≥1
<i>C. parapsilosis</i>	≤2	4	≥8
<i>C. glabrata</i>	≤0.12	0.25	≥0.5
<i>C. krusei</i>	≤0.25	0.5	≥1
<i>C. guilliermondii</i>	≤2	4	≥8

Continua

Antifúngico/Espécies	Continuação		
	CIM (µg/mL)		
	S	SDD ou I	R
Micafungina			
<i>C. albicans</i>	≤0.25	0.5	≥1
<i>C. tropicalis</i>	≤0.25	0.5	≥1
<i>C. parapsilosis</i>	≤2	4	≥8
<i>C. glabrata</i>	≤0.06	0.12	≥0.25
<i>C. krusei</i>	≤0.25	0.5	≥1
<i>C. guilliermondii</i>	≤2	4	≥8

***S:** SUSCETÍVEL, **SDD:** SUSCETIBILIDADE DOSE-DEPENDENTE, **I:** SUSCETIBILIDADE INTERMEDIÁRIA, **R:** RESISTENTE, **ND:** NÃO DETERMINADO. **A:** *C. krusei* É CLASSIFICADA COMO INTRINSICAMENTE RESISTENTE AO FLUCONAZOL. **B:** OS DADOS ATUAIS SÃO INSUFICIENTES PARA DETERMINAR UMA CORRELAÇÃO CONFIÁVEL ENTRE OS TESTES DE SUSCETIBILIDADE “IN VITRO” E OS RESULTADOS CLÍNICOS. VALORES DE CIM ≥ 0,5µG/ML PODEM SER UTILIZADOS PARA DIFERENCIAR ISOLADOS SELVAGENS DAQUELES NÃO-SELVAGENS (ISOLADOS QUE EXPRESSAM MECANISMOS DE RESISTÊNCIA)

FONTE: : TABELA ADAPTADA DE ACORDO COM O DOCUMENTO M27-S4, CLSI (2012)