

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

MICHELLANGELO NUNES DA SILVA

**CANDIDÍASE SISTÊMICA EM PACIENTES DE UNIDADES DE TERAPIA
INTENSIVA: DIAGNÓSTICO LABORATORIAL, IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA
E EXPRESSÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA**

Recife
2019

MICHELLANGELO NUNES DA SILVA

**CANDIDÍASE SISTÊMICA EM PACIENTES DE UNIDADES DE TERAPIA
INTENSIVA: DIAGNÓSTICO LABORATORIAL, IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA
E EXPRESSÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Micologia Aplicada

Orientador: Profa. Dra. Rejane Pereira Neves

Recife

2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Silva, Michellangelo Nunes

Candídiase sistêmica em pacientes de unidades de terapia intensiva: diagnóstico laboratorial, identificação polifásica e expressão de fatores de virulência / Michellangelo Nunes Silva- 2019.

90 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Rejane Pereira Neves

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos. Recife, 2019.

Inclui referências

1. Infecções fúngicas 2. Patogenicidade 3. Biofilme I. Neves, Rejane Pereira (orient.) II. Título

616.969

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-425

MICHELLANGELO NUNES DA SILVA

**CANDIDÍASE SISTÊMICA EM PACIENTES DE UNIDADES DE TERAPIA
INTENSIVA: DIAGNÓSTICO LABORATORIAL, IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA
E EXPRESSÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Aprovado em: 27/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Dra. Rejane Pereira Neves (Orientadora)
Dept. de Micologia - Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Danielle Patrícia Cerqueira de Macêdo
Dept. de Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Ildnay de Souza Lima Brandão
LANAGRO/PE - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Dra. Michele Maria Gonçalves de Godoy
Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro
Dep. de Patologia e Medicina Legal - Universidade Federal do Ceará

Dedido a cada ser que na condição de voluntário, hoje encarnado ou não, participou desta pesquisa. Gratidão.

Dedido também, ao meu insubstituível amor, na alegria ou na tristeza, aos meus pais, Dona Cláudia e Seu Marconi.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que nos momentos que pensei que não iria conseguir, Ele junto a seus anjos esteve ao meu lado escutando minhas orações. Agradeço por tamanha felicidade e por permitir que eu alcançasse mais este sonho, um novo passo na minha carreira profissional e, sobretudo, humana.

À Universidade Federal de Pernambuco pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal. Esses sete anos de vivência foram fundamentais para que eu pudesse afirmar quem hoje verdadeiramente sou. Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio financeiro durante todo o curso.

Aos colaboradores da UTI Adulto do Hospital das Clínicas da UFPE, sobretudo a Dra. Michele Godoy pelo respeito a esta pesquisa, acolhimento e aprendizagem científica e humana. E também, aos colaboradores da UTI Geral e Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Agamenon Magalhães, em nome do Dr. Moacir Jucá pelas portas abertas sempre.

Ao meu insubstituível amor, minha família. Aos meus pais, Cláudia e Marconi, por me aceitarem da forma que sou, com inúmeras falhas, porém cheio de amor. Agradeço a minha irmã, Susane, que mesmo com tantas adversidades sempre torce por mim e juntos permanecemos firmes na luta.

À Profa. Dra. Rejane Pereira Neves pela confiança, ensinamentos, apoio e orientação ao longo desses sete anos que estamos juntos. Toda essa nossa vivência construtiva nos serviu e/ou serve como aprendizado e que iremos levar por toda essa vida, deixo aqui o meu muitíssimo obrigado.

Aos verdadeiros e mais bonitos amigos que fiz durante essa jornada, gratidão pela parceria repleta de respeito, aprendizado, acolhimento, compreensão, força e imprescindível alegria no dia a dia.

Por fim, não menos importante, gratidão a todos os seres que passaram pela minha vida, que de alguma forma ou de outra deixaram suas marcas e contribuíram para que esta etapa fosse concluída.

RESUMO

A incidência de infecções fúngicas hospitalares tem aumentado substancialmente, acarretando altos índices de mortalidade, sobretudo em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva. Neste contexto destacam-se os casos de candidíase invasiva, que ocorre por consequência da diminuição na imunidade e pela exposição a condições predisponentes. Embora outras espécies de fungos possam causar quadros clínicos diversos em pacientes de UTI, as espécies de *Candida* representam as mais frequentes. *Candida albicans* é mais incidente, contudo, outras espécies de *Candida* tiveram aumento em suas frequências nos últimos anos incluindo a *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Nosso objetivo foi verificar a ocorrência de candidíase invasiva em pacientes de UTI e avaliar o potencial de virulência dos isolados clínicos de *Candida*. As coletas foram realizadas de acordo com solicitação médica e após o diagnóstico laboratorial micológico, por meio de análise polifásica foi possível identificar todos os isolados obtidos a partir de amostras clínicas. Dentre os vários fatores de virulência presentes em cepas do gênero *Candida*, foi verificado a capacidade de aderência a células epiteliais, formação de biofilme, susceptibilidade antifúngica e produção de hemolisina.

Palavras-chave: Infecções fúngicas. Patogenicidade. Biofilme. Hemolisina.

ABSTRACT

The incidence of hospital fungal infections has increased substantially, leading to high mortality rates, especially in patients admitted to Intensive Care Units. In this context, we highlight the cases of invasive candidiasis, which occurs due to the decrease in immunity and exposure to predisposing conditions. Although other species of fungi may cause diverse clinical conditions in ICU patients, *Candida* species are the most frequent. *Candida albicans* is more incidental, however other *Candida* species have increased in their frequencies in recent years including *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. glabrata*. Our objective was to verify the occurrence of invasive candidiasis in ICU patients and to evaluate the virulence potential of *Candida* clinical isolates for the expression of these factors. The collections were carried out according to medical request and after the mycological laboratory diagnosis, through polyphase analysis we were able to identify all the isolates obtained from clinical samples. Among the various virulence factors present in *Candida* strains, the ability to adhere to epithelial cells, biofilm formation, antifungal susceptibility and hemolysin production was verified.

Key words: Fungal infection. Pathogenicity. Biofilm. Hemolysin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Espécies identificadas a partir de amostras clínicas de pacientes com leveduroses sistêmicas internados em Unidades de Terapia Intensiva.....	53
Figura 2 -	Fraca aderência (A e B); forte aderência (C e D) de leveduras do gênero <i>Candida</i> às células epiteliais coradas com azul de metileno (400x).....	58
Figura 3 -	Avaliação quantitativa da capacidade de formação de biofilme de isolados clínicos de <i>Candida</i> em 48h.....	63
Figura 4 -	Hemólise induzida por <i>Candida</i> spp. utilizando meio Ágar Sabouraud suplementado com sangue de carneiro e glicose, após 48h a 35°C. Os resultados mostram uma zona de hemólise composta por uma zona translúcida em torno da colônia e um halo esverdeado periférico.....	70
Figura 5 -	Hemólise promovida por <i>Candida</i> spp. em meio RPMI suplementado com sangue de carneiro e glicose, após 15h a 37°C. Da direita para esquerda, controle positivo (lise total dos eritrócitos na presença de SDS); controle negativo (nenhuma hemólise de eritrócitos ressuspensa em meio de crescimento); ATCC90028; ATCC20019 com diferentes graus de hemólise.....	73
Figura 6A -	Análise da absorbância determinada a 405nm por espectrofotometria da atividade hemolítica promovida por <i>Candida</i> sp.....	75
Figura 6B -	Análise da absorbância determinada a 405nm por espectrofotometria da atividade hemolítica promovida por <i>Candida</i> sp.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1A -	Isolados clínicos de leveduras obtidas de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva do Hospital das Clínicas/UFPE.....	55
Tabela 1B -	Isolados clínicos de leveduras obtidas de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Agamenon Magalhães.....	56
Tabela 2A e 2B -	Avaliação da capacidade aderência a células epiteliais de isolados clínicos do gênero <i>Candida</i>	59
Tabela 3A e 3B -	Avaliação qualitativa da capacidade de formação de biofilme de isolados clínicos de <i>Candida</i>	61
Tabela 4A -	Perfil de susceptibilidade antifúngica de isolados clínicos de leveduras obtidas de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva frente à antifúngicos comerciais.....	66
Tabela 4B -	Perfil de susceptibilidade antifúngica de isolados clínicos de leveduras obtidas de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva frente à antifúngicos comerciais.....	67
Tabela 5A -	Avaliação da atividade hemolítica em placa de ensaio de isolados clínicos do gênero <i>Candida</i>	70
Tabela 5B -	Avaliação da atividade hemolítica em placa de ensaio de isolados clínicos do gênero <i>Candida</i>	71
Tabela 6A -	Avaliação da Atividade hemolítica em meio líquido de isolados clínicos do gênero <i>Candida</i>	73
Tabela 6B -	Avaliação da Atividade hemolítica em meio líquido de isolados clínicos do gênero <i>Candida</i>	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
CI	Candidíase invasiva
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CSV	Células sanguíneas vermelhas
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
IRAS	Infecções relacionadas a assistência a saúde
LSU	Subunidade larga do ribossomo
MALDI TOF MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry</i>
NGY	<i>Neopeptone, glucose, yeast extract</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDA	<i>Sabouraud dextrose agar</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
YEPD	<i>Yeast extract, peptone, dextrose</i>
YNB	Yeast Nitrogen Base

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	OBJETIVOS.....	15
1.1.1	Objetivo geral.....	15
1.1.2	Objetivos específicos.....	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1	INFECÇÕES FÚNGICAS POR <i>Candida</i> spp.....	16
2.2	DIAGNÓSTICO E IDENTIFICAÇÃO.....	21
2.2.1	Diagnostico clínico.....	21
2.2.2	Diagnostico laboratorial micológico.....	21
2.2.3	Abordagem polifásica na identificação de leveduras.....	22
2.3	FATORES DE VIRULÊNCIA DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i>	24
2.3.1	Aderencia celular.....	25
2.3.2	Produção de biofilmes.....	27
2.3.3	O papel do ferro na patogenicidade e suas estratégias de captação.....	29
2.3.3.1	Atividade hemolítica de <i>Candida</i>	31
2.4	TERAPIA ANTIFÚNGICA.....	35
2.4.1	Poliênicos.....	35
2.4.2	Triazólicos.....	36
2.4.3	Equinocandinas.....	37
2.4.3.1	Caspofungina.....	38
2.4.3.2	Anidulafungina.....	39
2.4.3.3	Micafungina.....	39
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS.....	41
3.2	DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO.....	41
3.3	PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	41
3.3.1	Identificação morfo-fisiológica.....	42
3.3.2	Identificação proteômica por MALDI-TOF MS.....	43
3.3.3	Identificação molecular através do DNA.....	44
3.4	TESTE DE ADERÊNCIA ÀS CÉLULAS EPITELIAIS.....	45
3.5	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES.....	46
3.6	TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO.....	47
3.7	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE HEMOLÍTICA DE <i>Candida</i> spp.....	48
3.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1	COLETA DE AMOSTRAS DE PACIENTES INTERNADOS EM UTI E DIAGNÓSTICO LABORATORIAL MICOLÓGICO.....	50
4.2	ABORDAGEM POLIFÁSICA PARA CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA	

	DOS ISOLADOS CLÍNICOS.....	51
4.3	CAPACIDADE DE ADERÊNCIAS ÀS CÉLULAS EPITELIAIS.....	58
4.4	CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME <i>IN VITRO</i> DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>Candida</i>	60
4.5	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA <i>IN VITRO</i> DE ANTIFÚNGICOS COMERCIAIS FRENTE A ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>Candida</i>	65
4.6	PRODUÇÃO DE HEMOLISINAS POR ISOLADOS DE <i>Candida</i>	69
5	CONCLUSÕES	78
	REFERÊNCIAS	79

.

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a incidência de infecções fúngicas nosocomiais ou hospitalares, que se manifestam após 48 horas de internação ou até 72 horas após alta, tem aumentado substancialmente, acarretando altos índices de mortalidade que atingem até 60% dos casos, sendo frequentes em pacientes graves internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (HINRICHSEN et al., 2008). Esse aumento deve-se principalmente ao maior número de pacientes imunossuprimidos, aos tratamentos mais avançados e a longos períodos de internação (PAPPAS, 2012). Neste contexto destacam-se os casos de candidíase invasiva (CI), que correspondem a até 70% dos óbitos em pacientes com CI internados em UTI, sendo o risco de morte considerado três vezes maior quando comparado a outras unidades de internação hospitalar (MAJUMDAR; PADIGLIONE, 2012; VIJAYAKUMAR et al., 2012, PAPPAS et al., 2018).

A candidíase invasiva ocorre por consequência da diminuição na imunidade humoral e celular e pela exposição a outras condições predisponentes como uso de procedimentos invasivos, mediante a quebra das barreiras de defesa naturais; uso de antibioticoterapia de amplo espectro, tempo prolongado de permanência hospitalar e tratamentos invasivos indispensáveis na terapêutica da doença primária (HINRICHSEN et al., 2008).

Embora outras espécies de fungos possam causar quadros clínicos diversos e significativos para a clínica dos pacientes de UTI, as espécies de *Candida* representam as mais frequentes, sobretudo em pacientes extremamente debilitados. Historicamente, *C. albicans* é mais incidente, contudo mudanças pouco esclarecidas têm mostrado que outras espécies de *Candida* tiveram aumento em suas frequências nos últimos anos incluindo a *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata* (BORGES et al, 2009; MICELI, et al., 2011; MAJUMDAR; PADIGLIONE, 2012; CANTÓN, et al., 2013).

O diagnóstico laboratorial dos casos de candidíase é realizado através do processamento das amostras biológicas coletadas para verificar a presença de estruturas fúngicas, como células de leveduras, tubos germinativos, filamentos, pseudomicélio e micélio verdadeiro. Além de realizar seu isolamento e identificação (LACAZ et al., 2002). No entanto, esses procedimentos estão sendo complementados por análises mais rápidas e eficientes tais como métodos moleculares através da análise do DNA fúngico (GÓES-NETO et al., 2005; WHITE et al., 1990; VILGALYS; HESTER 1990), bem

como métodos proteômicos por MALDI-TOF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight Mass Spectrometry*) (PULCRANO et al., 2013; VELLA, et al., 2013). Contudo, apesar da identificação precisa em nível de espécie, diferenças no padrão de distribuição destes microrganismos ainda não foram completamente elucidadas, podendo estar fortemente relacionadas com o potencial de virulência (HINRICHSSEN et al., 2008).

Assim, é possível que a exposição aos fatores de risco às infecções fúngicas possam ser controladas através de avaliação de fatores de virulência assim como o perfil de susceptibilidade dos agentes etiológicos aos antifúngicos comumente utilizados no tratamento (HEBERT et al., 2017; PAPPAS et al., 2018). A formação de agregados celulares, caracterizados como biofilmes, que se aderem a superfícies e são cruciais para o desenvolvimento de infecções fúngicas, estando associados com alto poder de patogenicidade e condução elevada do nível de resistência aos antifúngicos (LI et al., 2014).

A aquisição de micronutrientes está dentre os pré-requisitos para que um microrganismo patogênico desenvolva uma doença, especialmente metais como ferro (HOOD; SKAAR, 2012). As leveduras do gênero *Candida* exibem sistemas para aquisição do ferro como a produção de sideróforos e enzimas de caráter hemolítico, considerados fatores de virulência essenciais à manutenção destes patógenos oportunistas no desenvolvimento do processo infeccioso (ALMEIDA et al., 2009). Pouco se conhece sobre a atividade hemolítica das espécies de *Candida*; contudo, sabe-se que o potencial patogênico destas leveduras pode estar associado com a produção de hemolisinas (LUO et al., 2001; 2004; NEGRI et al., 2010).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Verificar a ocorrência de candidíase invasiva em Unidades de Terapia Intensiva e avaliar o potencial de virulência dos isolados clínicos de *Candida* quanto a expressão de diferentes fatores de virulência e resistência a antifúngicos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Obter amostras de pacientes internados em UTI com hipótese de infecção sistêmica sugestiva para candidíase invasiva;
- Estabelecer o diagnóstico laboratorial micológico a partir das amostras clínicas coletadas;
- Aordagem polifásica para caracterizar taxonomicamente isolados clínicos de *Candida*;
- Determinar a capacidade de aderências as células epiteliais dos isolados clínicos de *Candida*;
- Demonstrar a capacidade de formação de biofilme *in vitro* dos isolados clínicos de *Candida*.
- Determinar a ação inibitória *in vitro* de antifúngicos comerciais frente a isolados clínicos de *Candida*.
- Avaliar qualitativamente, *in vitro*, a atividade hemolítica dos isolados de *Candida*;
- Avaliar quantitativamente a produção de hemolisinas dos isolados de *Candida*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 INFECÇÕES FÚNGICAS POR *Candida* spp.

Na última década, as infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) estão associadas a uma taxa de morbidade e mortalidade consideráveis em vários países (WISPLINGHOFF et al., 2004; PFALLER E DIEKEMA, 2007; QUINDÓS, 2014). Dentre estas infecções, as causadas por fungos têm sua incidência aumentada devido ao uso extensivo de antibióticos de amplo espectro, imunossupressores, fármacos quimioterápicos, instrumentação inadequada e aumento do número de pacientes transplantados. Além disso, o aumento de pacientes que necessitam de cuidados intensivos é associado como fatores de risco (ANTAS et al., 2012; YANG et al., 2014; SUTCU et al., 2016).

Os fungos têm emergido, desde a década de 80, como uma das principais causas de doenças em humanos, especialmente em indivíduos imunocomprometidos e pacientes hospitalizados com doenças subjacentes graves. Entre os fungos, destacam-se as leveduras predominantemente as do gênero *Candida* (PFALLER E DIEKEMA, 2007).

As leveduras do gênero *Candida* se apresentam como comensais em humanos colonizando a pele e superfícies mucosas, como as do trato gastrointestinal e urogenital. Nessas condições, além da limitação dos nutrientes, essas leveduras estabelecem uma relação de competição com as bactérias da microbiota, desta forma, exercem uma pressão seletiva, o que resulta na eliminação dos microrganismos menos adaptados, tendo então um equilíbrio entre as populações microbianas nos tecidos colonizados (PAM et al., 2012).

Nas alterações no sistema imunológico, ocorre um desequilíbrio entre os microrganismos comensais da microbiota, os quais podem causar infecções superficiais em pessoas saudáveis e, sistêmicas graves, em pacientes críticos. O estabelecimento das micoses está mais associado ao sistema imunológico debilitado do paciente do que com a virulência das leveduras (COLOMBO; GUIMARAES, 2003; HOBSON, 2003).

No Brasil, no ambiente hospitalar, os microrganismos considerados oportunistas são responsáveis por cerca de 90% das doenças fúngicas. As infecções causadas por *Candida* representam 80% de todas as infecções fúngicas no ambiente hospitalar, incluindo infecções do sangue, do trato urinário e do sítio cirúrgico (Colombo *et al.*, 2013). Estudiosos apontam que as infecções fúngicas relacionadas à assistência à saúde

apresentam um alto risco aos pacientes hospitalizados em UTI, aumentando em mais de 50% a chance de doença de etiologia fúngica (Colombo *et al.*, 2014).

Neste setor, estudos mostram que *Candida* spp. é o terceiro patógeno mais comum acarretando em uma condição grave para a principal causa de morte em UTI, o choque séptico, com índice de mortalidade superior a 60% (BASSETI, et al., 2014; DELALOYE E CALANDRA, 2014).

É interessante destacar que apesar de serem conhecidas mais de 160 espécies de *Candida*, cerca de 15 são reconhecidas como patógenos humanos (PAPPAS et al., 2016). As principais espécies são: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Nos últimos anos tem se observado um aumento na frequência de infecções sistêmicas por espécies não-*Candida albicans* (PASSOS et al., 2007; PAPPAS et al., 2016; 2018).

A epidemiologia e distribuição dos agentes etiológicos de infecções fúngicas relacionadas à assistência à saúde apresentam variações a cada região (YANG et al., 2014). Na América do Norte a espécie mais isolada é *C. albicans* seguida de *C. glabrata*. Na América Latina, Europa, Austrália e Ásia as espécies mais isoladas são *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (XIAO et al., 2014). A verdade é que, as leveduras do gênero *Candida* continuam sendo os principais agentes etiológicos nas infecções fúngicas em hospitais de todo o mundo (MARCHETTI et al., 2004; QUINDÓS, 2014).

Em estudos realizados nos Estados Unidos e na Europa, o gênero *Candida* foi, respectivamente, o quarto e o quinto agente etiológico mais prevalente entre os casos de infecções nosocomiais sistêmicas (BASSETI, et al., 2014; DELALOYE E CALANDRA, 2014). *Candida albicans* permanece como a espécie predominantemente isolada em episódios de candidíase sistêmica representando mais da metade de todos os casos, no entanto, recentemente, as espécies não-*Candida albicans* vem ganhando destaque (MARCHETTI et al., 2004; PFALLER E DIEKEMA, 2007; HORN, et al., 2009; PFALLER et al., 2011; PAPPAS et al., 2018).

Pesquisadores afirmam que essa mudança é devido a escolha da conduta terapêutica, realizada através do uso empírico de antifúngicos em pacientes com hipótese diagnóstica de infecção fúngica sistêmica ou até mesmo com candidemia, acarretando a resistência de algumas espécies a esses antifúngicos empíricos comumente utilizados, mas podem incluir também a idade do paciente e sua doença de base (PFALLER E DIEKEMA, 2007; SUTCU et al., 2016).

Na Suíça e nos Estados Unidos da América (EUA), *C. glabrata* surgiu como a segunda causa mais comum em casos de candidíase sistêmica (MARCHETTI et al., 2004; PFALLER E DIEKEMA, 2007). Outras várias espécies não-*Candida albicans* têm sido associadas a estes casos e ameaçam a vida de pacientes imunocomprometidos (KULLBERG E ARENDRUP, 2015).

Na China, o estudo de Yang *et al.* (2004) apresentou 121 episódios de candidemia, onde a proporção de espécies não-*Candida albicans* (62.8%) foi maior quando comparada com os casos de candidemia causada por *C. albicans* (37.2%).

Farooqi *et al.*, (2013), no Paquistão, relataram a incidência de *C. tropicalis*, seguida por *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. albicans* em casos de candidíase sistêmica em adultos. Estes autores afirmam, também, que a idade dos pacientes é o principal fator para o acometimento da doença.

Os estudos de Lavezzo *et al.*, (2014) mostraram que nas últimas décadas a incidência de infecções fúngicas invasivas nos três primeiros meses após transplante hepático reduziu para cerca de 5%, mas a mortalidade ainda é alta, cerca de 40 a 50%. Isso se dá devido a admissão na UTI, uso de dispositivos invasivos e também a colonização do receptor, uma vez que *Candida* spp. é descrita como principal agente etiológico.

Mohammadi e Foroughifar (2016), no Irã, identificaram espécies de *Candida* isoladas das diferentes regiões do corpo em pacientes neutropênicos com câncer. Vinte e dois dos 309 pacientes apresentaram candidíase sistêmica, sendo *C. albicans* a espécie mais prevalente.

Na Turquia, Sutcu *et al.*, (2016) identificaram 134 infecções sistêmicas causadas por *Candida* spp. em pacientes de UTI pediátricas. *Candida albicans* foi a espécie mais isolada, seguida de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis* e *C. krusei*.

Trouvé *et al.*, (2017) coletaram dados epidemiológicos com base em 335 casos de candidíase sistêmica em 30 hospitais na Bélgica. Neste estudo, *C. albicans* foi isolada em 50,4% dos casos, seguido por *C. glabrata* (27,3%) e *C. parapsilosis* lato sensu (9,8%).

A rede de pesquisa em micoses invasivas da América Latina afirma que dados epidemiológicos do Brasil e outros países da América Latina são semelhantes, e nos casos de candidíase sistêmica as espécies prevalentes são *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (COLOMBO et al., 2006; NUCCI et al., 2013).

Candida parapsilosis foi o segundo agente etiológico mais isolado em pacientes com candidíase sistêmica na América Latina. Por outro lado, *C. glabrata* tem um papel etiológico importante nos EUA e na Europa (QUINDÓS, 2014).

Ziccardi *et al.*, (2015) avaliaram a prevalência do complexo *C. parapsilosis* em casos de candidíase sistêmica no Sudeste do Brasil em dez anos de estudos. Por meio de técnicas moleculares foi possível distinguir 43 (81,1%) isolados como *C. parapsilosis stricto sensu* e 10 (18,9%) como *C. orthopsilosis*. Contudo, nenhuma cepa de *C. metapsilosis* foi encontrada nesse estudo.

No Rio de Janeiro, Barbedo *et al.*, (2015) estudaram pacientes de três hospitais terciários e identificaram que 9,5% dos pacientes apresentaram infecção sistêmica por espécies do complexo *C. parapsilosis*. Destes, 57,1% por *C. parapsilosis stricto sensu*, 28,3% por *C. orthopsilosis* e 4,8% por *C. metapsilosis*. Estes autores relataram que 80% dos casos de candidemia foram causadas por uma única cepa de *C. parapsilosis*, isolada de cateter. A observação de que as cepas podem permanecer no ambiente hospitalar por anos evidencia a possível existência de reservatórios e reforça a necessidade de medidas de controle.

Colombo *et al.*, (2013) estudaram casos de candidíase sistêmica em hospitais terciários de São Paulo e do Rio de Janeiro e apresentaram a distribuição das espécies agentes de candidemia. Sendo *C. albicans* foi principal espécie isolada, seguida de *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*.

Oliveira *et al.*, (2014) avaliaram a incidência de leveduras do gênero *Candida*, isoladas a partir de pacientes pediátricos em um hospital público da cidade de São Paulo. Obtiveram 104 isolados e verificou-se a prevalência de espécies não-*Candida albicans* (63,55%). Foram identificadas as espécies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Pichia anomala*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. pararugosa*.

Gaspar *et al.*, (2015), em São Paulo/Brasil, realizaram um estudo prospectivo com 114 pacientes adultos internados em UTI. Diagnosticaram candidemia em 15,8% dos pacientes, destes 61,1% eram do sexo masculino. Pesquisas relatam que a candidíase sistêmica pode acometer pacientes de qualquer idade, mas a maioria dos casos ocorrem em crianças com menos de um ano de idade e em adultos com mais de 65 anos (HAJJEH *et al.*, 2004; NUCCI *et al.*, 2013).

Bergamasco *et al.*, (2013), no Brasil, estudaram a incidência de *Candida* spp. em pacientes com câncer (malignidades hematológicas e tumores sólidos) e candidemia em associação. *Candida albicans* foi a espécie mais frequente, seguida de *C. tropicalis* e *C.*

parapsilosis. Dentre os fatores significativamente associados à mortalidade, os principais foram idade avançada e internação em UTI.

Doi et al., (2016) em um estudo multicêntrico no Brasil, observaram 2.563 episódios de infecção nosocomial da corrente sanguínea, nos quais *Candida* sp. foi o sétimo agente mais prevalente. Pacientes internados em UTI e pacientes do setor de oncologia foram o que mais apresentaram episódios de candidemia. *Candida albicans* (34,3%), *C. parapsilosis* (24,1%), *C. tropicalis* (15,3%) e *C. glabrata* (10,2%) foram as espécies mais prevalentes.

Almeida-Jr. et al., (2012) relataram pela primeira vez um caso de candidemia causada por *C. haemulonii* em um hospital terciário da cidade de São Paulo. Descreveram características clínicas e análises laboratoriais, incluindo identificação fenotípica e molecular, além de teste de suscetibilidade a antifúngicos.

Silva et al., (2013), relataram um surto de candidemia causado por *C. pelliculosa* (*Pichia anomala*) em recém-nascidos hospitalizados em unidade de terapia intensiva neonatal no estado de Pernambuco, os quais apresentavam origem clonal e perfil de sensibilidade distintos aos antifúngicos convencionais.

Em 2015, Silva et al., ressaltaram o envolvimento de várias espécies de *Candida*, como *C. albicans* e *C. parapsilosis* responsáveis pelos casos de candidíase invasiva em recém-nascidos. No entanto, espécies raras têm sido descritas, como *C. haemulonii*, sendo considerada um patógeno emergente.

As taxas de mortalidade por candidíase sistêmica, permanecem inaceitavelmente altas nas últimas décadas. Estudos esclarecem estratégias preventivas para o controle da infecção que devem ser enfatizadas, incluindo a higienização das mãos; colocação e cuidado de cateteres venosos centrais; e sobretudo, um prudente manejo terapêutico antifúngico (PFALLER E DIEKEMA, 2007; SUTCU et al., 2016).

Na América Latina, as taxas de mortalidade continuam a ser mais altas do que as observadas nos países do Hemisfério Norte, enfatizando a necessidade de melhoraria nas práticas locais de manejo clínico da candidíase sistêmica e sua disseminação, incluindo o diagnóstico precoce, controle de fontes de contaminação e terapia antifúngica precisa (DOI et al., 2016).

É evidente a mudança na epidemiologia e no manejo clínico da candidíase sistêmica em pacientes internados na UTI. Pesquisas em todo o mundo apontam que a taxa de mortalidade diminui com o conhecimento do patógeno e a condução de uma terapêutica adequada (COLOMBO et al., 2014; SILVA et al., 2015).

2.2 DIAGNÓSTICO E IDENTIFICAÇÃO

2.2.1 Diagnóstico clínico

Clinicamente, o diagnóstico dos casos sistêmicos de candidíase é realizado com base na sintomatologia e na anamnese do paciente, o que não é conclusivo, pois os sinais e sintomas são inespecíficos. Febre e leucocitose são os principais indícios de uma infecção sistêmica, contudo 20% dos pacientes não desenvolvem hipertermia e apenas 50% apresentam leucocitose (BLOT et al., 2002).

Mesmo assim, a presença desses sinais não é suficiente para supor uma infecção sistêmica por *Candida* ou qualquer outro microrganismo. Portanto, é imprescindível a realização do diagnóstico laboratorial micológico, a fim de evitar um diagnóstico tardio, aumentando as chances de complicação e morte, já que a mortalidade é atribuída diretamente à candidemia, com altos índices que chegam a 60% (GIOLO E SVIDZINSKI, 2010).

Candidíase, sobretudo a candidíase invasiva, é reconhecida como grave problema de saúde pública no Brasil e em outros países em desenvolvimento. Portanto, um diagnóstico precoce é fundamental para que um eficiente esquema terapêutico seja rapidamente instituído, aumentando, assim, a probabilidade de cura (COLOMBO et al., 2014).

2.2.2 Diagnóstico laboratorial micológico

O diagnóstico laboratorial das micoses se baseia na observação das estruturas fúngicas em parasitismo através da análise microscópica direta da amostra biológica e na obtenção do agente etiológico em meios de cultura específicos (KAUFFMAN, 2011; OLIVEIRA, 2014; BACKES et al., 2016).

O exame microscópico direto pode ser realizado em qualquer material biológico como pele, pelos, unhas, sangue, urina, escarro, fezes, líquido, fluidos diversos, fragmentos de tecidos, entre outros (OLIVEIRA, 2014). Esta análise pode ser realizada a fresco, com ou sem adição de corante, clarificante ou contrastante, a depender do material biológico (ANVISA, 2013). O exame microscópico direto é considerado o método mais rápido e menos oneroso na realização do diagnóstico laboratorial micológico (MURRAY et al., 2012).

Os fungos, em sua maioria, não são exigentes em suas necessidades nutricionais e facilmente desenvolvem-se em diferentes meios de cultura sintéticos facilitando seu isolamento em diferentes condições de incubação (KAUFFMAN, 2011). Na rotina laboratorial, utiliza-se Sabouraud Dextrose Agar (SDA) que é um meio não seletivo para cultura e manutenção de fungos patogênicos e não patogênicos. A seletividade é obtida através do uso de aditivos, como carboidratos e antibióticos.

O diagnóstico laboratorial da candidíase invasiva é feito através de culturas de sangue ou outras amostras coletadas sob condições assépticas e têm sido considerada “padrão-ouro”. Testes diagnósticos de não-cultura, como ensaios de detecção de antígeno, anticorpo ou β -D-glucano e reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo inseridos na prática clínica como adjuntos às culturas em grandes centros hospitalares. Se usados e interpretados criteriosamente, esses testes podem identificar mais pacientes com candidíase invasiva e a partir disso definir a melhor terapia antifúngica (PAPPAS et al., 2016).

2.2.3 Abordagem polifásica na identificação de leveduras

O rápido reconhecimento e tratamento das infecções fúngicas relacionadas à assistência à saúde é relevante para reduzir o alto índice de mortalidade, bem como os custos com a internação. A identificação correta de leveduras do gênero *Candida* a nível de espécie é essencial na contribuição para uma decisão terapêutica de sucesso (LEAP et al., 2002; PINCUS et al., 2007; ANGELETTI et al., 2015).

A identificação de leveduras é baseada em análises morfológicas e fisiológicas, uma vez que a macromorfologia de leveduras não apresenta muita diversidade e, portanto, nem sempre é um parâmetro suficiente para identificação (COSTA, 2015). As provas morfofisiológicas mais comuns para a identificação de *Candida* spp. são análise morfológica das células vegetativas crescidas em meio líquido e sólido; formação de pseudomicélio, micélio verdadeiro, clamidósporo, tubo germinativo; assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (auxanograma) e a fermentação de açúcares (zimograma) (KURTZMAN E FELL, 1998; GALES et al., 1999; BARNNET et al., 2000; HOOG et al. 2000; ANVISA, 2013). Os métodos fenotípicos têm algumas limitações e podem não identificar ou identificar erroneamente algumas espécies do gênero *Candida* (MARCOS E PINCUS, 2013).

Nos últimos anos, os métodos para a identificação de leveduras têm melhorado, desde ensaios bioquímicos e fisiológicos até técnicas moleculares mais sofisticadas (LEAW et al., 2006; MARCOS E PINCUS, 2013). Os métodos moleculares são capazes de identificar as leveduras ao nível da espécie, contudo são técnicas bem exigentes, demoradas e onerosas, e nem sempre estão disponíveis em laboratórios de diagnóstico microbiológico (MARCOS E PINCUS, 2013; LEAW et al., 2006; ROBERTS et al., 2016).

Os métodos convencionais de identificação fúngica são utilizados em laboratórios de microbiologia clínica diariamente. A identificação limitada por métodos convencionais de microbiologia leva pelo menos 24 horas, se uma cultura for positiva. O advento da biologia molecular forneceu novas ferramentas para a taxonomia micológica. A PCR e o sequenciamento de genes relevantes proporcionam uma identificação rápida e precisa de um grande número de patógenos, sobretudo leveduras (PINCUS et al., 2007).

Por estes motivos, muitos estudos foram realizados nos últimos anos, afim de obter novas técnicas capazes de fornecer uma identificação rápida e precisa na identificação de microrganismos, tal como MALDI-TOF MS (VOLLMER et al., 2008; HSIUE et al., 2010; PUTIGNANI et al., 2011; BADER et al., 2011; POSTERARO, et al., 2012; CHEN et al., 2013; ALMEIDA-JÚNIOR et al., 2014).

O MALDI-TOF-MS foi introduzido no laboratório de microbiologia para identificação rápida de bactérias, micobactérias e fungos (MARKLEIN et al., 2009; BIZZINI et al., 2010; KLEIN et al., 2012; HUANG et al., 2013).

Prakash et al., (2015) realizaram abordagens polifásicas para a caracterização de cepas de *Candida auris*, isoladas no Brasil, Índia e África do Sul, que está emergindo como um importante patógeno e requer reprodutibilidade de métodos laboratoriais para identificação. A avaliação de MALDI-TOF MS como um método de identificação para esta levedura é precisa. Posteriormente, os estudos de Girard et al., (2016) ratificaram que a espectrometria de massa ionizante permite a identificação exata das cepas emergentes de *C. auris*.

Grenfell et al., (2016) avaliaram o desempenho do MALDI-TOF MS para identificar espécies do complexo *Candida haemulonii*. O banco de dados Biotyper™ forneceu *score* satisfatório (≥ 2.0) na identificação de *C. haemulonii sensu stricto*, *C. pseudohaemulonii* e *C. auris*, e *score* entre 1.797 e 1.935 para as espécies identificadas como *C. duobushaemulonii*.

Fraser et al., (2016) realizaram a identificação de 6328 isolados de leveduras patogênicas utilizando MALDI-TOF-MS. A análise permitiu a identificação correta de 99,8% dos isolados. No entanto, destacaram a importância de um banco de dados adjunto para apoiar os bancos de dados fornecidos comercialmente.

Stefaniuk et al., (2016) compararam ferramentas na identificação de leveduras, o MALDI-TOF-MS identificou corretamente 98,4% dos isolados a nível da espécie usando escores de ≥ 2.000 . Obtiveram melhores resultados do que os métodos tradicionais de rotina para identificação principalmente com *C. kefyr*, *C. dubliniensis* e *C. parapsilosis*.

Na China, Wang et al., (2016) avaliaram o MALDI TOF MS na identificação de 2.683 isolados de leveduras. O equipamento Bruker Biotyper apresentou melhor desempenho e exibiu taxas de precisão significativamente mais altas do que outros sistemas testados para identificação geral de todos os isolados de leveduras (98,8%) e para todos os isolados de *Candida* (99,4%).

Embora alguns testes moleculares tenham sido bem reconhecidos ao longo dos anos, outros ainda precisam ser validados em laboratório de micologia clínica. Por outro lado, a introdução de MALDI-TOF MS na rotina laboratorial clínica pode significar uma mudança radical na precisão de identificação, reduzindo o tempo e custo (SOW et al., 2015).

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*

A patogenicidade de um microrganismo é definida pela sua capacidade de causar doença (Suctu et al., 2016). A maioria dos patógenos, incluindo as espécies de *Candida*, expressam diferentes fatores de virulência, e assim desenvolvem estratégias importantes no processo de infecção no hospedeiro (Pfaller e Diekema, 2007; Lavezzo et al., 2014). A virulência não pode ser considerada uma característica isolada do microrganismo, mas um processo dependente e dinâmico de fatores do hospedeiro em sua interação com o parasita (Casadevall e Pirofski, 2001; Favero et al., 2014).

O estado fisiológico do hospedeiro é um dos principais fatores no desenvolvimento das IRAS (Barchiesi et al., 2004; Mohammadi e Foroughifar, 2016; Suctu et al., 2016). A espécie *Candida albicans* é a mais estudada na maioria das pesquisas que caracterizam os fatores de virulência do gênero *Candida*. Contudo, há

diferenças significativas na expressão fenotípica e genotípica entre as espécies deste grupo (Favero, 2013; França, 2014).

As leveduras do gênero *Candida* tem capacidade em desenvolver diversos mecanismos para expressar sua patogenicidade e virulência. A patogenicidade dessas leveduras tem sido atribuída a vários fatores de virulência, estabelecendo processos infecciosos em humanos, como a adesão a células hospedeiras e/ou dispositivos médicos invasivos, formação de biofilme e secreção de enzimas hidrolíticas como as hemolisinas (SILVA et al., 2011; MONTEIRO et al., 2014).

Entre os principais fatores de virulência das espécies de *Candida* estão a produção de enzimas extracelulares, adesão e formação de biofilme, resistência aos antifúngicos, alteração morfológica, bem como a expressão de fatores que favorecem o processo de infecção (LINARES et al., 2007; THOMPSON et al., 2011; FAVERO et al., 2014; MORALES et al., 2014).

2.3.1 Aderência celular

A capacidade de aderir firmemente em diferentes superfícies, incluindo células, matriz extracelular do hospedeiro e superfícies abióticas, é uma importante característica detectada em algumas espécies de *Candida* (TRONCHIN et al. 2008; SILVA et al. 2011; BLISS et al. 2012; DE GROOT et al. 2013; MAYER et al. 2013). A etapa de adesão é caracterizada como fundamental para a sobrevivência dos microrganismos em hospedeiros humanos, contribuindo como fonte de disseminação nos casos de infecções fúngicas sistêmicas (MAYER et al. 2013; SARDI et al., 2013; MODRZEWSKA E KURNATOWSKI, 2015).

A aderência é o primeiro passo no processo infeccioso, dando origem a formação do biofilme pelas espécies de *Candida* em dispositivos médicos implantados no hospedeiro humano. Tanto a natureza físico-química do biomaterial como as proteínas da parede celular do patógeno desempenham um papel determinante nesse processo (WILLIAMS et al., 2013; NÚÑEZ-BELTRÁN et al., 2017).

Naicker e Patel (2013) afirmaram que a patogenicidade de *C. albicans* está relacionada à aderência nas superfícies de mucosas, bem como a propriedade em formar tubo germinativo e filamentos verdadeiros. Em parte, isso explica a maior prevalência de isolados clínicos de *C. albicans*.

As células epiteliais têm um papel fundamental em muitas das nossas interações com a nossa microbiota e patógenos. As interações destas células com *Candida albicans* demonstraram ser críticas, regulando a morfologia fúngica e o perfil de expressão dos genes (MOYES et al., 2015; MODRZEWSKA E KURNATOWSKI, 2015).

As interações de *C. albicans* com células epiteliais incluem aderência, invasão e indução de lesão celular epitelial. Os desafios incluem a identificação dos alvos celulares epiteliais das adesinas e invasinas e a determinação dos mecanismos pelos quais *C. albicans* penetra ativamente nas células epiteliais induzindo danos (HÖFS et al., 2016).

Yang et al., (2014) mostraram que a interação entre células hospedeiras e espécies de *Candida* no processo de infecção sistêmica desempenham um grande papel na patogenicidade desses fungos. A endocitose induzida (genes *Als3* e *Ssa1*) e a penetração ativa são os dois mecanismos de invasão complementares nos casos de candidíase sistêmica.

Modrzewska e Kurnatowski (2015) destacam *Als*, *Epa*, *Hwp1*, *Eap1*, *Sun41*, *Csh1* como as principais adesinas presentes na parede celular fúngica e sugerem investigações dos genes que contribuem para a adesão, tais como: *CZF1*, *EFG1*, *TUP1*, *TPK1*, *TPK2*, *HGC1*, *RAS1*, *RIM101*, *VPS11*, *ECM1*, *CKA2*, *BCR1*, *BUD2*, *RSR1*, *IRS4*, *CHS2*, *SCS7*, *UBI4*, *UME6*, *TEC1* e *GAT2*.

Menezes et al., (2013) avaliaram a capacidade de aderência de 118 isolados clínicos de espécies de *Candida*, incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Em um total de 93 (79%) isolados foi identificada a propriedade de aderência, sendo as cepas de *C. tropicalis* as que apresentaram maiores níveis de adesão.

Lima-Neto et al., (2011) correlacionaram a capacidade de aderência em cepas de *C. albicans* e *C. parapsilosis* às células epiteliais bucais humanas à presença de carboidratos de parede celular, mostrando que a diferença individual entre as linhagens estava relacionada com um alto teor de resíduos de α -l-fucose de superfície celular.

Ellepola et al., (2016) avaliaram a aderência de *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis* às células epiteliais bucais após breve exposição a três concentrações subterapêuticas de gluconato de clorhexidina. E comprovaram que a exposição em diferentes concentrações reduziu a adesão a das espécies de *Candida* em mais de 50%, indicando uma farmacodinâmica provável que pode potencializar as suas propriedades antissépticas.

Alenzi (2016) estudou espécies de *Candida* em amostras de urina de pacientes com infecções do trato urinário e investigou seus fatores de virulência. Sua pesquisa mostrou que 40,5% dos isolados de *Candida* apresentaram forte aderência à células epiteliais.

Gabriel e Rychłowski (2017) afirmam que vários fatores são conhecidos por estarem envolvidos na virulência de *Candida albicans* e destacam que o desenvolvimento de biofilme nas superfícies de dispositivos médicos permanentes seja considerado o promotor das infecções sistêmicas. A compreensão do comportamento de aderência de leveduras do gênero *Candida* é fundamental para o desenvolvimento de medidas preventivas eficazes contra a infecção associada ao biofilme (TOMIČIĆ E RASPOR, 2017).

2.3.2 Produção de biofilmes

A formação de biofilme pelos microrganismos é um importante fator de proteção para seu desenvolvimento em qualquer ambiente, seja específico ou desfavorável. O biofilme microbiano é constituído por uma comunidade de microrganismos, aderida a uma superfície, embebida em uma matriz extracelular composta de polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (LINDSAY; HOLY, 2008).

O *National Institutes of Health* estimam que os biofilmes são responsáveis, de uma forma ou de outra, por mais de 80% de todas as infecções microbianas nos Estados Unidos (FOX E NOBILE, 2012; NOBILE E JOHNSON, 2015). A associação de microrganismos, sobretudo as leveduras, formando biofilme é um dos mais importantes aportes para a virulência do gênero *Candida*, pelo fato de apresentar maior resistência a terapia antifúngica, beneficiar uma evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro, além da competição ecológica com outros microrganismos patogênicos (SILVA et al., 2009; MARTINEZ E FRIES 2010; SILVA et al., 2012; COSTA et al., 2013; MAYER et al., 2013).

A capacidade de leveduras do gênero *Candida* de adesão e infecção é definida como potencial de virulência ou patogenicidade. Um dos principais mecanismos de virulência desta levedura é a sua flexibilidade de adaptação e capacidade de adesão em diferentes sítios corpóreos (SUZUKI, 2009; PANNANUSORN et al., 2013). O processo de adesão das leveduras ao substrato, evento que antecede a construção do biofilme, consiste primeiramente em interações inespecíficas e em seguida ocorre uma adesão mais forte pela

ação das adesinas fúngicas presentes na parede celular do organismo (BLANKENSHIP E MITCHELL 2006; RAMAGE et al., 2006; SENEVIRATNE et al., 2008; CUÉLLAR-CRUZ et al., 2012).

A matriz extracelular mantém a totalidade da estrutura do biofilme, sendo sua base composta por carboidratos e proteínas que tem influência direta da espécie envolvida na formação do biofilme e fatores como pH e oxigênio (BLANKENSHIP E MITCHELL 2006; SILVA et al., 2011; CUÉLLAR-CRUZ et al., 2012; SARDI et al., 2013). A matriz extracelular é um grande influenciador na virulência das espécies de *Candida*, isso é devido a sua capacidade seletiva na entrada de agentes antifúngicos utilizados para o tratamento da doença (MARTINEZ E FRIES 2010; DA SILVA et al., 2012; MATHÉ E VAN DIJCK 2013). Outras características são pertinentes como a taxa de desenvolvimento celular e expressão de genes que concedem resistência à ação de antifúngicos (MARTINEZ E FRIES 2010; MATHÉ E VAN DIJCK 2013; TAFF et al., 2013).

Enquanto forma-se o biofilme de *Candida*, há um forte mecanismo de comunicação intercelular que executa o desenvolvimento, permitindo o aumento do número de células de leveduras e sua dispersão (HOGAN 2006; MARTINEZ E FRIES 2010; CUÉLLAR-CRUZ et al. 2012; COSTA et al. 2013). A formação e desenvolvimento do biofilme entre as espécies de *Candida* são bem parecidas. Contudo, há características específicas a depender da espécie envolvida, incluindo morfologia da célula, substrato ou superfície de desenvolvimento e nutrientes seletivos (SENEVIRATNE et al., 2008; SILVA et al. 2009; SILVA et al. 2010; COSTA et al., 2013).

Estudos mostram a afinidade de *C. albicans* em formar biofilme em diferentes superfícies de dispositivos médicos invasivos, enquanto biofilmes formados por *C. tropicalis* é mais relatado em superfícies de cateter de látex e de silicone (SILVA et al., 2009; NEGRI et al., 2010; CUÉLLAR-CRUZ et al., 2012). A formação do biofilme por *C. albicans* está associado com sua propriedade dimórfica de crescimento. A estrutura do biofilme é formada por duas camadas diferentes: uma camada basal e fina composta por leveduras e uma camada mais densa repleta de filamentos (BAILLIE et al, 1999). Por outro lado, *C. parapsilosis* produz um biofilme quantitativamente menor e estruturalmente menos complexo que os de *C. albicans* e *C. tropicalis* (KUHN et al, 2002).

2.3.3 O papel do ferro na patogenicidade e suas estratégias de captação

O ferro elementar apresenta capacidade de receber e doar elétrons e atua como cofator importantíssimo em uma variedade de funções metabólicas, como o transporte de oxigênio, reações envolvidas na cadeia respiratória, síntese de ácidos nucleicos e regulação da expressão gênica, sendo considerado essencial para todos os organismos (ARCENEUX, 1998; MOYE-ROWLEY, 2003; ALVARÉZ, 2013; FAVERO et al., 2014).

Entretanto, sua reatividade com peróxido de hidrogênio, resulta na formação de radicais livres altamente tóxicos, os quais podem reagir com carboidratos, aminoácidos e ácidos nucleicos presentes nas células causando-lhe danos. Sendo assim, os organismos necessitam de um bom mecanismo de captação e armazenamento desse elemento (ALVARÉZ, 2013; FAVERO et al., 2014).

A disponibilidade de ferro apresenta um papel importante na relação parasita-hospedeiro (MANNS *et al.*, 1994; HOWARD, 1999). A capacidade de microrganismos patogênicos para adquirir ferro elementar no hospedeiro tem-se mostrado importante no estabelecimento da infecção. Nos seres humanos, cerca de 65% do ferro do corpo está associada a hemoglobina no interior das hemácias e o restante encontra-se intracelularmente na forma de ferritina, mioglobina, proteínas ferro-enxofre, ou como compostos do grupo heme (ALVARÉZ, 2013; CASSAT E SKAAR, 2013). A pequena quantidade de ferro extracelular aparece ligadas a proteínas como a transferrina e lactoferrina (MANNS *et al.*, 1994; WEINBERG, 1999; RATLEDGE E DOVER, 2000).

A transferrina é encontrada no soro e este atua como o principal meio de distribuição de ferro, já a lactoferrina é encontrada nas secreções corporais. Estas proteínas extracelulares estão normalmente saturadas com ferro e tem uma alta afinidade de ligação a esse elemento, garantindo que a concentração de ferro livre nos fluidos corporais permaneça em níveis baixos, insuficientes para o crescimento microbiano (FRANÇA et al., 2010; FAVERO et al., 2014).

A ausência do ferro, através da retenção em proteínas com alta afinidade de ligação à hemoglobina e ao grupo heme (haptoglobina e hemopexina, respectivamente), atua como um obstáculo a infecções por muitos microrganismos. Essa estratégia é conhecida como “imunidade nutricional” (WEINBERG, 1999; RATLEDGE E DOVER, 2000; ALVARÉZ, 2013; CASSAT E SKAAR, 2013). Por outro lado, microrganismos patogênicos apresentam estratégias para aquisição deste elemento e em muitos deles, a

capacidade de disponibilizar ferro atua como um fator de expressão de virulência (WEINBERG, 1999; TIMM et al., 2003;).

Há algumas doenças que determinam sobrecarga férrica, modificação da homeostase do ferro e o aumento da disponibilidade desse elemento no organismo, favorecendo o desenvolvimento de infecções. Pacientes com leucemia frequentemente apresentam excesso de ferro livre no soro e estão mais suscetíveis a infecções por espécies de *Candida* (ALVARÉZ, 2013).

Assim como para outros microrganismos, a disponibilidade de ferro para *C. albicans* serve como um importante sinal do controle da expressão de certos determinantes de virulência (CHEN et al., 2011). A disponibilidade de ferro impõe um fator limitante para o aumento e patogenicidade de microrganismos. Assim esses microrganismos patogênicos desenvolveram mecanismos complexos de captação de ferro a partir do hospedeiro (RATLEDGE; DOVER, 2000; TIMM et al., 2003; CHEN et al., 2011; ALVARÉZ et al., 2013).

Estudos mostraram que *C. albicans* possui mecanismos independentes para captação de ferro a partir de diferentes substratos, como sideróforos, quelantes férricos variados e o grupo heme. Estes diferentes mecanismos de captação podem atuar simultaneamente em uma célula e é provável que auxiliem a levedura a adaptar-se ao contexto fisiológico, no que se refere à variabilidade nas formas e disponibilidade do ferro (ALMEIDA et al., 2009; CASSAT; SKAAR, 2013). Somado a isso, *C. albicans* também é capaz de utilizar o ferro presente no grupo heme. Essa espécie é capaz de captar a hemoglobina liberada após a lise dos eritrócitos por meio de receptores de hemoglobina específicos situados na superfície celular (WEISSMAN; KORNITZER, 2004; WEISSMAN et al., 2008).

Muitos microrganismos patogênicos adquirem o ferro, quando não encontrado de forma livre, indiretamente a partir de compostos que o contenham, como a hemoglobina. Dessa forma, o patógeno deve expressar a capacidade de destruir o grupo heme para obter o ferro elementar. Para isso, alguns microrganismos secretam fatores hemolíticos com o intuito de obter hemoglobina ou o grupo prostético heme como fontes de ferro (MANNS et al., 1994; WATANABE et al., 1999; LUO et al., 2001; 2004).

A hemolisina rompe os glóbulos vermelhos resultando na liberação de ferro, um fator de crescimento importante para microrganismos, especialmente durante a infecção. O ferro no crescimento fúngico é necessário para os processos metabólicos e como um catalisador para vários processos bioquímicos. A expressão de uma proteína hemolítica com capacidades para lisar os glóbulos vermelhos, também é sugerida como fator

essencial para proporcionar uma estratégia aos fungos durante infecções oportunistas (FRANÇA, 2014; AKTAS E YIGIT, 2015).

3.3.3.1 Atividade hemolítica de *Candida*

São escassos os dados relativos à atividade hemolítica em leveduras, quando comparado aos trabalhos descritos para as bactérias. Entre os poucos estudos, destacam-se os trabalhos com *C. albicans*, havendo necessidade de informações sobre o tema entre as demais espécies do gênero. A atividade hemolítica pode desempenhar um papel importante na infecção da corrente sanguínea por *Candida*, onde os eritrócitos circulantes são expostos diretamente às células de levedura (FAVERO et al., 2014; FURLANETO Et Al., 2017).

Nas últimas décadas, a ação hemolítica tem sido reconhecida como um novo fator atribuído à patogenicidade em espécies de *Candida*, incluindo *C. albicans*. Contudo, expressão desse fator de virulência e mecanismos de produção deste fator por espécies de leveduras tem sido alvo de poucos estudos, limitando a compreensão acerca do assunto (MANNNS et al., 1994; LUO et al., 2001; ALMEIDA et al., 2009; FAVERO et al., 2014).

Em 2001, Luo et al., demonstraram que diversas espécies de *Candida* apresentam atividade hemolítica, entre elas *C. tropicalis*. Foi relatada atividade hemolítica variável entre as diferentes espécies do gênero, sendo evidenciados dois tipos distintos de hemólise - completa e incompleta - descritas como hemólise alfa e beta, respectivamente. Essa nomenclatura foi empregada como referência à terminologia utilizada para hemolisinas alfa e beta de procariotos (BREESE et al., 1970; CAVALIERI et al., 1984). Posteriormente outros autores relataram atividade hemolítica para espécies de *Candida* utilizando metodologia semelhante à descrita por LUO et al., (2001) (LINARES et al., 2007; FURLANETO-MAIA et al., 2008; NEGRI et al., 2010; FRANÇA et al., 2010; SACRISTÁN et al., 2011).

Malcok et al., (2010) evidenciaram que a presença de glicose influencia o potencial hemolítico de diversas espécies do gênero *Candida*, sendo observados maiores índices hemolíticos em cultivos suplementados com esse açúcar. A influência da glicose na atividade hemolítica de *C. tropicalis* também foi demonstrada por Favero et al., (2011).

Favero et al., (2011) estudaram o fator hemolítico produzido por *Candida tropicalis*, demonstrando que todos os isolados testados exibiram um anel translúcido, assemelhando-se a beta-hemólise. Seus resultados obtidos, mesmo que iniciais, fortaleceram o nosso conhecimento sobre o potencial hemolítico por espécies de *Candida*.

Rorig et al., (2009) estudando a produção de fatores de virulência em espécies de *Candida*, avaliaram, in vitro, a capacidade de crescimento em temperaturas elevadas, a produção de enzimas hidrolíticas e a atividade hemolítica de 21 cepas clínicas, além de cepas de referência. Somente os isolados de *C. parapsilosis* e *C. albicans* apresentaram atividade hemolítica em seu estudo.

No Paraná, França et al., (2010) analisaram a hemólise in vitro promovida por 28 isolados clínicos de *C. tropicalis* provenientes de pacientes internados no Hospital Universitário de Londrina. Afirmaram que a maioria dos isolados de sangue apresentou hemólise fraca, enquanto as classes de hemólise forte e muito forte foram as predominantes nos isolados de outras amostras clínicas como urina e secreção traqueal, embora não tenham sido detectadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$).

Treviño-Rangel et al., (2013) verificaram a produção de enzimas, entre elas a hemolisina, de 65 isolados clínicos do complexo *C. parapsilosis*. Constataram que 67%, 87% e 80% dos isolados de *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* respectivamente produziram hemolisinas. Além de relatarem que a atividade hemolítica foi significativamente mais abundante em *C. orthopsilosis* do que *C. parapsilosis sensu stricto*.

Negri et al., (2010) avaliaram a produção de hemolisinas de 27 isolados hospitalares de *C. albicans*. Destes, 19 foram isolados a partir de amostras de pacientes internados em UTI e oito das mãos de profissionais de saúde do mesmo setor. Todos os isolados causadores de infecção produziram significativamente mais hemolisina do que os isolados de colonização. Os autores sugerem que a capacidade de *C. albicans* em produzir hemolisinas pode estar associada ao seu potencial patogênico.

Rossoni et al., (2013) compararam a atividade hemolítica entre *C. albicans* e espécies não-*Candida albicans*. Utilizaram 50 cepas isoladas da cavidade oral de pacientes infectados com HIV. Todas as cepas de *C. albicans* estudadas produziram hemolisinas. Entre as espécies não-*Candida albicans*, 86% apresentaram atividade hemolítica. Apenas *C. guilliermondii* e alguns isolados de *C. parapsilosis* foram negativos para esta enzima.

Wan et al., (2015) investigaram se eletrólitos comuns afetavam as hemolisinas produzidas por espécies de *Candida*. Foram utilizadas hemolisinas de 25 isolados de *Candida* na presença de três eletrólitos, CaCl_2 , NaCl e KCl , em diferentes concentrações. E constataram que os eletrólitos testados reduzem a atividade hemolítica por espécies de *Candida*, e conseqüentemente contribuindo para que esses patógenos não sobrevivam no hospedeiro.

Linares et al., (2007) estudaram a produção de hemolisinas, na presença e na ausência de CaCl_2 , como fator de virulência em 18 cepas de *Candida dubliniensis* isoladas de pacientes com AIDS. A atividade hemolítica de *C. dubliniensis* diminuiu na presença de CaCl_2 . Os autores afirmam que *C. dubliniensis* parece ser menos virulento quando comparado a *C. albicans*. Além do mais, a atividade hemolítica é um fator de virulência pouco estudado e sua importância requer novos e mais rigorosos estudos.

Em 2013, Favero et al., estudaram a produção de fator hemolítico por *C. albicans* (10), *C. tropicalis* (13) e *C. parapsilosis* (8) isolados de pacientes com candidemia. Ensaio em placa revelaram que a maioria dos isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* produziam atividade hemolítica. Nenhum dos isolados de *C. parapsilosis* exibiram hemólise no ensaio em placa. Avaliaram, também a atividade hemolítica no caldo sem células, onde *C. tropicalis* exibiu a maior produção de fator hemolítico.

Donohue et al., (2006) verificaram a produção de hemolisina por *Aspergillus niger*, quando incubado em ágar sangue de ovelha a 23 e 37°C. A proteína foi purificada e exposta, in vitro, a células primárias do tecido nervoso o que resultou na rápida perda da sua viabilidade. Em 2005, Donohue et al., afirmaram que algumas cepas de *Penicillium chrysogenum* produzem um tipo de hemolisina quando incubadas em ágar de sangue de ovelha a 37°C, contudo são necessárias mais informações acerca da estabilidade dessa proteína e seu potencial para a saúde humana.

Berne et al., (2002) descreveram duas proteínas hemolíticas, ostreolisina e aegerolisina que foram purificadas a partir de cogumelos comestíveis *Pleurotus ostreatus* e *Agrocybe aegerita*. São termolábeis e hemolíticas para eritrócitos bovinos a concentrações baixas. Já em 2009, Hui Lv et al., isolaram e caracterizaram uma hemolisina de *P. nebrodensis*. A proteína apresentou uma atividade hemolítica notável em eritrócitos de coelho e causou efluxo de íons de potássio a partir de eritrócitos.

Na Índia, Kumar et al., (2009) determinaram a atividade enzimática de 62 isolados de *Candida* de pacientes com tuberculose pulmonar (37) e pacientes não-tuberculosos (25). Foi possível identificar a atividade hemolítica em 29,7% para os

isolados dos pacientes com tuberculose pulmonar e em 24% dos isolados de pacientes não-tuberculosos. Seus achados apresentaram bons índices de atividade nos isolados de *C. glabrata*, contudo esses dados precisam ser melhor elucidados.

Brilhante et al., (2016) avaliaram a atividade hemolítica de 40 cepas de *C. tropicalis*, sendo o fator hemolítico observado em 38 cepas. Ressaltam que *C. tropicalis* vem apresentando uma alta atividade hemolítica, bem maior que *C. albicans* e que pode estar associado com a virulência proeminente desta espécie. E que a atividade hemolítica contribui para a invasão e disseminação do patógeno.

Riceto et al., (2015) estudaram a produção, *in vitro*, de fatores de virulência, como atividade hemolítica de 50 isolados clínicos de *Candida*, entre eles *C. albicans* (15), *C. tropicalis* (15), *C. parapsilosis* (10), *C. glabrata* (5) e *C. krusei* (5). Destes, 48 (96%) dos isolados apresentaram atividade hemolítica, apresentando o índice hemolítico moderado foi demonstrado por todos os isolados de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*, e por 74% de *C. tropicalis* e 90% de *C. parapsilosis*.

Yigit e Aktas (2009) compararam a eficácia de três meios diferentes, o Sabouraud Dextrose Agar (SDA) com sangue de ovelha, SDA com sangue humano e SDA com sangue de coelho, todos enriquecidos com 3% glicose. Um total de 127 isolados de *Candida* foram avaliados quanto às suas atividades hemolíticas. *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. kefyr* e *C. krusei* demonstraram hemólise total em todos os meios após 48 horas da inoculação. Hemólise parcial foi detectado em espécies de *C. guilliermondii* em SDA de sangue de ovelha e SDA de sangue de coelho, enquanto que *C. parapsilosis* não demonstrou qualquer atividade hemolítica em todos os meios após 48 horas ou mais de incubação. Afirmaram que SDA de sangue de ovelha é mais apropriado para a detecção da atividade hemolítica de *Candida* spp.

Pakshir et al., (2013) avaliaram a atividade hemolítica de espécies de *Candida* isoladas de onicomicose e plano oral durante candidíase. Alta atividade hemolítica foi exibida por 92% dos isolados de candidíase oral e por todos os isolados de *C. albicans* oriundos de onicomicoses. Das cepas de *C. parapsilosis*, apenas 26 produziram alta atividade hemolítica e as demais apresentaram baixa atividade.

Aktas e Yigit (2015) estudaram a atividade hemolítica de 66 isolados clínicos de dermatófitos sendo 43 (65,1%) *Trichophyton rubrum*, 7 (10,7%) *T. mentagrophytes*, 5 (7,6%) *Microsporum canis*, 5 (7,6%) *T. tonsurans*, 4 (6%) *Epidermophyton floccosum* e 2 (3%) de *T. violaceum*. Vinte e uma cepas de *T. rubrum* apresentaram hemólises parciais e nove cepas de *T. rubrum* apresentaram hemólise completa, enquanto que em

13 cepas de *T. rubrum* a hemólise foi ausente. Quatro cepas de *T. mentagrophytes* apresentaram hemólise completa e três cepas de *T. tonsurans* apresentaram hemólise parcial. Entretanto, as espécies de *M. canis*, *E. floccosum* e *T. violaceum* não apresentaram atividade hemolítica.

Ziccardi et al., (2015) estudaram diferentes atributos de virulência de 43 cepas de *Candida parapsilosis* stricto sensu e 10 cepas de *C. orthopsilosis*. No total, 11 (25.6%) cepas de *Candida parapsilosis* stricto sensu apresentaram atividade hemolítica, resultados esses bem melhores que os referentes a *C. orthopsilosis*, onde apenas 4 (40%) foram boas produtoras de hemolisinas.

2.4 TERAPIA ANTIFÚNGICA

Nos últimos anos, três principais grupos de antifúngicos têm sido utilizados na prática clínica para o manejo de infecções sistêmicas por espécies de *Candida*: os poliênicos, representados principalmente pela anfotericina B e suas formulações lipídicas; os triazólicos, sendo o principal representante o fluconazol; e as equinocandinas, representadas pela caspofungina, anidulaungina e micafungina (PAPPAS et al., 2016).

2.4.1 Poliênicos

Os poliênicos pertencem a uma classe de antifúngicos naturais produzidos por espécies de *Streptomyces*, sendo representado pela nistatina, natamicina e anfotericina B (Sklenár et al., 2013). Devido ao amplo espectro de ação (leveduras, fungos filamentosos e dimórficos) e à sua atividade fungicida, a anfotericina B ainda é considerado o antifúngico de primeira linha para o tratamento de diversas infecções fúngicas invasivas em pacientes hospitalizados (WALSH et al., 2008; PAPPAS et al., 2016).

A anfotericina B se liga de maneira irreversível ao ergosterol da membrana citoplasmática dos fungos, resultando na formação de poros e, posteriormente, na lise celular (ODDS et al., 2003; ANDES, 2003). Embora seja considerado um antifúngico com amplo espectro de atividade, a anfotericina B apresenta alta toxicidade para o hospedeiro. A nefrotoxicidade é o principal efeito colateral ocasionado pelo uso deste fármaco, fator que tem limitado sua utilização clínica (MOHR et al., 2005; PASQUALOTTO, 2008; PAPPAS et al., 2016).

Com o objetivo de diminuir a toxicidade da formulação convencional da anfotericina B (desoxicolato), diversas formulações lipídicas deste composto (lipossomal,

complexo lipídico, dispersão coloidal, intralipídica e conjugada) encontram-se atualmente disponíveis para o tratamento de candidíase sistêmica, apresentando menor toxicidade quando comparadas à anfotericina B desoxicolato, sendo que outras formulações estão sob investigação (BOWDEN et al., 2002; WINGARD, 2002; PFALLER et al., 2010). Entretanto a grande maioria dos hospitais públicos brasileiros, devido ao alto custo das demais formulações, tem à sua disposição apenas a anfotericina B desoxicolato para tratamento das infecções fúngicas invasivas.

2.4.2 Triazólicos

Os triazólicos são os antifúngicos mais comuns em uso clínico, são totalmente sintéticos e atualmente constituem a maior classe de agentes antifúngicos. O mecanismo de ação dos triazólicos se dá pela inibição da atividade da enzima 14- α -lanosterol-demetilase (codificada pelo gene *ERG11*), responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol, componente fundamental à integridade da membrana celular de células fúngicas (ODDS et al., 2003). Ao contrário da anfotericina B, a atividade dos triazólicos contra espécies de *Candida* é fungistática (PFALLER et al., 2010).

Entre os triazólicos, fluconazol e voriconazol são os únicos compostos empregados na terapia das infecções sistêmicas por *Candida*, sendo também considerada a terapia padrão para o tratamento de candidíase orofaríngea, esofágica e vaginal (PAPPAS et al., 2009; CAMPOY E ADRIO, 2017). O fluconazol também é ativo contra *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma* sp., *Blastomyces* sp. e *Coccidioides* sp. (CAMPOY E ADRIO, 2017). Em ensaios clínicos bem controlados, fluconazol mostrou uma eficácia comparável à da anfotericina B desoxicolato para o tratamento de candidemia, apresentando como vantagem, menores índices de toxicidade (MALIK et al., 1998).

De forma geral, a resistência de espécies de *Candida* ao fluconazol é relativamente baixa entre os isolados sistêmicos, sobretudo os isolados da corrente sanguínea, porém a ocorrência de resistência tem aumentado nas últimas décadas (PFALLER; DIEKEMA, 2006; 2007; PFALLER et al., 2010). Em um estudo de revisão realizado por Pfaller et al., (2007) foram analisados os resultados de testes de sensibilidade ao fluconazol de 13.338 isolados de *Candida*. Na pesquisa citada, foi observada que a resistência ao fluconazol entre esses isolados era exibida,

principalmente, por *C. glabrata* e *C. krusei*, as quais apresentaram resistência em 9% e 40% dos isolados, respectivamente.

Thomaz et al., (2018) demonstraram que a resistência a azóis em isolados de *C. parapsilosis* está emergindo nos centros médicos brasileiros, e os mecanismos moleculares envolvidos devem ser monitorados em conjunto com os perfis de suscetibilidade. Spettel et al., (2019) afirmaram que a aquisição de resistência ao azol parece ter causas multifatoriais. As mutações no *ERG11* parecem desempenhar um papel apenas em *C. albicans*. Mutações homozigotas de *ERG3* parecem estar associadas a CIMs de resistência a azóis. Já em *C. glabrata*, a superexpressão de bombas de efluxo é concebível.

Para resolver os problemas associados a resistência, uma segunda geração de triazóis foi desenvolvida a partir de modificações químicas introduzidas nas moléculas do fluconazol e itraconazol. Voriconazol e Posaconazol foram aprovados pela *Food and Drug Administration* (NAGAPPAN E DERESINSKI, 2007; PETRIKKOS E SKIADA, 2007; ZARAGOZA E PEMÁN, 2008; GEORGE et al., 2009). São considerados fungicidas e têm um amplo espectro de atividade antifúngica contra as diferentes espécies de *Candida*, incluindo isolados intrinsecamente resistentes ao fluconazol, como *C. glabrata* e *C. krusei* (JOHNSON; KAUFFMAN, 2003; PFALLER et al., 2006; SABATELLI et al., 2006; GUINEA et al., 2008; PFALLER et al., 2010; CAMPOY E ADRIO, 2017), e ainda cepas de *Fusarium*, *Scedosporium*, *Zygomycetes* e *Cryptococcus neoformans* (PEYTON et al., 2015; CAMPOY E ADRIO, 2017).

2.4.3 Equinocandinas

Equinocandinas são lipopeptídeos semissintéticos com estrutura química de hexapeptídeos cíclicos ligados a uma cadeia lateral de ácido graxo. As equinocandinas são os mais novos agentes antifúngicos, embora foram aprovados para uso clínico há mais de uma década, são três a caspofungina, anidulafungina e micafungina (VANDEPUTTE E FERRARI, 2012). Diferentemente da anfotericina B e dos azólicos, as equinocandinas têm como alvo a parede celular, inibindo a enzima ligada à síntese de β -(1,3)-D-glucana, visando especificamente a subunidade Fsk1 que leva à ruptura da estrutura das paredes celulares, resultando na instabilidade osmótica e na morte de células fúngicas (DERESINSKI; STEVENS, 2003; ESTES et al., 2009; CAMPOY E ADRIO, 2017).

Equinocandinas agem *in vitro* sobre diversas leveduras e fungos filamentosos, porém em infecções experimentais é relevante somente a sua atividade sobre espécies de *Candida* e de *Aspergillus*, para este último agente, os representantes desta classe são apenas fungistáticos (DIAKEMA et al., 2002; ESPINEL-INGROFF, 1998; MORACE et al., 2009). Os efeitos adversos são menos frequentes do que com anfotericina B e a interação com outros medicamentos é menor do que com os fármacos azólicos. Contudo, a administração exclusivamente endovenosa e o restrito espectro de ação limitam o uso clínico das equinocandinas à infecções mais graves por *Candida*, como nos casos de candidíase invasiva.

2.4.3.1 Caspofungina

Caspofungina é um fármaco semi-sintético derivado de pneumocandina B0, isolada do fungo *Glarea lozoyensis* (MASCHMEYER E GALASMACHER, 2005). Apresenta ação fungicida sobre diferentes espécies de *Candida*, incluindo cepas resistentes a fluconazol e anfotericina B. Cepas de *C. guilliermondii* tem se apresentado menos sensível, já algumas cepas de *C. parapsilosis* sofrem ação apenas fungistática (ESPINEL-INGROFF, 1998).

A caspofungina inibe a síntese de β -(1,3)-D-glucana, um constituinte integral da parede celular fúngica, e tem um mecanismo de ação distinto de outros antifúngicos, incluindo polienos, azólicos e 5-Fluorocitosina. Um decréscimo no conteúdo de glucana da parede celular fúngica ascende a choque osmótico, vacuolização, lise e morte celular. Acredita-se que a inibição da síntese de glucanas ocorre via inibição específica e não competitiva de β -(1,3)-D-glucana (MAERTENS, 2006; EMRI et al., 2013).

Segundo Arathoon et al., (2002), caspofungina eventualmente pode provocar reações durante a infusão, pois sua estrutura polipeptídica possibilita o surgimento de sintomas decorrentes da liberação de histamina. Outros efeitos adversos foram observados, como febre, cefaléia, náuseas, vômitos, eosinofilia e elevação de enzimas hepáticas. No tratamento da candidíase orofaríngea ou esofágica, a caspofungina mostrou eficácia comparável à da anfotericina B convencional (ARATHOON et al., 2002) e do fluconazol (VILLANUEVA et al., 2002). O sucesso terapêutico também foi comparável entre a anfotericina B convencional e a equinocandina em casos de candidemia e peritonite por diversas espécies de *Candida* (MORA-DUARTE et al., 2003). A caspofungina tratou com sucesso a candidemia persistente em recém-nascidos extremamente prematuros às 23 e 24 semanas de idade gestacional (JEON E SIN, 2014).

2.4.3.2 Anidulafungina

Anidulafungina é um moderno agente antifúngico que, como as outras equinocandinas, inibe β -(1,3)-glucana sintase (MURDOCH, 2004; EMRI et al., 2013). Apresenta notável atividade antifúngica contra amplo espectro de espécies de *Candida*, incluindo cepas resistentes a anfotericina B e azólicos (GOBERNADO E CANTÓN, 2008). Estudos clínicos não demonstram diferenças significativas de ação antifúngica entre anidulafungina e fluconazol, em especial no tratamento de infecções invasivas por *Candida*. É bem tolerada, e interações farmacológicas e efeitos adversos sérios não têm sido relatados, podendo ser usada em combinação com outros agentes antifúngicos e co-administrada com drogas imunossupressoras. Seus maiores efeitos adversos são náusea, vômito, diarreia moderada, elevação transitória de enzimas hepáticas e dor de cabeça (GOBERNADO E CANTÓN, 2008; MENICHETTI, 2009).

Anidulafungina possui meia-vida bastante longa e é lentamente degradada por peptidases e proteases humanas. Além disso, tem baixo perfil de interações farmacológicas, baseado em sua falta de interação com o sistema citocromo P450. Assim, ajustes de dose baseados em idade, gênero, peso corporal, estado imunológico, terapia concomitante ou insuficiência renal ou hepática não são necessários. Sua atividade antifúngica, eficácia clínica, segurança e características farmacocinéticas transformam-na em um apropriado composto antifúngico alternativo para terapia de infecções fúngicas invasivas causadas por leveduras (GOBERNADO E CANTÓN, 2008; MENICHETTI, 2009; EMRI et al., 2013).

2.4.3.3 Micafungina

Micafungina foi a terceira equinocandina introduzida no tratamento das infecções fúngicas invasivas, principalmente em pacientes imunocomprometidos, recém-nascidos com baixo peso e pacientes neoplásicos. É um produto semi-sintético produzido por *A. nidulans* var. *echinulatus* e seu mecanismo de ação é comparado ao da anfotericina B lipossomal e demais equinocandinas, o qual apresenta amplo espectro de atividade contra isolados clinicamente relevantes de *Candida* spp. (incluindo isolados de *Candida glabrata* resistentes a fluconazol), demonstrando baixa toxicidade e alta taxa de eliminação (VASQUEZ E SOBEL, 2006; INFANTE-LÓPEZ E ROJO-CORNEJO, 2009; QUINDÓS et al., 2009; DUPONT, 2010).

A micafungina apresenta atividade fungicida tanto *in vitro* como *in vivo* contra muitas cepas de *Candida* e atividade fungistática contra *Aspergillus* spp. Micafungina e

anidulafungina foram licenciados para o tratamento de candidíase invasiva e candidíase esofágica (AREVALDO et al., 2003), além disso, a micafungina foi aprovada para o tratamento da candidíase invasiva em crianças (incluindo neonatos) e adolescentes (<16 anos de idade) e como profilaxia contra infecções por *Candida* em pacientes neutropenicos (SCOTT, 2017).

Recentes estudos pediátricos com recém-nascidos com candidíase invasiva comprovada, mostrou que a micafungina foi eficaz e bem tolerada durante o tratamento (SCOTT, 2017). Outros estudos, dessa vez em modelos animais, demonstram tratamento bem-sucedido, em biofilmes formados por *Candida*, com a administração de micafungina como solução de bloqueio e terapia sistêmica (WALSH et al., 2015). Assim, a micafungina continua a ser uma opção importante para a profilaxia e tratamento de infecções invasivas por *Candida* em doentes pediátricos e adultos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

As coletas foram realizadas, durante o período de fevereiro a novembro de 2016, em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva de acordo com solicitação médica. Nos casos de coletas de sangue, três amostras de sangue venoso foram coletadas em dias consecutivos, assepticamente por punção venosa em tubos Vacutainer® com EDTA e posteriormente, acondicionadas em tubos contendo meio Brain Heart Infusion (BHI); fragmentos de tecidos procedentes de biópsia, líquido cefalorraquidiano e outros materiais biológicos foram coletados por profissionais competentes a fim de ser realizado o diagnóstico laboratorial micológico.

3.2 DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO

Após a obtenção das amostras, foram preparadas lâminas a fresco sem adição de corante ou clarificante e, quando necessário, coradas com Giemsa ou contrastada com tinta Nankin a depender do material biológico. Concomitantemente, o material coletado das amostras clínicas foi semeado em duplicata na superfície do meio ágar Sabouraud Dextrose (DIFCO) adicionado de 50 mg/L de cloranfenicol contido em placas de Petri, mantidas à temperatura de 30 °C e 37 °C por até 15 dias. Após o surgimento das colônias, estas foram purificadas e identificadas.

3.3 PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Foram colocados fragmentos da colônia em água destilada esterilizada adicionada de 50 mg/L cloranfenicol. Desta suspensão 0,2 mL foram semeados por esgotamento na superfície do meio ágar Sabouraud Dextrose com antibiótico contido em placas de Petri. Posteriormente, as colônias foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio específico, para posterior identificação. Após obtenção das culturas puras, estas foram identificadas através dos métodos clássicos de identificação, como características macroscópicas, microscópicas, fisiológicas e bioquímicas (KURTZMAN; FELL, 1998; BARNNET et al., 2000; HOOG; GUARRO, 2000); e métodos moleculares, bem como espectrometria de massa (PUTIGNANI et al., 2010;

VEEN et al., 2010) e análise do DNA (GÓES-NETO et al., 2005; WHITE et al., 1990; VILGALYS; HESTER 1990).

3.3.1 Identificação morfo-fisiológica

Morfologia das células vegetativas crescidas em meio líquido e sólido - a forma das células vegetativas como critério taxonômico foram verificadas através de lâminas contendo fragmentos da cultura (crescimento em meio ágar Sabouraud Dextrose) corados com azul de Aman (*lactofenol blue*) e observadas quanto as diferentes morfologias (esferoidais, subglobulosa, elipsoidal, ovóide, cilíndrica, botuliforme, alongada, apiculada, ogival ou lunata) (LODDER, 1970).

Formação de pseudomicélio, micélio verdadeiro e clamidosporo - para verificar a formação de pseudomicélio, micélio verdadeiro e clamidiosporos foram realizadas culturas em placa de acordo com a técnica de Dalmau (1929), na qual 3mL de Ágar-fubá (CornMeal agar) será depositado em lâmina contida sobre um suporte de vidro em forma de U dentro de uma placa de Petri. Após solidificação do meio, a levedura foi semeada com auxílio de uma agulha em “L”, fazendo-se duas estrias paralelas, as quais foram recobertas com lamínula esterilizada. Para evitar a dessecação do meio, o procedimento foi realizado em câmara úmida, acrescentando-se 2mL de água destilada esterilizada na placa durante o período de incubação do teste. A visualização das estruturas através de microscopia foi feita após 24h, 48h e 72h (LODDER, 1970).

Crescimento em meio sólido - as amostras foram cultivadas em ágar malte e após 3 dias de incubação a 28°C, a textura da colônia foi analisada (mucóide, friável, coesa, butirosa ou seca) (LODDER, 1970; BARNETT et al., 2000).

Características dos ascos e ascosporos - as amostras foram cultivadas em ágar Gorodkova a 28°C por 15 dias. Ao fim deste período foi avaliada a produção de ascos e ascósporos, bem como suas características taxonômicas (BARNETT et al., 2000).

Fermentação de fontes de carbono (Zimograma) - para a realização do teste, tubos longos de 150 por 12mm, contendo tubos menores de Durham invertidos de 50mm x 6mm foram preenchidos com solução de extrato de malte a 0,5% acrescida das fontes de carbono a serem testadas na concentração de 4%. Em seguida, foi adicionado 100µL da suspensão de leveduras ajustada de acordo com a escala 0,5% de MacFarland. Os tubos foram incubados a 25°C por 10 dias e observados diariamente para verificar a produção de dióxido de carbono (BARNETT et al., 2000).

Assimilação de fontes de carbono (Auxonograma) - para o teste, foram realizadas suspensões de cada espécie de levedura em água com extrato de levedura (YE) de acordo com a escala 0,5 de MacFarland. Em seguida, foi realizado *pour plate* em meio isento de carboidratos. Após solidificação, foram adicionadas fontes de carbono e o meio foi incubado a 28°C por três dias, sendo realizada leitura diária para verificar em quais fontes de carbono houve crescimento da levedura, caracterizando a sua capacidade assimilativa de acordo com BARNETT et al., 2000.

Utilização oxidativa de fontes de nitrogênio - foi realizada suspensão do microrganismo em água com extrato de levedura de acordo com a escala 0,5 de MacFarland e em seguida, foi realizado *pour plate* em meio isento de fontes de nitrogênio. Após solidificação, foram adicionadas fontes de nitrogênio e o meio incubado a 28°C por três dias, com observações diárias para verificar em quais fontes houve crescimento da levedura (BARNETT et al., 2000).

Crescimento a elevadas temperaturas - as leveduras foram avaliadas quanto ao crescimento em diferentes temperaturas. Para isto, as amostras foram semeadas em placas contendo meio ágar malte e posteriormente incubadas a 30°C, 37°C, 40°C, 42°C e 45°C segundo Lodder (1970) e Barnett et al. (2000).

Hidrólise da Ureia - as amostras com até 48h de crescimento foram semeadas em meio Caldo Uréia R/ DIFCO e incubadas a 37°C. Os tubos foram examinados a cada meia hora por até quatro horas a fim de verificar a mudança de cor (amarelo para vermelho), indicando produção de uréase (BARNETT et al., 2000; LACAZ et al., 2002).

3.3.2 Identificação proteômica por MALDI-TOF MS

Os isolados foram submetidos à análise direta por espectrometria de massa (MALDI-TOF; MALDI Autoflex, BrukerDaltonics, Bremen, Germany). O cultivo e manutenção dos isolados foram em meio de cultura Dextrose Peptona Extrato de Levedura (YEPD). Para padronização células da bactéria *Escherichia coli*, foram utilizadas como calibrante, cultivadas e mantidas em meio ágar Luria-Bertani (LB), ainda, foi cultivado em YEPD e incorporado nas análises *Trichophyton rubrum* controle externo. Durante o procedimento as incubações foram padronizadas em 20h e as linhagens se desenvolverão aerobicamente a 37°C. Todas as culturas foram analisadas antes do uso quanto à pureza e foram novamente repicadas pelo menos uma vez antes da análise pelo MALDI TOF MS (PUTIGNANI et al., 2010; VEEN et al., 2010).

A partir do cultivo celular, foi realizado o procedimento de extração proteica. Onde foi adicionado 300 µL de água em cada microtubo (1,5mL) e transferido uma alíquota do microrganismo para o tubo, seguida de agitação por vórtex. Foi adicionado 900 µL de Etanol e agitado por vórtex completamente, em seguida as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm por 5 minutos. Todo o excesso de etanol foi removido e foi adicionado 50µL de ácido fórmico a 70% e homogeneizado, logo em seguida foi adicionado 50 µL de acetonitrila a 100% e foi agitado vórtex completamente. A amostra foi centrifugada a 6000 rpm por 5min e partir daí, 1 µL do sobrenadante foi colocado sobre os 48 anéis da placa de aço; após secagem rápida, foi adicionado 1 µL de matriz-composto orgânico capaz de absorver radiação na região do espectro onde o laser opera (75mg/mL de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico-CHCA em etanol/água/acetonitrila [1:1:1] com 0,03% de ácido trifluoroacético-TFA) e deixado secar a temperatura ambiente. As amostras foram cristalizadas em temperatura ambiente (20 ± 2 °C) e transferidas em duplicata para testar a reprodutibilidade do isolado. Durante as análises todas as soluções foram preparadas e estocadas a +5 °C (Putignani *et al.*, 2010; Veen *et al.*, 2010). Os espectros para determinação do perfil protéico dos isolados foram obtidos através de um laser de nitrogênio (337 nm), onde a intensidade do laser foi ajustada ligeiramente acima do limiar para a produção de íons. *E. coli* DH5 α com conhecidos valores de massa das proteínas ribossomais foi usada para calibração. A variação de massa entre 2.000 a 20.000 Da foi registrado usando modo linear com pulso de 104 ns em uma voltagem de +20 kV. Espectros finais foram gerados através da soma de 20 tiros de laser acumulados por perfil e 50 perfis produzidos por amostra, levando a um total de 10.800 disparos de laser somados por espectro. A lista de picos obtidos foi exportada ao software Biotyper™ (Biotyper system, versão 3.0) onde as identificações finais foram alcançadas. Identificação através do software Biotyper™ foi baseada apenas na presença ou ausência de cada pico no espectro (PUTIGNANI *et al.*, 2010; VEEN *et al.*, 2010).

3.3.3 Identificação molecular através do DNA

A biomassa dos fungos foi obtida a partir de culturas cultivadas em Ágar Sabouraud Dextrose contido em tubos de ensaio, mantidos a 28°C por até cinco dias. Todo micélio foi retirado do tubo de ensaio com o auxílio de uma alça de platina, sendo o material transferido para microtubos de 2 mL com tampa de rosca, acrescidos de 0,5g

de contas de vidro (*glass beads*) com dois diâmetros diferentes na proporção de 1:1 (acid-washed, 150-212µm and 425-600µm; Sigma, U.S. sieve). O material foi triturado por agitação em alta velocidade em FastPrep®.

A extração do DNA genômico foi realizada, com o material previamente triturado, conforme Góes-Neto et al., (2005), que inclui uma lavagem com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e posterior homogeneização do material em tampão CTAB 2%, além de precipitação em isopropanol, lavagem em etanol 70% e ressuspensão em 50 µL de água ultrapura.

Para amplificação da região ITS foram utilizados os primers ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990) e LR0R e LR5 (VILGALYS; HESTER 1990), respectivamente. Os parâmetros para amplificação e as concentrações dos reagentes (dNTPs, cloreto de magnésio, Taq DNA polimerase e tampão de reação) serão os mesmos descritos por Kaliyaperumal & Kalaichelvan (2008). Controles negativos, contendo todos os componentes exceto DNA, serão utilizados em cada procedimento para detectar possíveis contaminações. Os produtos das extrações de DNA e das reações de PCR (5µL) foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1% corados com GelRed, e visualizado sob luz UV.

Os produtos de amplificação foram purificados com o “PureLink PCR Purification Kit” (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante, e encaminhados para sequenciamento na Plataforma de Sequenciamento de DNA no Centro de Biociências da UFPE. Após esta etapa, buscas utilizando as sequências obtidas foram realizadas via BLASTn e MOLE-BLAST, de sequencias de ITS e LSU do DNAr similares, depositadas no banco de dados GenBank do NCBI. Identidades variando de 98-100% via BLASTn foram utilizadas como padrão para confirmação das identidades da amostra utilizadas com base em sequências de culturas tipo e/ou amostras de referência.

3.4 TESTE DE ADERÊNCIA ÀS CÉLULAS EPITELIAIS

Os testes de aderência foram baseados em Kimura e Pearsall (1978) e *Sobel et al.* (1981). Células epiteliais foram obtidas da cavidade bucal de doador jovem, clinicamente isento de cáries. Em todas as etapas relacionadas a este ensaio foi utilizado o tampão fosfato (PBS) como descrito em Villela et al. (1973). As suspensões celulares obtidas foram mantidas sob refrigeração, a fim de evitar alterações celulares.

Os isolados de *Candida* foram crescidos “overnight” em meio NGY (neopeptona 1g/L; dextrose 4g/L; *yeast extract* 1g/L) e mantidos a temperatura de 35°C. Em seguida, as células de leveduras foram lavadas com 2ml de PBS por três centrifugações seguidas a 1580 rpm por 10 minutos e resuspendidas para uma concentração final de 5×10^6 cels/mL. As amostras de células epiteliais bucais humanas foram coletadas com auxílio de *swab* estéril friccionado por 2 min na cavidade oral e transferidos para tubos Falcon contendo 5 mL de PBS, centrifugadas três vezes e resuspendidas para uma concentração final de 5×10^5 cels/mL. Anterior aos ensaios, as células de leveduras e as células epiteliais foram examinadas quanto à viabilidade e integridade para avaliação de possíveis alterações. Os dois tipos de células foram misturados (1:1) e em seguida, incubados a 37°C, sob agitação de 200 rpm, por 2h. As células foram fixadas em formalina 10% e em seguida foi realizada a microscopia, através de preparação de lâminas coradas com azul de metileno.

Os resultados foram expressos pela média aritmética de dez campos observados (VILLELA et al., 1973) onde foram avaliadas 100 células epiteliais com relação à percentagem de sua área superficial aderidas pelas leveduras e graduada como forte aderência (++) para adesão entre 50% a 100% da área de superfície, fraca aderência (+) para adesão até 49% e sem aderência visível (-). Todos os ensaios foram desenvolvidos em triplicata para cada isolado.

3.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES

Ensaio qualitativo do biofilme: a avaliação da capacidade de formação de biofilme foi realizada utilizando o método visual descrito por Pfaller et al., (1995). Os isolados foram semeados no meio ágar Sabouraud contido em placas de Petri e mantidas a 35°C por 24 horas. Posteriormente, foi realizada uma suspensão em salina com concentração final de 10^6 UFC/mL. Desta suspensão, 20µl foram inoculados em 180µl de caldo Sabouraud contido nos poços das microplacas, as quais foram mantidas a 35°C por 24h sem agitação. Em seguida, o conteúdo foi aspirado e os poços lavados com água destilada e sobre estes, adicionado o corante safranina para realização de avaliação de acordo com a intensidade da coloração. Os parâmetros utilizados para interpretação foram: fraca coloração, foram lidos como (+); coloração mediana (++) e fortemente corados (+++) representando atividade fraca, moderada e forte, respectivamente.

Ensaio quantitativo do biofilme: o método para a produção de biofilme foi realizado de acordo com o protocolo de Melo et al. (2011), com algumas modificações. As leveduras foram cultivadas em Sabouraud Dextrose durante 24h a 35°C. Após crescimento, o inóculo foi padronizado em 3 mL de solução salina, sendo a turbidez comparável ao padrão da escala 4 de MacFarland. Alíquotas de 20 µL foram transferidas para a placa de poliestireno contendo 180 µL de caldo Sabouraud suplementado com 8% de glicose. Após 24h de incubação a 35°C, foram removidas células planctônicas utilizando uma pipeta Pasteur. Cada poço foi lavado duas vezes com 200 µL de PBS para remover as leveduras fracamente aderidas. As placas secaram em estufa por 20 minutos a 35°C e posteriormente, foram adicionados 110 µL de cristal violeta a 0,4% em cada poço e deixados durante 45 minutos, logo após, as placas foram lavadas três vezes com 200 µL de água Milli-Q esterilizada. Em seguida, foi adicionado 200 µL de etanol em cada poço, por 45 minutos, para descolorir o biofilme. Em seguida, 100 µL do conteúdo de cada poço foi transferido para uma nova placa e a quantificação de biofilme foi medida através da absorbância com espectrofotômetro a 595 nm. Cada cepa foi testada em triplicata e a quantificação da produção de biofilme foi definida pela média aritmética da absorbância dos poços.

3.6 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

O método utilizado seguiu as condições descritas nos documentos M27-A3 e M27-S4 do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008; 2012). Para controle de qualidade dos ensaios, linhagens do *American Type Culture Collection* (ATCC), recomendadas pelo protocolo padrão foram incluídas, como a cepa *Candida parapsilosis* ATCC® 22019.

Os agentes antifúngicos utilizados foram: Fluconazol (Pfizer), Anfotericina B (UnitedMedical), Caposfungina (Merck), Anidulafungina (Pfizer) e Micafungina (Astellas). Concentrações diferentes destes antifúngicos foram preparadas nos intervalos de 0,03 a 16 µg/mL para Anfotericina B, Caposfungina, Anidulafungina e Micafungina e 64 – 0,125 µg/ml para Fluconazol.

O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio e tamponado com ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS; Sigma-Aldrich) a concentração final de 0,165 mol.L-1 e pH

7,0. O meio de cultura foi esterilizado por filtração a vácuo em membranas de 0,22 μm (Millipore, Darmstadt, Alemanha).

A partir do cultivo em Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) de 24 horas da levedura a ser testada, foi preparado um inóculo inicial em 5mL de solução salina a 0,145mol/L (8,5g/L NaCl; salina a 0,85%) esterilizada e sua densidade foi ajustada de acordo com a escala 0.5 de MacFarland ou com transmitância de 90% determinada por espectrofotometria, utilizando 530 nm como comprimento de onda. Esse procedimento fornece uma concentração padrão de levedura contendo 1×10^6 a 5×10^6 células/mL, seguida de diluição de 1:100 e posteriormente de uma diluição de 1:20 da suspensão padrão com meio RPMI 1640, resultando numa concentração final de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$.

Para a realização do ensaio, foram utilizadas placas de microtitulação planas de 96 poços com tampas (TPP; Trasadingen, Suíça). O inóculo foi adicionado aos poços com as drogas a serem testadas e as placas foram incubadas a 35 °C por 24 e 48 horas, a depender da droga testada, a fim de determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Para a anfotericina B, considerou-se a CIM o poço que exibisse 100% de inibição no crescimento, para as equinocandinas a CIM foi o poço com 80% de inibição quando comparado ao controle positivo. Para fluconazol a CIM foi o poço com 50% de inibição quando comparado ao controle positivo. Os “breakpoints” são espécie-específicos e foram definidos com base no protocolo.

3.7 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE HEMOLÍTICA DE *Candida* spp.

Atividade Hemolítica em placa de ensaio: o método para avaliação da atividade hemolítica foi realizado de acordo com os protocolos de Luo et al. (2001) e Favero et al. (2011), com algumas modificações. Os isolados foram pré-cultivados em meio líquido RPMI 1640 e incubados a 37 °C durante 18h. As culturas foram centrifugadas e lavadas com água destilada esterilizada. Uma quantidade de 2 μL de suspensão numa concentração de 2×10^6 células de leveduras foi inoculada no meio ágar Sabouraud Dextrose enriquecido com glicose a 3%, o qual foi preparado por adição de 7mL de sangue de carneiro fresco para cada 100ml de ágar Sabouraud.

As placas foram incubadas a 37 °C durante 48h. A presença de um halo translúcido esverdeado ao redor do inóculo indica atividade hemolítica positiva. As medições dos halos foram avaliadas como (-) para nenhuma atividade, (+) para uma

atividade fraca (com halo $<1.0\text{mm}$), e (++) para atividade leve (com halo de $1-1.49\text{mm}$), e (+++) para atividade forte (zona de halo $\geq 1.5\text{mm}$). Este experimento foi conduzido em triplicata e os resultados foram representados por valores médios. Além disso, cepas padrão, *C. albicans* ATCC 90028 e *C. parapsilosis* ATCC 22019, que induz hemólise completa e parcial, respectivamente, foram utilizadas como controles positivos.

Atividade Hemolítica em meio líquido: o método para avaliação da atividade hemolítica em meio líquido foi realizado de acordo com o protocolo de Favero et al. (2011), com algumas modificações. Os isolados foram cultivados no meio Sabouraud Dextrose líquido a 37°C durante 18h. As culturas foram colhidas e lavadas com tampão PBS esterilizado por centrifugação. Uma suspensão de leveduras (5 mL) com concentração de 10^6 células/mL foi inoculada em 25 mL de meio líquido RPMI 1640 e incubada a 37°C durante 48 horas a 120 rpm. Após o crescimento, as células foram separadas por centrifugação a 1500g durante 15 min. Os sobrenadantes obtidos foram armazenados a -20°C . O sobrenadante da cultura anteriormente preparado foi testado com uma preparação de células sanguíneas vermelhas (CSV) numa concentração de 1×10^8 células/mL, misturados numa proporção de 1:1 (v/v) e incubados a 37°C durante 15h.

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 1000g durante 2 min. A absorbância do sobrenadante foi determinada a 405nm por espectrofotometria. A hemólise foi então calculada de acordo com a equação: $\text{Hemólise (\%)} = 100 - [(A_p - A_s) / (A_p - A_c) \times 100]$; onde A_p , A_s e A_c foram a absorbância do controle positivo, da amostra de teste e do controle negativo, respectivamente. O controle positivo foi composto por CSV lisadas com SDS a 0,6%, e o controle negativo foi o CSV com RPMI numa proporção de 1:1 (v/v). Estes testes foram conduzidos em triplicata, em ocasiões separadas.

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Teste de Tukey foi utilizado para calcular a diferença na capacidade de formação do biofilme e de atividades hemolíticas entre as espécies de *Candida* isoladas. Em todos os testes de $P < 0.05$ foi considerado significativo. Os dados foram apresentados como médias com erro padrão, realizados pelo software Past3.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COLETA DE AMOSTRAS DE PACIENTES INTERNADOS EM UTI E DIAGNÓSTICO LABORATORIAL MICOLÓGICO

Foram coletadas 150 amostras oriundas de 137 pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital das Clínicas de Pernambuco e de abril/16 a fevereiro/17 foram coletadas 221 amostras de 201 pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Agamenon Magalhães, ambos hospitais situados no município de Recife/PE. Foram isolados, de ambas unidades, um total de 52 cepas de leveduras agentes etiológicos de infecções fúngicas sistêmicas.

Na maioria dos casos, as amostras foram de sangue venoso e dessa forma, foram coletadas três amostras assepticamente por punção em dias consecutivos. Tais amostras foram acondicionadas em tubos contendo meio *Brain Heart Infusion-BHI*. Diretrizes publicadas não indicam claramente quando as hemoculturas devem ser ordenadas (BARON et al., 2013). Contudo, são comumente coletadas quando os pacientes apresentam febre, calafrios, leucocitose, choque séptico, ou antes do início do tratamento antimicrobiano em pacientes criticamente doentes. Apesar de grandes progressos terem sido feitos para melhorar o diagnóstico e a identificação de microrganismos, a hemocultura continua sendo a ferramenta de primeira linha para a detecção de infecções da corrente sanguínea (LAMY et al., 2016). Neste estudo também se utilizou outras amostras, como outros fluidos biológicos que não fossem sangue e fragmentos de tecidos, estes foram devidamente acondicionados em frascos esterilizados e encaminhados para diagnóstico laboratorial micológico. Sidrim et al., (2004) afirmaram que para a realização de um correto diagnóstico laboratorial a colheita dos espécimes clínicos deve ser feita de forma adequada para não ocasionar resultados falsos.

Para realização do diagnóstico laboratorial micológico, todas as amostras biológicas coletadas foram devidamente encaminhadas ao Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos da Universidade Federal de Pernambuco onde foi realizado exame microscópico direto, quando possível e necessário, e cultura. Ao exame microscópico direto, lâminas a fresco, clarificadas, coradas ou contrastadas a depender do espécime clínico, evidenciaram a presença de estruturas fúngicas em parasitismo caracterizando doença. Concomitantemente, as amostras semeadas na superfície do meio ágar Sabouraud Dextrose suplementado de cloranfenicol (50 mg/L), mantidas à

temperatura de 30 °C e 37 °C por até 15 dias apresentaram desenvolvimento de colônias claras de tons de branco a bege, consistência cremosa, características essas típica de leveduras. Em seguida os isolados foram purificados e seguiram para identificação a nível de espécie.

4.2 ABORDAGEM POLIFÁSICA PARA CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DOS ISOLADOS CLÍNICOS

Todos os isolados foram identificados (Tabela 1A e 1B) inicialmente através do semeio em CHROMagar *Candida*, em seguida foi realizada a assimilação de fontes de carbono por meio de automação através do VITEK® e BD Phoenix, a depender da Unidade Hospitalar, e posteriormente realizadas análises proteômicas por espectrometria de massas através do MALDI-TOF, além de ensaios de biologia molecular através de análises da região LSU do rDNA fúngico para confirmação da identificação.

O CHROMagar™ *Candida* (Difco, França), é um meio sólido diferencial para identificação de espécies de *Candida* e tem sido útil, particularmente, na identificação presuntiva de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* em cultura primária de espécimes clínicos. Somado a isso, é possível detectar coinfeção com diferentes espécies de *Candida* em placas de cultura primária e isso tem importância no manejo terapêutico da infecção (FURLANETO-MAIA ET AL., 2007; SILVA et al., 2012).

Assim como este trabalho, Karabiçak et al., (2015), defendem uma identificação precisa e rápida de isolados de leveduras. Tal prática tem se tornado importante nos últimos anos com finalidade de uma terapia antifúngica específica. Na rotina laboratorial micológica, a identificação de leveduras é frequentemente realizada baseada em propriedades bioquímicas e fisiológicas e raramente de acordo com as características morfológicas. Contudo, sabe-se que os métodos fenotípicos têm suas limitações e podem não identificar ou identificar erroneamente algumas espécies do gênero *Candida*, isso é devido à similaridade fisiológicas entre algumas espécies (MARCOS E PINCUS, 2013).

Nos dias atuais, em meio ao surgimento de cepas emergentes, enxergamos a necessidade de uma abordagem múltipla de identificação. Isso é devido à falta de uniformidade e confiabilidade comum a todas as práticas de identificação microbiana. Surajit et al., (2014) defendem avanços de técnicas úteis, levando em conta análise de

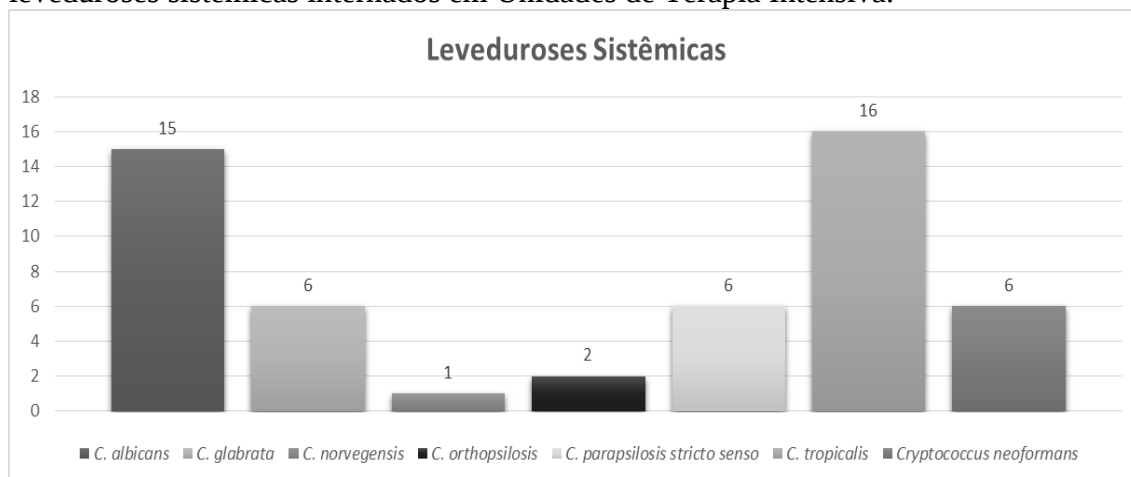
genes, por exemplo. Asadzadeh et al., (2018) afirmam que o método de PCR em tempo real baseado em análise do ponto de fusão é uma ferramenta molecular simples, rápida e precisa na diferenciação entre espécies de *Candida*, sobretudo entre cepas de *C. albicans* e *C. dubliniensis* sem depender de outros testes.

Sabemos que métodos moleculares são capazes de identificar as leveduras ao nível da espécie, contudo são técnicas bem exigentes, podendo ser demoradas e onerosas, e nem sempre estão disponíveis em laboratórios de diagnóstico microbiológico (MARCOS E PINCUS, 2013; ROBERTS et al., 2016). Outras técnicas como o MALDI-TOF MS vêm sendo inserida no laboratório de microbiologia e pode significar uma mudança radical na precisão de identificação, reduzindo o tempo e custo. Bem como esta, outras pesquisas afirmam que MALDI-TOF-MS superou a capacidade de diagnóstico dos métodos fenotípicos, reduzindo o atraso dos resultados e dando uma identificação precisa a nível de espécie (VAN VEEN et al., 2010; MARINEZ-LAMAS et al., 2011; SOW et al., 2015).

É interessante destacar que apesar de serem conhecidas mais de 160 espécies de *Candida*, aproximadamente quinze são reconhecidas como patógenos humanos. Em nosso estudo foi possível isolar cepas de *Candida tropicalis*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* stricto sensu, *C. orthopsilosis* e *C. norvegensis*.

Esta pesquisa corrobora os dados apresentados nos últimos anos, nos quais tem se observado um aumento na frequência de infecções sistêmicas por espécies de *Candida* não-*Candida albicans*. A epidemiologia e distribuição dos agentes etiológicos de infecções fúngicas relacionadas à assistência à saúde apresentam variações a cada região (YANG et al., 2014). Através dessas abordagens múltiplas, foram identificados todos os 52 isolados obtidos a partir de amostras biológicas de pacientes internado em UTI. 46 cepas pertencentes ao gênero *Candida* e seis cepas pertencentes ao gênero *Cryptococcus* (Figura 1).

Figura 1 - Espécies identificadas a partir de amostras clínicas de pacientes com levedurosos sistêmicas internados em Unidades de Terapia Intensiva.



Pappas et al., (2018) ratificaram que existe uma variabilidade geográfica substancial na prevalência de *Candida* spp. e que *C. albicans* continua sendo a espécie mais prevalente causando doenças em populações adultas e pediátricas. Contudo, dados publicados nas últimas décadas mostram uma diferença epidemiológica significativa no diagnóstico de candidíase invasiva por espécies não-*Candida albicans* em ambos os grupos. Em nossos dados, a prevalência de *C. tropicalis* pode ser justificada pelo uso específico de um antifúngico, bem como surtos clonais, possíveis em ambientes hospitalares.

Na América do Norte, Xiao et al., (2014) afirmaram que a espécie mais isolada é *C. albicans* seguida de *C. glabrata*. Já na América Latina, Europa e Ásia as espécies mais isoladas são *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Nossos resultados corroboram os dados obtidos na América Latina, onde *C. tropicalis* é a espécie mais presente. A verdade é que, as leveduras do gênero *Candida* continuam sendo os principais agentes etiológicos nas infecções fúngicas em hospitais de todo o mundo.

Assim como no presente estudo, Farooqi et al., (2013) relataram a alta incidência de *C. tropicalis* nos casos de candidíase sistêmica em adultos. Estes autores afirmaram, também, que a idade dos pacientes é o principal fator para o acometimento da doença. Diferente deste estudo, em 2016, Sutcu e seus colaboradores identificaram *Candida albicans* como a espécie mais incidente em casos de candidíase sistêmica.

Posteriormente, em 2017, Trouvé et al., coletaram dados de 30 hospitais na Bélgica e afirmaram que *C. albicans* foi isolada em mais da metade dos casos, seguido por *C. glabrata*. Esses resultados diferem da nossa pesquisa, bem como dos dados da rede de pesquisa em micoses invasivas da América Latina, as quais apontam como

espécies prevalentes *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (Colombo *et al.*, 2006; Nucci *et al.*, 2013).

Em nosso estudo foi identificada oito cepas do complexo *C. parapsilosis*, sendo duas cepas de *C. orthopsilosis* e as demais cepas de *C. parapsilosis* stricto sensu. Em 2015, Ziccardi *et al.*, avaliaram a prevalência deste complexo de espécies em casos de candidíase sistêmica no Brasil em dez anos de estudos, corroborando esta pesquisa, verificaram que a maioria das cepas deste complexo são espécies de *C. parapsilosis* stricto sensu.

Tabela 1A – Identificação dos isolados clínicos de leveduras isoladas de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva do Hospital das Clínicas/UFPE.

ISOLADO	MATERIAL BIOLÓGICO	CHROMagar <i>Candida</i>	VITEK	MALDI-TOF MS	BIOMOL
HC 01	Sangue	NI	NI	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
HC 02	Sangue	NI	<i>Candida glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
HC 03	LBA	<i>C. tropicalis</i>	<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
HC 04	Sangue	NI	<i>Candida albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
HC 05	Urina	NI	<i>Candida glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
HC 06	Sangue	NI	<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>
HC 07	LBA	NI	<i>Candida norvegensis</i>	<i>C. norvegensis</i>	<i>Pichia norvegensis</i>
HC 08	Urina	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
HC 09	LCR	NI	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
HC 10	Urina	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
HC 11	Sangue	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
HC 12	Sangue	<i>Candida albicans</i>	NI	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
HC 13	Sangue	NI	<i>Candida glabrata</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
HC 14	Sangue	NI	<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
HC 15	Sangue	NI	<i>Candida glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
HC 16	Sangue	<i>Candida tropicalis</i>	NI	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
HC 17	Sangue	<i>Candida albicans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
HC 18	Urina	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
HC 19	Sangue	NI	<i>Candida tropicalis</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
HC 20	Urina	NI	<i>Candida tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
HC 21	Sangue	NI	<i>Candida albicans</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>

Legenda: LBA = lavado broncoalveolar; LCR = líquido cefalorraquidiano; NI = não identificado;

Tabela 1B - Isolados clínicos de leveduras obtidas de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Agamenon Magalhães.

ISOLADO	MATERIAL BIOLÓGICO	CHROMagar <i>Candida</i>	PHOENIX BD	MALDI-TOF MS	BIOMOL
HAM 01	Sangue	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
HAM 02	Sangue	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
HAM 03	Sangue	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
HAM 04	Sangue	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
HAM 05	Sangue	NI	<i>Candida glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
HAM 06a	Sangue	NI	<i>Candida albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
HAM 06p	Sangue	NI	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
HAM 07	Sangue	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
HAM 08	Sangue	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
HAM 09	Sangue	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
HAM 10	Sangue	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
HAM 11	Sangue	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
HAM 12	Sangue	NI	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
HAM 13	Sangue	NI	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>
HAM 14	Sangue	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
HAM 15	Sangue	NI	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
HAM 16	Sangue	NI	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
HAM 17	Sangue	NI	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
HAM 18	Sangue	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
HAM 19	Sangue	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
HAM 20	Sangue	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
HAM 21	Sangue	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>

HAM 22	Sangue	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
HAM 23	Sangue	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
HAM 24	Sangue	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
HAM 25	Sangue	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
HAM 26	Sangue	NI	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
HAM 27	Sangue	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
HAM 28	Sangue	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
HAM 29	Sangue	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
HAM 30	Sangue	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>

Legenda: NI = não identificado;

4.3 CAPACIDADE DE ADERÊNCIAS ÀS CÉLULAS EPITELIAIS

Dentre os vários fatores de virulência presentes em cepas do gênero *Candida*, a adesão à células hospedeiras e/ou dispositivos médicos invasivos vem sendo uma importante característica detectada no início do processo infeccioso em humanos. Estudos afirmam que *Candida* sp. tem alta capacidade de adesão a superfície de diferentes biomateriais, sejam eles constituídos de plástico, vidro, cobre, cateteres venosos centrais, cateteres urinários e outros dispositivos usados em situações nas quais há necessidade de acesso permanente (DAGDEVIREN et al., 2005; BORGES et al., 2018).

As cepas isoladas no presente estudo apresentaram diferentes intensidades de adesão, dados apresentados na Figura 2 e nas Tabelas 2A e 2B. Nesta pesquisa, algumas cepas, principalmente as de *C. tropicalis*, apresentaram forte capacidade em aderir as células epiteliais. Em um estudo realizado por Menezes et al., (2013), ao analisar a capacidade de aderência de isolados clínicos de *Candida*, incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, foi observado que 79% dos isolados apresentaram propriedade de aderência, sendo as cepas de *C. tropicalis* as que apresentaram maiores níveis de adesão, corroborando os nossos achados.

Figura 2 – Células epiteliais da cavidade oral coradas com azul de metileno apresentando leveduras do gênero *Candida* fracamente (A e B) e fortemente (C e D) aderidas a sua superfície (400x).

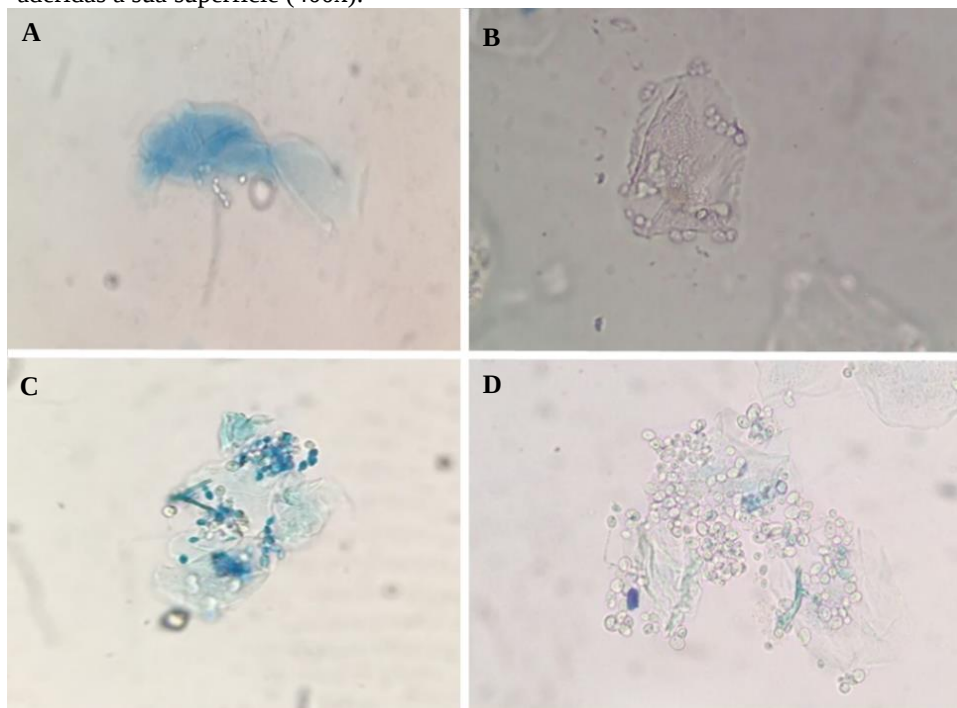


Tabela 2A - Avaliação da capacidade aderência a células epiteliais de isolados clínicos do gênero *Candida*.

Isolados	Espécies	Capacidade de aderência
HC 01	<i>C. glabrata</i>	-
HC 02	<i>C. glabrata</i>	-
HC 03	<i>C. tropicalis</i>	+
HC 04	<i>C. parapsilosis</i>	-
HC 05	<i>C. glabrata</i>	-
HC 06	<i>C. orthopsilosis</i>	++
HC 07	<i>P. norvegensis</i>	-
HC 08	<i>C. albicans</i>	+
HC 10	<i>C. tropicalis</i>	++
HC 11	<i>C. tropicalis</i>	++
HC 12	<i>C. albicans</i>	+
HC 15	<i>C. glabrata</i>	+
HC 16	<i>C. tropicalis</i>	++
HC 17	<i>C. albicans</i>	+
HC 18	<i>C. albicans</i>	++
HC 20	<i>C. glabrata</i>	-
HC 21	<i>C. orthopsilosis</i>	-

Legenda: Fraco (+); Forte (++); Sem aderência (-).

Tabela 2B - Avaliação da capacidade aderência a células epiteliais de isolados clínicos do gênero *Candida*.

Isolados	Espécies	Capacidade de aderência
HAM 01	<i>C. tropicalis</i>	+
HAM 02	<i>C. tropicalis</i>	-
HAM 03	<i>C. albicans</i>	+
HAM 04	<i>C. tropicalis</i>	-
HAM 05	<i>C. glabrata</i>	-
HAM 06a	<i>C. parapsilosis</i>	+
HAM 06p	<i>C. parapsilosis</i>	+
HAM 07	<i>C. tropicalis</i>	+
HAM 08	<i>C. tropicalis</i>	+
HAM 09	<i>C. tropicalis</i>	+
HAM 10	<i>C. albicans</i>	+
HAM 11	<i>C. albicans</i>	++
HAM 14	<i>C. tropicalis</i>	+
HAM 15	<i>C. tropicalis</i>	++
HAM 16	<i>C. parapsilosis</i>	-

HAM 17	<i>C. parapsilosis</i>	-
HAM 18	<i>C. tropicalis</i>	+
HAM 19	<i>C. tropicalis</i>	++
HAM 20	<i>C. albicans</i>	+
HAM 21	<i>C. tropicalis</i>	+
HAM 22	<i>C. albicans</i>	+
HAM 23	<i>C. albicans</i>	+
HAM 24	<i>C. tropicalis</i>	++
HAM 25	<i>C. albicans</i>	+
HAM 26	<i>C. parapsilosis</i>	+
HAM 27	<i>C. albicans</i>	++
HAM 28	<i>C. albicans</i>	++
HAM 29	<i>C. albicans</i>	++
HAM 30	<i>C. albicans</i>	++

Legenda: Fraco (+); Forte (++); Sem aderência (-).

Diferentemente do nosso estudo, Borges et al., (2018) relataram uma forte adesão e propriedades de formação de biofilme em cepas de *C. parapsilosis* através da aderência em dispositivos invasivos, essa forte adesão não foi vista em nossos resultados. Esses dados resultam que a expressão deste fator de virulência apresenta variações de acordo com a patogenicidade de cada cepa desta espécie.

Em um estudo realizado por Lima-Neto *et al.*, (2011), correlacionaram a capacidade de aderência de cepas de *C. albicans* e *C. parapsilosis* às células epiteliais bucais humanas, mostrando que a diferença individual entre as linhagens estava relacionada com um alto teor de um carboidrato específico presente na superfície celular. Dados esses podem justificar a diferença inter e intraespecífica da capacidade dos nossos isolados clínicos de *C. parapsilosis* em aderir a superfície de células hospedeiras.

4.4 CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME *IN VITRO* DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *Candida*

Com base na literatura, nossas análises foram realizadas com 48 horas e todos os isolados de *Candida* mostraram-se capazes em formar biofilmes com diferentes intensidades (Tabela 3A e 3B). Em 48 horas foi, claramente, observado a capacidade dos isolados clínicos em formar esse aglomerado de células, caracterizando um biofilme

maduro. Nossos resultados estão de acordo com Leite-Andrade et al., (2017), que relataram que o biofilme maduro por cepas clínicas de *Candida* ocorre em 48 horas.

Tabela 3A - Avaliação qualitativa da capacidade de formação de biofilme de isolados clínicos de *Candida*.

Isolados	Espécies	Intensidade do Biofilme
HC 01	<i>C. glabrata</i>	Fraca
HC 02	<i>C. glabrata</i>	Moderada
HC 03	<i>C. tropicalis</i>	Forte
HC 04	<i>C. parapsilosis</i>	Fraca
HC 05	<i>C. glabrata</i>	Moderada
HC 06	<i>C. orthopsilosis</i>	Fraca
HC 07	<i>P. norvegensis</i>	Fraca
HC 08	<i>C. albicans</i>	Forte
HC 10	<i>C. tropicalis</i>	Fraca
HC 11	<i>C. tropicalis</i>	Moderada
HC 12	<i>C. albicans</i>	Fraca
HC 15	<i>C. glabrata</i>	Fraca
HC 16	<i>C. tropicalis</i>	Moderada
HC 17	<i>C. albicans</i>	Fraca
HC 18	<i>C. albicans</i>	Moderada
HC 20	<i>C. glabrata</i>	Fraca
HC 21	<i>C. orthopsilosis</i>	Fraca

Tabela 3B - Avaliação qualitativa da capacidade de formação de biofilme de isolados clínicos de *Candida*.

Isolados	Espécies	Intensidade do Biofilme
HAM 01	<i>C. tropicalis</i>	Moderada
HAM 02	<i>C. tropicalis</i>	Fraca
HAM 03	<i>C. albicans</i>	Moderada
HAM 04	<i>C. tropicalis</i>	Fraca
HAM 05	<i>C. glabrata</i>	Fraca
HAM 06a	<i>C. parapsilosis</i>	Fraca
HAM 06p	<i>C. parapsilosis</i>	Fraca
HAM 07	<i>C. tropicalis</i>	Moderada
HAM 08	<i>C. tropicalis</i>	Moderada
HAM 09	<i>C. tropicalis</i>	Moderada
HAM 10	<i>C. albicans</i>	Moderada
HAM 11	<i>C. albicans</i>	Forte
HAM 14	<i>C. tropicalis</i>	Moderada

HAM 15	<i>C. tropicalis</i>	Forte
HAM 16	<i>C. parapsilosis</i>	Fraca
HAM 17	<i>C. parapsilosis</i>	Fraca
HAM 18	<i>C. tropicalis</i>	Forte
HAM 19	<i>C. tropicalis</i>	Moderada
HAM 20	<i>C. albicans</i>	Fraca
HAM 21	<i>C. tropicalis</i>	Moderada
HAM 22	<i>C. albicans</i>	Fraca
HAM 23	<i>C. albicans</i>	Moderada
HAM 24	<i>C. tropicalis</i>	Moderada
HAM 25	<i>C. albicans</i>	Moderada
HAM 26	<i>C. parapsilosis</i>	Fraca
HAM 27	<i>C. albicans</i>	Moderada
HAM 28	<i>C. albicans</i>	Forte
HAM 29	<i>C. albicans</i>	Moderada
HAM 30	<i>C. albicans</i>	Forte

Os ensaios para quantificação da produção do biofilme, foi analisado por meio de leitura em espectrofotômetro a 595 nm. Os valores de absorbância dos controles negativos foram subtraídos dos valores das cepas testadas para minimizar interferências potenciais (Figura 3A e 3B).

Figura 3A - Avaliação quantitativa, analisada por meio de leitura em espectrofotômetro a 595 nm, da capacidade de formação de biofilme de isolados clínicos de *Candida* em 48h.

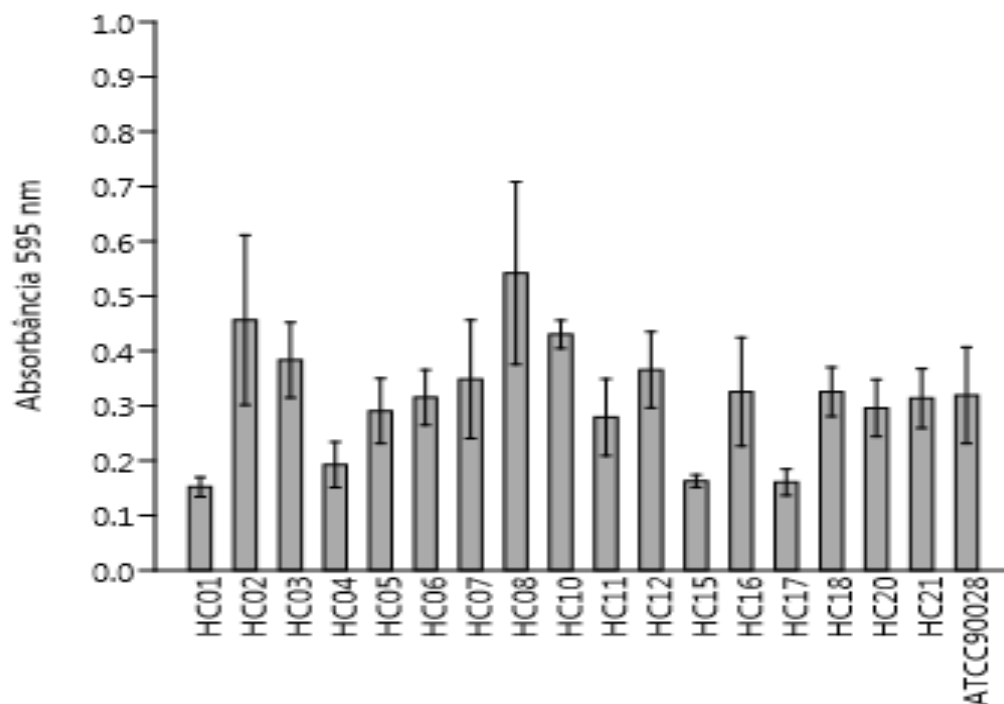
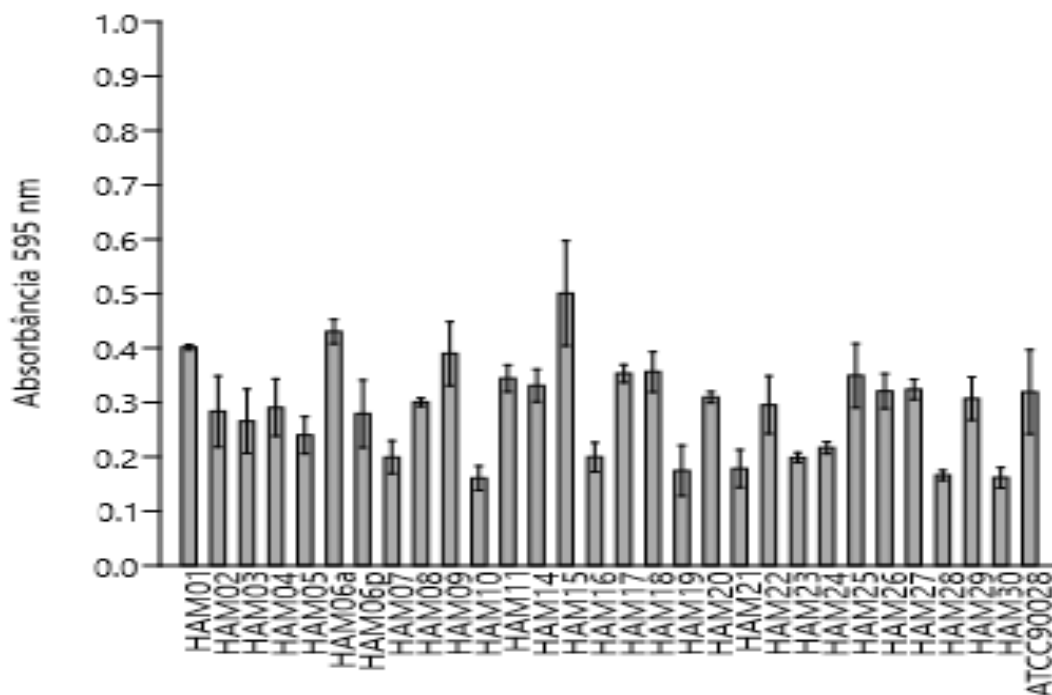


Figura 3B - Avaliação quantitativa, analisada por meio de leitura em espectrofotômetro a 595 nm, da capacidade de formação de biofilme de isolados clínicos de *Candida* em 48h.



Dentre os isolados representados na Figura 3A, em números, HC08 *C. albicans* foi o que apresentou a maior capacidade para a produção do biofilme. Estatisticamente,

não há diferença do isolado HC02 *C. glabrata* que foi o segundo maior produtor, neste ensaio. Já na Figura 3B, o isolado HAM15 *C. tropicalis* se destacou como maior produtor de biofilme em 48 horas, não havendo diferença estatística com HAM06a *C. parapsilosis* e HAM01 *C. tropicalis* que foram os que, em seguida, mais apresentaram capacidade de formar biofilme.

Dentre as cepas de *C. albicans* oriundas do HC, a cepa HC08 se mostrou diferente estatisticamente das cepas HC17 e HC18. Por outro lado a cepa HC12 se apresenta como semelhante, do ponto de vista estatístico, a HC08 na produção de biofilme. Entre as cepas do HAM, em números, HAM25 se apresentou como a maior produtora de biofilme e difere estatisticamente dos números obtidos de HAM10 e HAM23. As demais cepas não apresentam diferenças para cepa que mais produziu biofilme.

As cepas de *C. tropicalis* isoladas a partir de amostras clínicas de pacientes do HC, as cepas não apresentaram diferenças significantes na produção de biofilme, estatisticamente. Entre as cepas do HAM, em números, HAM15 se apresentou como a maior produtora de biofilme e tem diferença estatisticamente significativa dos números obtidos de HAM02, HAM04, HAM07 e HAM14. As demais cepas de mesma espécie não apresentam diferenças entre si.

Dentre as cepas do complexo *Candida parapsilosis* isoladas a partir de amostras clínicas de pacientes do HC, há diferença estatisticamente significativa entre as cepas HC06 e HC21. Entre as cepas do HAM, do ponto de vista estatístico, HAM06a se apresentou igual as demais cepas na produção do biofilme. Enquanto a cepa HAM26 apresenta diferença estatisticamente significativa das cepas HAM06a e HAM16.

Dentre as cepas de *Candida glabrata* isoladas a partir de amostras clínicas de pacientes do HC, a cepa HC02 apresenta diferença estatisticamente significativa com a cepa HC01. E a cepa HC15 também apresenta diferença significativa com a cepa HC02. As demais cepas são iguais, estatisticamente.

Em estudo realizado por Ferreira et al. (2013), ao analisar cepas clínicas de *Candida albicans* e *Candida não-Candida albicans*, foi observado que os biofilmes formados por isolados clínicos de *Candida não-Candida albicans* apresentaram atividades metabólicas mais elevadas do que biofilmes de *C. albicans*. Na nossa pesquisa cepas clínicas de *C. tropicalis* e *C. albicans* se destacaram na produção deste fator de virulência, no entanto, *C. glabrata* e outras cepas de *C. albicans* apresentaram capacidade reduzida em formar biofilmes.

Há relatos da afinidade de *C. albicans* em formar biofilme em diferentes superfícies de dispositivos médicos invasivos, enquanto biofilmes formados por *C. tropicalis* é mais relatado em superfícies de cateter (SILVA et al., 2009; NEGRI et al., 2010; CUÉLLAR-CRUZ et al., 2012; CHANDRA & MUKHERJEE, 2015). Apesar de dispositivos médico-invasivos exercerem um papel crítico na patogênese da candidíase invasiva, em certas situações o seu uso é indispensável. Cateteres venosos centrais são necessários no tratamento de pacientes em estado grave, minimizando a necessidade de punção venosa e facilitando a administração da terapêutica, hemoderivados etc (LEITE, 2016). Biofilmes assumem grande importância no cenário médico porque estão associadas com a persistência do microrganismo no processo infeccioso e na capacidade de expressar resistência contra a maioria dos antimicrobianos.

Em nosso estudo, com 48 h, foi observado um aglomerado intenso de células de leveduras ao fundo da placa, caracterizando a aderência e formação do biofilme. Todos os isolados exibiram diferentes níveis de intensidade (quantidade) de células fúngicas, quando comparado com o poço controle ao espectrofotômetro. Corroborando os nossos resultados, alguns trabalhos afirmam que diferentes cepas de uma mesma espécie são drasticamente diferentes na sua capacidade de formar estes agregados celulares, indicando que cepas formadoras de biofilmes "fortes" e "fracos" podem existir dentro uma mesma espécie (THEIN et al., 2007, LEITE-ANDRADE et al, 2017).

4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA *IN VITRO* DE ANTIFÚNGICOS COMERCIAIS FRENTE A ISOLADOS CLÍNICOS DE *Candida*

Foram avaliadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) de todos os isolados frente aos antifúngicos comerciais: fluconazol, anfotericina B, micafungina, caspofungina e anidulafungina, seguindo a metodologia de microdiluição em caldo, conforme estão demonstrados nas Tabelas 4A e 4B.

A variação dos valores de CIM foi de 2 a 64 µg/mL para fluconazol, sendo considerados, de maneira geral, sensíveis os isolados que apresentaram $CIM \leq 8$ µg/mL, sensível dose dependente os que apresentaram $CIM = 16-32$ µg/mL, e resistentes aqueles que apresentaram $CIM \geq 64$ µg/mL. Para a anfotericina B a variação dos valores de CIM foi de 1 a 16 µg/mL. Sendo considerados, de modo geral, sensíveis os isolados que apresentaram $CIM \leq 1$ µg/mL e resistentes aqueles que apresentaram CIM

$\geq 2 \mu\text{g/mL}$. Para as equinocandinas (micafungina, caspofungina e anidulafungina) a variação dos valores de CIM foi de 0,03 a $16 \mu\text{g/mL}$. Sendo considerados, de modo geral, sensíveis os isolados que apresentaram $\text{CIM} \leq 2 \mu\text{g/mL}$ e resistentes aqueles que apresentaram $\text{CIM} > 2 \mu\text{g/mL}$, de acordo com o CLSI.

Tabela 4A - Perfil de susceptibilidade antifúngica de isolados clínicos de leveduras obtidas de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva frente à antifúngicos comerciais.

Isolado	Espécie	ANF B	FLUZ	MICA	CASP	ANID
HC 01	<i>C. glabrata</i>	$4\mu\text{g/mL}$	$16\mu\text{g/mL}$	$0,03\mu\text{g/mL}$	$0,5\mu\text{g/mL}$	$0,5\mu\text{g/mL}$
HC 02	<i>C. glabrata</i>	$4\mu\text{g/mL}$	$16\mu\text{g/mL}$	$0,03\mu\text{g/mL}$	$0,06\mu\text{g/mL}$	$0,5\mu\text{g/mL}$
HC 03	<i>C. tropicalis</i>	$1\mu\text{g/mL}$	$16\mu\text{g/mL}$	$0,03\mu\text{g/mL}$	$0,06\mu\text{g/mL}$	$0,25\mu\text{g/mL}$
HC 04	<i>C. parapsilosis</i>	$1\mu\text{g/mL}$	$4\mu\text{g/mL}$	$4\mu\text{g/mL}$	$4\mu\text{g/mL}$	$16\mu\text{g/mL}$
HC 05	<i>C. glabrata</i>	$1\mu\text{g/mL}$	$4\mu\text{g/mL}$	$0,03\mu\text{g/mL}$	$0,03\mu\text{g/mL}$	$0,06\mu\text{g/mL}$
HC 06	<i>C. orthopsilosis</i>	$1\mu\text{g/mL}$	$32\mu\text{g/mL}$	$0,5\mu\text{g/mL}$	$1\mu\text{g/mL}$	$2\mu\text{g/mL}$
HC 07	<i>P. norvegensis</i>	$16\mu\text{g/mL}$	$16\mu\text{g/mL}$	$0,03\mu\text{g/mL}$	$0,5\mu\text{g/mL}$	$0,125\mu\text{g/mL}$
HC 08	<i>C. albicans</i>	$1\mu\text{g/mL}$	$8\mu\text{g/mL}$	$0,03\mu\text{g/mL}$	$0,125\mu\text{g/mL}$	$0,25\mu\text{g/mL}$
HC 10	<i>C. tropicalis</i>	$0,5\mu\text{g/mL}$	$8\mu\text{g/mL}$	$0,03\mu\text{g/mL}$	$0,5\mu\text{g/mL}$	$0,03\mu\text{g/mL}$
HC 11	<i>C. tropicalis</i>	$1\mu\text{g/mL}$	$64\mu\text{g/mL}$	$0,03\mu\text{g/mL}$	$0,06\mu\text{g/mL}$	$0,125\mu\text{g/mL}$
HC 12	<i>C. albicans</i>	$2\mu\text{g/mL}$	$4\mu\text{g/mL}$	$0,03\mu\text{g/mL}$	$0,5\mu\text{g/mL}$	$0,03\mu\text{g/mL}$
HC 15	<i>C. glabrata</i>	$4\mu\text{g/mL}$	$16\mu\text{g/mL}$	$0,03\mu\text{g/mL}$	$0,5\mu\text{g/mL}$	$0,25\mu\text{g/mL}$
HC 16	<i>C. tropicalis</i>	$4\mu\text{g/mL}$	$8\mu\text{g/mL}$	$0,03\mu\text{g/mL}$	$0,03\mu\text{g/mL}$	$0,25\mu\text{g/mL}$
HC 17	<i>C. albicans</i>	$4\mu\text{g/mL}$	$8\mu\text{g/mL}$	$0,03\mu\text{g/mL}$	$0,03\mu\text{g/mL}$	$0,03\mu\text{g/mL}$
HC 18	<i>C. albicans</i>	$0,5\mu\text{g/mL}$	$2\mu\text{g/mL}$	$0,03\mu\text{g/mL}$	$0,125\mu\text{g/mL}$	$0,03\mu\text{g/mL}$

HC 20	<i>C. glabrata</i>	0,5µg/mL	8µg/mL	0,03µg/mL	0,5µg/mL	0,25µg/mL
HC 21	<i>C. orthopsilosis</i>	1µg/mL	2µg/mL	1µg/mL	1µg/mL	4µg/mL

Legenda: ANF B=Anfotericina B; FLUZ=Fluconazol; MICA=Micafungina; CASP=Caspofungina; ANID=Anidulafungina.

Tabela 4B - Perfil de susceptibilidade antifúngica de isolados clínicos de leveduras obtidas de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva frente à antifúngicos comerciais.

Isolado	Espécie	ANF B	FLUZ	MICA	CASP	ANID
HAM 01	<i>C. tropicalis</i>	0,5µg/mL	8µg/mL	0,03µg/mL	0,5 µg/mL	0,25 µg/mL
HAM 02	<i>C. tropicalis</i>	1µg/mL	8µg/mL	0,03µg/mL	0,5µg/mL	0,125µg/mL
HAM 03	<i>C. albicans</i>	2µg/mL	4µg/mL	0,03µg/mL	0,125µg/mL	0,25µg/mL
HAM 04	<i>C. tropicalis</i>	0,5µg/mL	8µg/mL	0,03µg/mL	0,06µg/mL	0,125µg/mL
HAM 05	<i>C. glabrata</i>	2µg/mL	16µg/mL	0,03µg/mL	0,06µg/mL	0,5µg/mL
HAM 06a	<i>C. parapsilosis</i>	0,5µg/mL	1µg/mL	0,5µg/mL	2µg/mL	4µg/mL
HAM06p	<i>C. parapsilosis</i>	0,5µg/mL	1µg/mL	1µg/mL	2µg/mL	4µg/mL
HAM 07	<i>C. tropicalis</i>	0,5µg/mL	8µg/mL	0,03µg/mL	0,5µg/mL	0,25µg/mL
HAM 08	<i>C. tropicalis</i>	0,5µg/mL	8µg/mL	0,03µg/mL	0,06µg/mL	0,125µg/mL
HAM 09	<i>C. tropicalis</i>	0,5µg/mL	8µg/mL	0,03µg/mL	0,5µg/mL	0,5µg/mL
HAM 10	<i>C. albicans</i>	0,5µg/mL	2µg/mL	0,03µg/mL	0,125µg/mL	0,03µg/mL
HAM 11	<i>C. albicans</i>	0,5µg/mL	4µg/mL	0,03µg/mL	0,5µg/mL	0,06µg/mL
HAM 14	<i>C. tropicalis</i>	0,5µg/mL	8µg/mL	0,03µg/mL	0,5µg/mL	0,25µg/mL
HAM 15	<i>C. tropicalis</i>	2µg/mL	8µg/mL	0,03µg/mL	0,5µg/mL	0,125µg/mL
HAM 16	<i>C. parapsilosis</i>	0,5µg/mL	1µg/mL	0,03µg/mL	1µg/mL	2µg/mL
HAM 17	<i>C. parapsilosis</i>	0,5µg/mL	1µg/mL	0,03µg/mL	1µg/mL	2µg/mL

HAM 18	<i>C. tropicalis</i>	0,5µg/mL	8µg/mL	0,03µg/mL	0,06µg/mL	0,125µg/mL
HAM 19	<i>C. tropicalis</i>	1µg/mL	4µg/mL	0,03µg/mL	0,06µg/mL	0,5µg/mL
HAM 20	<i>C. albicans</i>	0,5µg/mL	2µg/mL	0,06µg/mL	1µg/mL	1µg/mL
HAM 21	<i>C. tropicalis</i>	1µg/mL	4µg/mL	0,03µg/mL	0,06µg/mL	1µg/mL
HAM 22	<i>C. albicans</i>	0,5µg/mL	2µg/mL	0,06µg/mL	1µg/mL	1µg/mL
HAM 23	<i>C. albicans</i>	0,5µg/mL	1µg/mL	0,03µg/mL	0,5µg/mL	0,25µg/mL
HAM 24	<i>C. tropicalis</i>	2µg/mL	8µg/mL	0,03µg/mL	0,06µg/mL	0,125µg/mL
HAM 25	<i>C. albicans</i>	0,5µg/mL	1µg/mL	0,03µg/mL	0,5µg/mL	0,25µg/mL
HAM 26	<i>C. parapsilosis</i>	2µg/mL	2µg/mL	0,5µg/mL	1µg/mL	2µg/mL
HAM 27	<i>C. albicans</i>	0,5µg/mL	1µg/mL	0,03µg/mL	0,5µg/mL	0,25µg/mL
HAM 28	<i>C. albicans</i>	0,5µg/mL	1µg/mL	0,03µg/mL	0,5µg/mL	0,25µg/mL
HAM 29	<i>C. albicans</i>	0,5µg/mL	1µg/mL	0,03µg/mL	0,5µg/mL	0,25µg/mL
HAM 30	<i>C. albicans</i>	0,5µg/mL	1µg/mL	0,03µg/mL	0,25µg/mL	0,25µg/mL

Legenda: ANF B=Anfotericina B; FLUZ=Fluconazol; MICA=Micafungina; CASP=Caspofungina; ANID=Anidulafungina.

O aumento da incidência de espécies de *Candida* não-*Candida albicans* pode estar sendo influenciada pela profilaxia antifúngica com fluconazol, visto que, pacientes expostos a fluconazol são mais susceptíveis a adquirir resistência à infecções por *Candida* do que os não tratados profilaticamente com este fármaco (Leite, 2016). Isso corrobora os nossos resultados, várias cepas se apresentam pouco sensíveis ao fluconazol. Apesar de fluconazol ser o antifúngico comumente utilizado há décadas, devido ao seu amplo espectro de atividade, perfil de segurança favorável e biodisponibilidade, seu uso extenso como profilático resultou no desenvolvimento de resistência generalizada (ROBBINS et al., 2017).

Embora a multirresistência seja incomum, ocorreram relatos crescentes de multirresistência a azóis, equinocandinas e polienos em várias espécies de *Candida*,

mais notadamente *C. glabrata* e mais recentemente *C. auris* (ARENDRUP; PATTERSON, 2017). Pesquisadores afirmam que aproximadamente 10% dos isolados de *C. albicans* provenientes de amostras de sangue são resistentes ao fluconazol, dados esses que diferem dos nossos, os quais cerca de 20% (3/15) das cepas de *C. albicans* se apresentaram como resistente a este triazol.

Nossos resultados mostram 12 cepas, entre elas *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *P. novyensis*, resistentes a anfotericina B com CIM's que variaram de 2-16µg/mL. Desde sua descoberta, nos anos 50, os polienos têm sido empregados como importantes agentes fungicidas contra as espécies de *Candida* (SHAPIRO et al., 2011). A resistência, clinicamente relevante, aos polienos é extremamente rara (VINCENT et al., 2013). Apesar de sua boa atividade, o uso de polienos na prática clínica é limitado devido à elevada toxicidade, sobretudo nefrotoxicidade, o qual é um efeito adverso comum em pacientes tratados com anfotericina B.

Nossos resultados se apresentam relevantes no perfil de susceptibilidade de *Candida* spp. à equinocandinas onde temos elevados números de cepas resistentes a anidulafungina e caspofungina. Micafungina se apresentou 100% eficiente as cepas estudadas. Devido ao seu perfil de segurança e satisfatória atividade fungicida, as equinocandinas surgiram como terapia para o tratamento da candidíase sistêmica (PAPPAS et al., 2016). Nos dias atuais, seu uso como profilaxia tem aumentado e os tratamentos prolongados resultaram num aumento da incidência de cepas resistentes (GAMALETSOU et al., 2018). Neste estudo, seis cepas de *C. glabrata* se apresentaram resistentes: anidulafungina (3) e caspofungina (3). As infecções por esta espécie resistente a equinocandinas aumentaram drasticamente e agora já é uma preocupação, uma vez que muitos isolados apresentam resistência cruzada aos azóis (PERLIN, 2015).

4.6 PRODUÇÃO DE HEMOLISINAS POR ISOLADOS DE *Candida*

Atividade hemolítica em placa de ensaio: a atividade hemolítica foi avaliada para as espécies de *Candida* com base em zonas de hemólise no ensaio em placa (Figura 4). A produção de fator hemolítico por isolados clínicos de *Candida* é considerado um atributo importante na promoção da sobrevivência dentro do hospedeiro humano pela capacidade de assimilar ferro do grupo heme (FURLANETO et al., 2017).

Após incubação, as placas foram avaliadas de acordo com a presença de um halo translúcido esverdeado ao redor do inóculo. Os resultados estão representados por valores médios, de acordo com a quantificação dada pela fórmula $(H-C)/2$, sendo “H” a medida, em mm, do halo interno translúcido somado ao do halo externo marrom-esverdeado e “C” o diâmetro da colônia.

Em nosso estudo, todos os isolados de *Candida* foram avaliados quanto a capacidade hemolítica. Apenas três cepas (HAM15 *C. tropicalis*, HAM17 *C. parapsilosis* e HAM26 *C. parapsilosis*) não promoveram hemólise em meio Ágar Sabouraud suplementado com sangue de carneiro e glicose, conforme demonstrado na Tabela 5. A produção deste fator é variável entre as espécies de *Candida*, dentre estas *C. parapsilosis* é a espécie menos hemolítica (FURLANETO et al., 2017).

Figura 4 - Hemólise induzida por *Candida* spp. utilizando meio Ágar Sabouraud suplementado com sangue de carneiro e glicose, após 48 h a 35 °C. Os resultados mostram uma zona de hemólise composta por uma zona translúcida em torno da colônia e um halo esverdeado periférico.

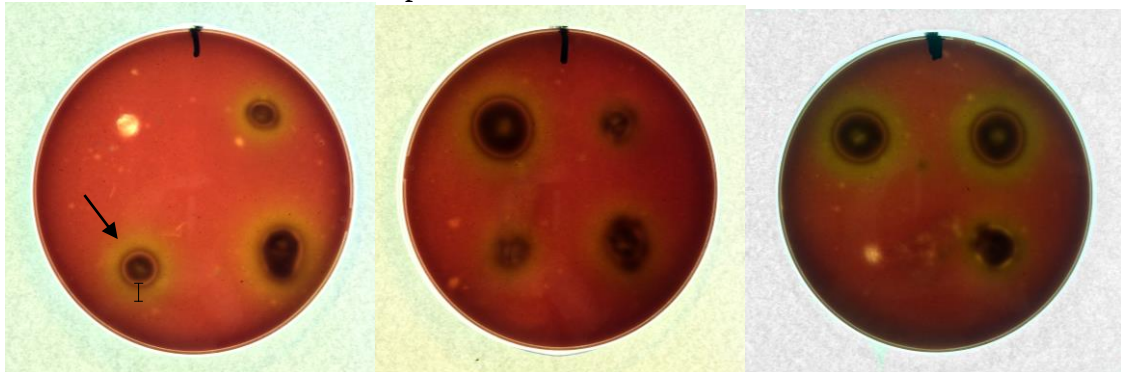


Tabela 5A - Avaliação da atividade hemolítica em placa de ensaio de isolados clínicos do gênero *Candida* e *P. norvegensis*.

Isolados	Espécies	Atividade Hemolítica
HC 01	<i>C. glabrata</i>	+++
HC 02	<i>C. glabrata</i>	+++
HC 03	<i>C. tropicalis</i>	++
HC 04	<i>C. parapsilosis</i>	+++
HC 05	<i>C. glabrata</i>	+++
HC 06	<i>C. orthopsilosis</i>	++
HC 07	<i>P. norvegensis</i>	+
HC 08	<i>C. albicans</i>	+++
HC 10	<i>C. tropicalis</i>	+
HC 11	<i>C. tropicalis</i>	+++
HC 12	<i>C. albicans</i>	+

HC 15	<i>C. glabrata</i>	+++
HC 16	<i>C. tropicalis</i>	+++
HC 17	<i>C. albicans</i>	+++
HC 18	<i>C. albicans</i>	+++
HC 20	<i>C. glabrata</i>	+
HC 21	<i>C. orthopsilosis</i>	+

Legenda: (-) para nenhuma atividade, (+) para uma atividade fraca (média do halo <1.0mm), e (++) para atividade leve (média do halo de 1-1.49mm), e (+++) para atividade forte (média do halo $\geq$ 1.5mm).

Tabela 5B - Avaliação da atividade hemolítica em placa de ensaio de isolados clínicos do gênero *Candida*.

Isolados	Espécies	Atividade Hemolítica
HAM 01	<i>C. tropicalis</i>	+
HAM 02	<i>C. tropicalis</i>	+
HAM 03	<i>C. albicans</i>	+
HAM 04	<i>C. tropicalis</i>	+
HAM 05	<i>C. glabrata</i>	++
HAM 06a	<i>C. parapsilosis</i>	+++
HAM 06p	<i>C. parapsilosis</i>	+++
HAM 07	<i>C. tropicalis</i>	+++
HAM 08	<i>C. tropicalis</i>	+++
HAM 09	<i>C. tropicalis</i>	++
HAM 10	<i>C. albicans</i>	++
HAM 11	<i>C. albicans</i>	++
HAM 14	<i>C. tropicalis</i>	++
HAM 15	<i>C. tropicalis</i>	-
HAM 16	<i>C. parapsilosis</i>	+
HAM 17	<i>C. parapsilosis</i>	-
HAM 18	<i>C. tropicalis</i>	+++
HAM 19	<i>C. tropicalis</i>	+
HAM 20	<i>C. albicans</i>	+
HAM 21	<i>C. tropicalis</i>	+++
HAM 22	<i>C. albicans</i>	+++
HAM 23	<i>C. albicans</i>	++
HAM 24	<i>C. tropicalis</i>	+
HAM 25	<i>C. albicans</i>	+
HAM 26	<i>C. parapsilosis</i>	-
HAM 27	<i>C. albicans</i>	++
HAM 28	<i>C. albicans</i>	++
HAM 29	<i>C. albicans</i>	+

HAM 30	<i>C. albicans</i>	+
Legenda: (-) para nenhuma atividade, (+) para uma atividade fraca (média do halo <1.0mm), e (++) para atividade leve (média do halo de 1-1.49mm), e (+++) para atividade forte (média do halo ≥1.5mm).		

A maioria dos isolados, independente da origem, foram capazes de promover hemólise, concordando com dados da literatura (FRANÇA et al., 2010). Isso indica a habilidade deste gênero em disponibilizar potenciais fontes de ferro. O fator hemolítico de *C. tropicalis* foi demonstrado pela primeira vez por FAVERO et al., (2011). Em nosso estudo também foi constatado a presença deste fator, não somente em cepas de *C. tropicalis*.

Dados na literatura afirmam que *C. albicans* possui a capacidade de utilizar ferro derivado de hemoglobina, por meio da produção de um fator responsável pela lise dos eritrócitos, uma habilidade que pode ser compartilhada por outras espécies, a exemplo do nosso trabalho que utilizou diferentes espécies de *Candida*, o que pode representar uma vantagem adaptativa no estabelecimento de infecções em seus hospedeiros. Outros autores, a exemplo de El-Houssaini et al., (2019), também destacam a produção de hemolisina por cepas de *C. albicans* como fator de virulência.

Atividade hemolítica em meio líquido: os resultados da avaliação da atividade hemolítica em meio líquido (Figura 5) estão representados por valores médios de absorbância, aplicados de acordo com a equação: $\text{Hemólise(\%)} = 100 - [(A_p - A_s) / (A_p - A_c) \times 100]$, conforme estão descritos na Tabela 6.

Figura 5 - Hemólise promovida por *Candida* spp. em meio RPMI suplementado com sangue de carneiro e glicose, após 15 h a 37 °C. Da direita para esquerda, controle positivo (lise total dos eritrócitos na presença de SDS); controle negativo (nenhuma hemólise de eritrócitos ressuspensa em meio de crescimento); ATCC90028; ATCC22019 com diferentes graus de hemólise.

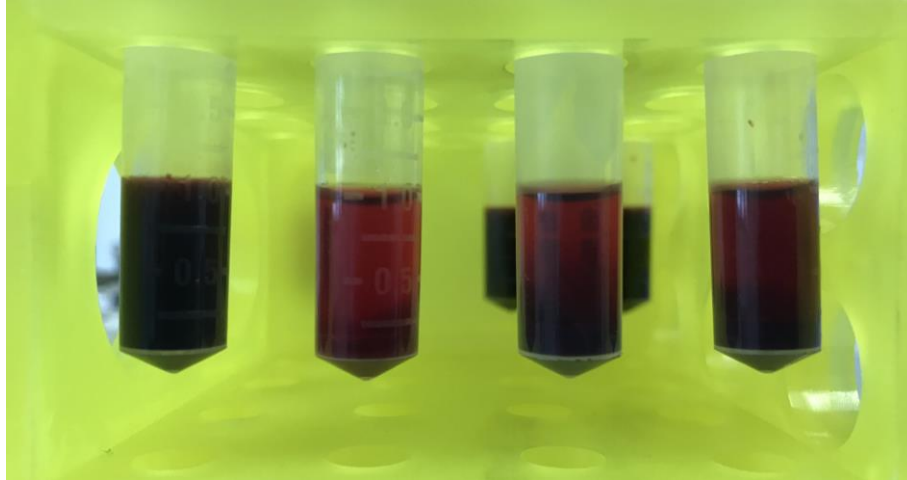


Tabela 6A - Avaliação da Atividade hemolítica em meio líquido de isolados clínicos do gênero *Candida* e *P. norvegensis*.

Isolados	Espécies	Hemólise (%)
HC 01	<i>C. glabrata</i>	-29,3
HC 02	<i>C. glabrata</i>	10,9
HC 03	<i>C. tropicalis</i>	9,7
HC 04	<i>C. parapsilosis</i>	-19,9
HC 05	<i>C. glabrata</i>	-44,7
HC 06	<i>C. orthopsilosis</i>	30,3
HC 07	<i>P. norvegensis</i>	-36,6
HC 08	<i>C. albicans</i>	-23,2
HC 10	<i>C. tropicalis</i>	-30,0
HC 11	<i>C. tropicalis</i>	0,5
HC 12	<i>C. albicans</i>	-57,6
HC 15	<i>C. glabrata</i>	-30,0
HC 16	<i>C. tropicalis</i>	-46,7
HC 17	<i>C. albicans</i>	-44,9
HC 18	<i>C. albicans</i>	11,5
HC 20	<i>C. glabrata</i>	-29,3
HC 21	<i>C. orthopsilosis</i>	-41,6

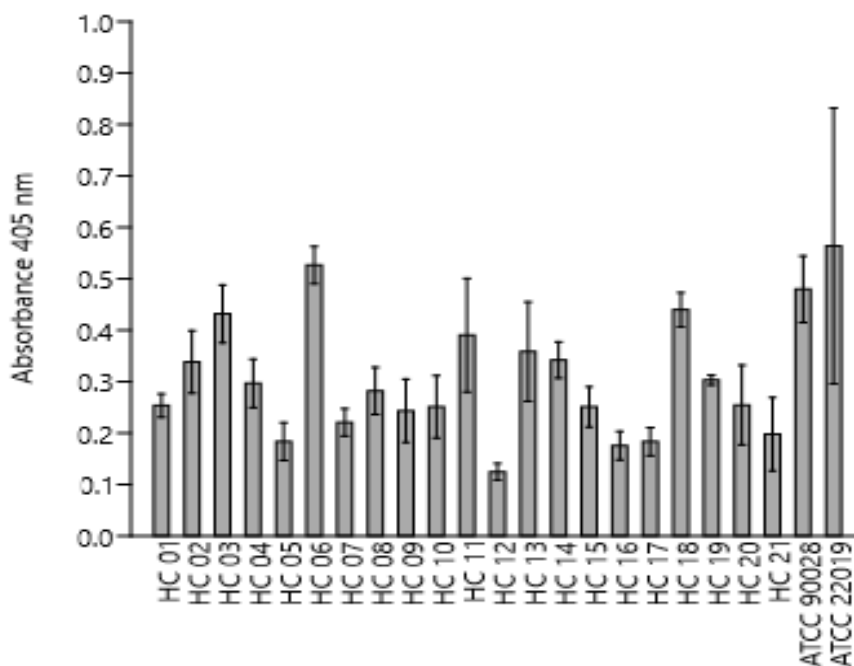
Tabela 6B - Avaliação da Atividade hemolítica em meio líquido de isolados clínicos do gênero *Candida*.

Isolados	Espécies	Hemólise (%)
HAM 01	<i>C. tropicalis</i>	61,0
HAM 02	<i>C. tropicalis</i>	-26,0
HAM 03	<i>C. albicans</i>	77,5
HAM 04	<i>C. tropicalis</i>	-35,7
HAM 05	<i>C. glabrata</i>	-24,5
HAM 06a	<i>C. parapsilosis</i>	3,6
HAM 06p	<i>C. parapsilosis</i>	29,7
HAM 07	<i>C. tropicalis</i>	-22,5
HAM 08	<i>C. tropicalis</i>	-18,2
HAM 09	<i>C. tropicalis</i>	82,1
HAM 10	<i>C. albicans</i>	-19,9
HAM 11	<i>C. albicans</i>	24,6
HAM 14	<i>C. tropicalis</i>	-3,7
HAM 15	<i>C. tropicalis</i>	4,9
HAM 16	<i>C. parapsilosis</i>	-28,9
HAM 17	<i>C. parapsilosis</i>	-1,5
HAM 18	<i>C. tropicalis</i>	-12,5
HAM 19	<i>C. tropicalis</i>	-20,1
HAM 20	<i>C. albicans</i>	71,8
HAM 21	<i>C. tropicalis</i>	38,0
HAM 22	<i>C. albicans</i>	16,3
HAM 23	<i>C. albicans</i>	-11,1
HAM 24	<i>C. tropicalis</i>	-40,1
HAM 25	<i>C. albicans</i>	28,3
HAM 26	<i>C. parapsilosis</i>	-35,7
HAM 27	<i>C. albicans</i>	-12,9
HAM 28	<i>C. albicans</i>	31,4
HAM 29	<i>C. albicans</i>	11,0
HAM 30	<i>C. albicans</i>	19,3

As amostras foram analisadas por absorbância a 405nm por espectrofotometria e estão representados por valores médios conforme Figura 6. A cepa HC06 *C. orthopsilosis* se destacou na atividade hemolítica, contudo não há diferença estatística significativa entre esta e demais cepas. Somado a isso, foi identificado diferença significativa entre ATCC22019 *C. parapsilosis* e HC12 *C. albicans* (Figura 6A).

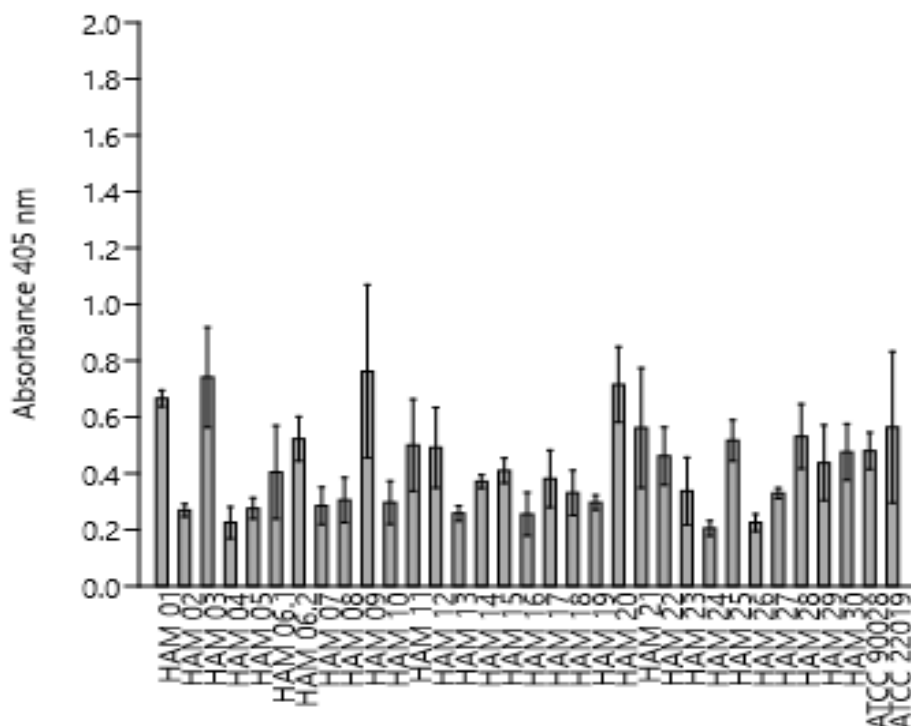
A capacidade dos microrganismos patogênicos em adquirir ferro elementar tem-se demonstrado fundamental em sua sobrevivência e capacidade de estabelecer infecção no hospedeiro. Quanto às espécies de *Candida*, *C. albicans* podem adquirir ferro dos eritrócitos humanos produzindo um fator hemolítico que promove lise destas células. Manns et al., (1994) foram os primeiros a descrever que *C. albicans* apresenta uma atividade hemolítica quando cultivada em Ágar Sangue enriquecido com glicose. Corroborando com nossos resultados, Luo et al. (2001), apresentaram uma abordagem semelhante para avaliar a atividade hemolítica de espécies de *Candida* não-*Candida albicans*, incluindo isolados de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.

Figura 6A - Análise da média da absorbância determinada a 405nm por espectrofotometria da atividade hemolítica promovida por *Candida* sp. com erro padrão ($P < 0,05$).



A cepa HAM09 *C. tropicalis* apresentou, em números, maior produção da atividade hemolítica, contudo não há diferença estatística significativa entre esta e demais cepas (Figura 6B). Nosso resultado difere dos obtidos por Rossoni et al., (2012) onde todas as cepas de *C. albicans* produziram atividade hemolítica e foi significativamente maior que as espécies não-*Candida albicans*. Já Favero et al., (2014) relataram diferentes níveis de atividade hemolítica observados para espécies de *Candida*, onde *C. tropicalis* exibiu a maior produção deste fator, corroborando como nossos resultados.

Figura 6B - Análise da absorbância determinada a 405nm por espectrofotometria da atividade hemolítica promovida por *Candida* sp.



Resultados da atividade hemolítica de *Candida* em meio líquido já foi relatado para *C. albicans* e *C. tropicalis* (Favero et al., 2011). Diferentemente, nosso estudo traz a produção do fator hemolítico por estas e outras espécies do gênero *Candida*.

De acordo com a literatura, a capacidade de *C. parapsilosis* de produzir fator hemolítico é controverso. Alguns estudos revelaram que esta espécie não é produtora de fator hemolítico (LUO et al., 2001; YIGIT et al., 2009), em contraste com o relatado por outros autores, como França et al., (2010) e Trevino-Rangel et al., (2013) que relataram atividade hemolítica abundante em cepas do complexo *Candida parapsilosis*. Em nossos resultados, a cepa HC06 *C. parapsilosis* se destacou na produção deste fator, por outro lado, HAM16 *C. parapsilosis* e HAM26 *C. parapsilosis* apresentaram baixa produção de atividade hemolítica. Isso demonstra que este fator não está diretamente relacionado com as espécies do complexo *C. parapsilosis* e sim com as características intrínsecas de cada cepa.

Outras espécies já foram relatadas como fracas ou não produtoras da atividade hemolítica, a exemplo de *C. guilliermondii*, como no estudo de Rossoni et al., (2012), as quais demonstraram que 58% das cepas estudadas exibiram forte atividade, com exceção das cepas de *C. guilliermondii* e de *C. parapsilosis*. Furlaneto et al., (2017) afirmaram que não existem diferenças intraespecíficas nas atividades hemolíticas entre os isolados

pertencentes a *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, contudo, observamos resultado diferente em nossa pesquisa.

A produção de fator hemolítico pelas espécies de *Candida* é afetada por vários fatores (MAYER et al. 2013), como suplementação de glicose no meio de cultura, origem sanguínea, presença de eritrócitos e hemoglobina e presença de eletrólitos (FURLANETO et al., 2017). Com base nos trabalhos existentes, muitas questões ainda precisam ser respondidas, incluindo a natureza bioquímica das moléculas hemolíticas e as bases moleculares da expressão do fator hemolítico. Considerando que a capacidade hemolítica é variável entre as espécies de *Candida* e que a hemólise é desencadeada sob condições específicas, pesquisas futuras são necessárias para aprofundar o papel da atividade hemolítica na patogênese da *Candida*.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados observados ao longo do desenvolvimento desta pesquisa podemos concluir que:

- 14% dos pacientes, com suspeita clínica de sepse, internados em Unidade de Terapia Intensiva apresentaram episódios de candidíase sistêmica;
- Técnicas moleculares, proteômicas e genômicas, são válidas e confiáveis para a identificação de espécies de *Candida*;
- *Candida tropicalis* é a espécie mais incidente em pacientes em Unidades de Terapia Intensiva;
- 79% das cepas clínicas isoladas apresentaram propriedade de aderência a células epiteliais;
- O tempo de 48 horas foi ideal para avaliação de biofilmes maduros;
- Todos os isolados clínicos de *Candida* mostraram-se capazes em formar biofilmes com diferentes intensidades; inclusive as leveduras que não apresentaram perfil de aderência às células epiteliais.
- A cepa HC08 *C. albicans*, HAM15 *C. tropicalis*, HC02 *C. glabrata* e HAM06a *C. parapsilosis* foram as cepas que se destacaram na produção do biofilme;
- 20% das cepas de *Candida albicans* se apresentaram resistente a fluconazol;
- *Candida norvegensis* se apresentou resistente a anfotericina B com alta CIM;
- Todas as cepas deste estudo foram susceptíveis a micafungina, sendo este o fármaco de melhor escolha para terapêutica;
- Em geral, quase todas as cepas deste estudo desenvolveram hemólise, com diferentes intensidades, em Ágar Sabouraud suplementado;
- Existe diferença intraespecífica na atividade hemolítica entre os isolados clínicos de *Candida*;
- Considerando que a capacidade hemolítica é variável, é necessário o uso de mais de uma metodologia para determinar a capacidade hemolítica em *Candida* spp.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA RS, WILSON D, HUBE B. *Candida albicans* iron acquisition within the host. *FEMS Yeast Res* 9:1000–1012. 2009.

ALMEIDA-JUNIOR, 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*, 67(10), 1229-1231. 2012.

ALMEIDA-JÚNIOR, J.N., SOUZA, L.B., MOTTA, A. L., ROSSI, F., DI GIOIA, T.S.R., BENARD, G., DEL NEGRO, G.M.B. Evaluation of the MALDI-TOF VITEKMS™ system for the identification of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* from bloodstream infections. *Journal of Microbiological Methods* 105:105–108. 2014.

ANDES, D. In vivo pharmacodynamics of antifungal drugs in treatment of candidiasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47:1179–1186. 2003.

ANGELETTI, S., LO PRESTI, A., CELLA, E., DICUONZO, G., CREA, F., PALAZZOTTI, B., DEDEJ, E., CICCOCCHI, M., DE FLORIO, L. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and Bayesian phylogenetic analysis to characterize *Candida* clinical isolates. *Journal of Microbiological Methods* 119:214–222. 2015.

ANTAS, P.R.Z., BRITO, M.M.S., PEIXOTO, E., PONTE, C.G.G., BORBA, C.M. Neglected and emerging fungal infections: review of hyalohyphomycosis by *Paecilomyces lilacinus* focusing in disease burden, in vitro antifungal susceptibility and management. *Microbes and infection* 14:1-8. 2012.

ANVISA. *Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): Brasília – BRASIL. 2013.

AREVALO, M.P. CARILLO-MUNOZ, A.J. SALGADO, J. CARDENES, D. BRIÓ, S. QUINDÓS, G. ESPINEL-INGROFF, A. Antifungal activity of the echinocandin anidulafungin (VER002, LY-303366) against yeast pathogens: a comparative study with M27-A microdilution method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51:163–166. 2003.

ASADZADEH M, AHMAD S, AL-SWEIH N, KHAN Z: Rapid and Accurate Identification of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by Real-Time PCR and Melting Curve Analysis. *Med Princ Pract* 2018.

BADER, O. et al. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(9)1359-65. 2011.

BAILLIE, G. S., DOUGLAS, L. J. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *Journal of Medical Microbiology*. 48:671–679. 1999.

BARNETT, J.A., PAINE, R.W., YARROW, D. *Yeasts: Characteristics and Identification*. 3ed., Cambridge, Cambridge University Press. 2000.

BARBEDO LS, VAZ C, PAIS C, FIGUEIREDO-CARVALHO MLG, MUNIZ MM, ZANCOPE-OLIVEIRA RM, SAMPAIO P. *Journal of Medical Microbiology* 64, 7–17. 2015.

BARCHIESI, F., CAGGIANO, G., FALCONI DI FRANCESCO, L., MONTAGNA, M. T., BARBUTI, S. & SCALISE, G. Outbreak of fungemia due to *Candida parapsilosis* in a pediatric oncology unit. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 49, 269–271. 2004.

BARON E. J., MILLER J. M., WEINSTEIN M. P., RICHTER S. S., GILLIGAN P. H., THOMSON R. B. et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM) (a). *Clin. Infect. Dis.* 57, e22–e121. 2013.

BASSETTI M, RIGHI E, ANSALDI F, MERELLI M, TRUCCHI C, DE PASCALE G. A multicenter study of septic shock due to candidemia: outcomes and predictors of mortality. *Intensive Care Medicine* 40(6):839– 45. 2014.

BERGAMASCO M.D., GARNICA M., COLOMBO A.L., NUCCI M. Epidemiology of candidemia in patients with hematologic malignancies and solid tumours in Brazil. *Mycoses* 56:256–63. 2013.

BIZZINI A, DURUSSEL C, BILLE J, GREUB G, PROD'HOM G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 48:1549–54. 2010.

BLANKENSHIP, J.R., MITCHELL, A.P. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology* 9: 588-594. 2006.

BLOT, S. I. et al. Effects of nosocomial candidemia on outcomes of critically ill patients. *The American Journal of Medicine* v. 113, p. 480-5. 2002

BORGES, K.R.A., PIMENTEL, I.V., LUCENA, L.C.L.S., SILVA, M.A.C.N., MONTEIRO, S.G., MONTEIRO, C.A., NASCIMENTO, M.D.S.B., BEZERRA, G.F.B. (2018). Adhesion and biofilm formation of *Candida parapsilosis* isolated from vaginal secretions to copper intrauterine devices. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 60, e59. Epub October 22, 2018.

CHANDRA J, MUKHERJEE P. *Candida* biofilms: development, architecture, and resistance. *Microbiol Spectr.* 2015 August ; 3(4). 2015.

COLOMBO A.L, GUIMARÃES T, SUKIENIK T., PASQUALOTTO A.C, ANDREOTTI R, QUEIROZ-TELLES F. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter

centers sequentially conducted over a 9-year Period. *Intensive Care Medicine* 40(10):1489–98. 2014.

COLOMBO, A.L. & GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36(5), 599-607. 2003.

COLOMBO, A.L., GUIMARÃES, T., CAMARGO, L.F.A., RICHTMANN, R., QUEIROZ-TELLES, F., SALLES, M.J.C., CUNHA, C.A., YASUDA, M.A.S., MORETTI, M.L., NUCCII, M. Brazilian guidelines for the management of candidiasis – a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 17(3):283–312. 2013.

COLOMBO, A.L., NUCCI, M. PARK, B.J, NOUÉR, S.A., ARTHINGTON-SKAGGS, B., MATTA, D.A., *et al.* Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical Microbiology*. 44:2816-2823. 2006.

COSTA A.C, PEREIRA C.A, FREIRE F, JUNQUEIRA J.C, JORGE A.O. Methods for obtaining reliable and reproducible results in studies of *Candida* biofilms formed *in vitro*. *Mycoses* 56: 614-622. 2013.

COSTA, A. F. Novas Abordagens no Diagnóstico Laboratorial de Micoses: o sistema MALDI-TOF MS. Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia. Universidade Federal de Santa Catarina. 2015.

CUÉLLAR-CRUZ, M., LÓPEZ-ROMERO, E., VILLAGÓMEZ-CASTRO, J.C, RUIZ-BACA, E. *Candida* species: new insights into biofilm formation. *Future Microbiology* 7: 755-771. 2012.

DAGDEVIREN M, CERIKCIOGLU N, KARAVUS M. Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalised patients. *Mycoses*. 48:321-6. 2005.

DA SILVA, W.J., GONÇALVES, L.M., SENEVIRATNE, J., PARAHITIYAWA, N., SAMARANAYAKE, L.P., DEL BEL CURY, A.A. Exopolysaccharide matrix of developed *Candida albicans* biofilms after exposure to antifungal agents. *Brazilian Dental Journal* 23: 716-722. 2012.

DE GROOT, P. W. J. *et al.* Adhesins in human fungal pathogens: Glue with plenty of stick. *Eukaryotic Cell*, v. 12, n. 4, p. 470–481. 2013.

DELALOYE J, CALANDRA T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. *Virulence* 5(1):161–9. 2014.

EL-HOUSSAINI, HOUDAI H.; ELNABAWY, OMNIA M.; NASSER, HEBATALLAH A.; WALID F. ELKHATIB. Correlation between antifungal resistance and virulence factors in *Candida albicans* recovered from vaginal specimens. *Microbial Pathogenesis*. V:128. 13-19. 2019.

FAROOQI, J.Q., JABEEN, K., SAEED, N., IQBAL, N., MALIK, B., LOCKHART, S.R., ZAFAR, A., BRANDT, M.E., HASAN, R. Invasive candidiasis in Pakistan: clinical characteristics, species distribution and antifungal susceptibility. *Journal of Medical Microbiology* 62: 259–268. 2013.

FAVERO, D., FRANÇA, E. J. G., FURLANETO-MAIA, L., QUESADA, R. M. B., FURLANETO, M. C. Production of haemolytic factor by clinical isolates of *Candida tropicalis*. *Mycoses* 54:816–820. 2011.

FRASER, M., BROWN, Z., HOULDSWORTH, M., BORMAN, A.M., JOHNSON, E.M. Rapid identification of 6328 isolates of pathogenic yeasts using MALDI-ToF MS and a simplified, rapid extraction procedure that is compatible with the Bruker Biotyper platform and database. *Medical Mycology* 54:80–88. 2016.

FURLANETO-MAIA L, SPECIAN A, BIZERRA F, OLIVEIRA M & FURLANETO M. 2007. In vitro evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp. obtained from elderly healthy individuals. *Mycopathologia* 166: 209–217. 2007.

GALES, A. C. et al. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and alpha-methyl-D-glucoside as determined with the API 20C AUX and vitek YBC systems. *Journal of Clinical Microbiology* 37(12):3804-8. 1999.

GAMALETSOU, MARIA N.; WALSH, THOMAS J.; SIPSAS, NIKOLAOS V.; Invasive Fungal Infections in Patients with Hematological Malignancies: Emergence of Resistant Pathogens and New Antifungal Therapies. *Turk J Hematol*; 35:1-11. 2018.

GEORGE, R.T., JOSE, C., THOMAS, F.P. Overview of anti-fungal agents. *Clinics In Chest Medicine* 30(2):203-15. 2009.

GIRARD, V., MAILLER, S., CHETRY, M., VIDAL, C., DURAND, G., BELKUM, A.V., COLOMBO, A. L., HAGEN, F., MEIS, J.F., CHOWDHARY, A. Identification and typing of the emerging pathogen *Candida auris* by matrix-assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry. *Mycoses* 59:535–538. 2016.

GÓES-NETO, A., LOGUERCIO-LEITE, C., GUERRERO, R.T. DNA extraction from frozen fieldcollected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB-based methods. *Biotemas*, v.18, p.19-32. 2005.

GREEN, C.B., CHENG, G., CHANDRA, J., MUKHERJEE, P., GHANNOUM M.A., HOYER, L.L. RTPCR detection of *Candida albicans* ALS gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. *Microbiology* 150:267-275. 2004.

GRENFELL RC, DA SILVA JUNIOR AR, DEL NEGRO GMB, MUNHOZ RB, GIMENES VMF, ASSIS DM, ROCKSTROH AC, MOTTA AL, ROSSI F, JULIANO L, BENARD G, ALMEIDA JÚNIOR JN. Identification of *Candida haemulonii* Complex Species: Use of ClinProTools™ to Overcome Limitations of the Bruker Biotyper™, VITEK MS™ IVD, and VITEK MS™ RUO Databases. *Frontiers in Microbiology*. 7:940. 2016.

HAJJEH RA, SOFAIR AN, HARRISON LH, LYON GM, ARTHINGTON-SKAGGS BA, MIRZA SA. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *Journal of Clinical Microbiology* 42:1519-27. 2004.

HOBSON, R.P. The global epidemiology of invasive *Candida* infections is the tide turning? *Journal Hospital Infection* 55: 159-68. 2003.

HOGAN, D.A. Talking to themselves: autoregulation and *quorum sensing* in fungi. *Eukaryot Cell* 5: 613-619. 2006.

HOOG, G. S., GUARRO, J., GENE, J., FIGUERAS, M. J. *Atlas of Clinical Fungi*, 2ed., Utrecht/Reus, Centraalbureauvo or Schimmel cultures/Universitat Rovirai Virgili. 2000.

HORN, D.L., NEOFYTOS, D., ANAISSIE, E.J, FISHMAN, J.A, STEINBACH, W.J, OLYAEI, A.J, MARR, K.A, PFALLER, M.A, CHANG, C.H., WEBSTER, K.M. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clinical Infectious Diseases* 48(12):1695–1703. 2009.

HOYER, L.L. The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology* 9:176-180. 2001.

HUANG AM, NEWTON D, KUNAPULI A, GANDHI TN, WASHER LL, ISIP J, et al. Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. *Clinical Infectious Diseases* 57:1237–45. 2013.

HUBE, B. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology* 7:336-341. 2004.

KALIYAPERUMAL, M., KALAICHELVAN, P.T. *Ganoderma australe* from southern India. *Microbiological Research* 163: 286-292. 2008.

KARABIÇAK N, ULUDAĞ ALTUN H, KARATUNA O, HAZIROLAN G, AKSU N, ADILOGLU A, AKYAR I. Evaluation of Common Commercial Systems for the Identification of Yeast Isolates in Microbiology Laboratories: A Multicenter Study. *Mikrobiyol Bul*; 49(2): 210-220. 2015.

KAUFFMAN, C. A., PAPPAS, P.G., SOBEL, J.D., DISMUKES, W.E. *Essentials of Clinical Mycology*. Springer, ISBN 1441966390. 2011.

KLEIN S., ZIMMERMANN S., KOHLER C., MISCHNIK A., ALLE W., BODE K.A. Integration of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in blood culture diagnostics: a fast and effective approach. *Journal of Medical Microbiology* 61:323–31. 2012.

KUHN, D.M., GEORGE T., CHANDRA, J., MUKHERJEE, P.K., GHANNOUM, M.A. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46:1773–80. 2002.

KULLBERG B.J, ARENDRUP M.C. Invasive Candidiasis. *The New England Journal of Medicine* 373;15. 2015.

KURTZMAN, C.P., FELL, J.W. *The Yeasts*. 4ed. Amsterdam: Elsevier Science. Lamy B, Dargère S, Arendrup MC, Parienti J-J, Tattevin P. How to Optimize the Use of Blood Cultures for the Diagnosis of Bloodstream Infections? A State-of-the Art. *Frontiers in Microbiology*. 7:697. 2016. 1998.

LAVEZZO, B., STRATTA, C., BALLARIS, M.A., TANDOI, F., PANIO, A., DONADIO, P.P. AND SALIZZONI, M. Invasive *Candida* Infections in Low Risk Liver Transplant Patients Given No Antifungal Prophylaxis in the Post-operative Period. *Transplantation Proceedings*, 46, 2312-2313. 2014.

LIMA-NETO, R.G., BELTRÃO, E.I.C., OLIVEIRA, P.C., NEVES, R.P. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. *Mycoses* 54(1): 23–29. 2011.

LINARES CEB, LORETO ES, SILVEIRA CP, POZZATTI P, SCHEID LA, SANTURIO JM, ALVES SH. Enzymatic and hemolytic activities of *Candida dubliniensis* strains. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 49: 203-206. 2007.

LUO G, SAMARANAYAKE LP, CHEUNG BPK, TANG G. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of HLP gene expression in *Candida glabrata* and its possible role in in vivo haemolysin production. *APMIS* 112: 283–90. 2004.

LUO G, SAMARANAYAKE LP, YAU JY. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *J Clin Microbiol* 39: 2971–4. 2001.

MARCHETTI O, BILLE J, FLUCKIGER U, EGGIMANN P, RUEF C, GARBINO J, et al. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. *Clinical Infectious Diseases* 38:311-20. 2004.

MARKLEIN G, JOSTEN M, KLANKE U, MULLER E, HORRE R, MAIER T, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 47:2912–7. 2009.

MARTINEZ LR, FRIES BC. Fungal Biofilms: Relevance in the Setting of Human Disease. *Current Fungal Infection Reports* 4: 266-275. 2010.

MARTINEZ-LAMAS L., PEREZ DEL MOLINO, M.L., PARDO, F., VARELA E., REGUEIRO, B.J. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-

TOF) mass spectrometry vs conventional methods in the identification of *Candida* non-albicans. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 29: 568–572. 2011.

MATHÉ, L., VAN DIJCK, P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Current Genetics* 59: 251-264. 2013.

MAYER F,L, WILSON, D., HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 4: 119–128. 2013.

Menezes, V.M., Farias-Vale, I.N., Monteiro, S.G., Gonçalves, L.H.B., Figueiredo, P.M.S., Monteiro, C.A. 2013. Classificação da capacidade de adesão de isolados clínicos de *Candida* spp em padrões de arranjos celulares distintos. *Revista de Patologia Tropical* 42(3): 289-300.

MOHAMMADI R, FOROUGHIFAR E. *Candida* infections among neutropenic patients. *Caspian Journal of Internal Medicine* 7(2): 71-77. 2016.

MONTEIRO, D. R. et al. Adhesion of *Candida* biofilm cells to human epithelial cells and polystyrene after treatment with silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 114:410–412. 2014.

MOYES, D.L., RICHARDSON, J.P., NAGLIK, J.R. *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. *Virulence*. 6(4):338-346. 2015.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Medical Microbiology*. 7th edition. Iowa: Elsevier Health Sciences. 2012.

NAGAPPAN, V., DERESINSKI, S. Posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal agent, *Clinical Infectious Diseases*. 45:1610–1617. 2007.

NAICKER, S. D.; PATEL, M. *Dodonaea viscosa* var. *angustifolia* Inhibits Germ Tube and Biofilm Formation by *Candida albicans*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013:261978, p.1-7. 2013.

NEGRI, M., MARTINS, M., HENRIQUES, M., SVIDZINSKI, T., AZEREDO, J., OLIVEIRA, R. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. *Mycopathologia* 169: 175-182. 2010.

NUCCI M, QUEIROZ-TELLES F, TOBON AM, RESTREPO A, COLOMBO AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clinical Infectious Diseases*. 51:561–70. 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* 8:e59373. 2013.

OLIVEIRA VK, RUIZ LDA S, OLIVEIRA NA, MOREIRA D, HAHN RC, MELO AS, et al. Fungemia caused by *Candida* species in a children's public hospital in the city of São Paulo, Brazil: study in the period 2007-2010. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 46:301-5. 2014.

OLIVEIRA, J. C. *Tópicos em Micologia Médica*. 4ed. Rio de Janeiro. ISBN 85-900986-1-3. 2014.

PAM, V. K.; AKPAN, J. U.; ODUYEBO, O. O.; NWAOKORIE, F. O.; FOWORA, M. A.; OLADELE, R. O.; OGUNSOLA, F. T.; SMITH, S. I.; Flucanazole susceptibility and ERG11 gene expression in vaginal *Candida* species isolated from Iagos Nigeria. *Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, 3(1) 84-90. 2012.

PANNANUSORN, S., FERNANDEZ, V., ROMLING, U. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. *Mycoses* 56:264–272. 2013.

PAPPAS, P.G., REX, J.H., LEE, J., HAMILL, R.J., LARSEN, R.A., POWDERLY, W., KAUFFMAN, C.A., HYSLOP, N., MANGINO, J.E., CHAPMAN, S., HOROWITZ, H.W., EDWARDS, J.E., DISMUKES, W.E. NIAID Mycoses Study Group. A Prospective Observational Study of Candidemia: Epidemiology, Therapy, and Influences on Mortality in Hospitalized Adult and Pediatric Patients. *Clinical Infectious Diseases* 37 (5): 634-643. 2003.

PAPPAS PG, KAUFFMAN CA, ANDES DR, CLANCY CJ, MARR KA, ET al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 62:e1–50. 2016.

PAPPAS, PETER G., LIONAKIS, MICHAEL S., ARENDRUP, MAIKEN C., OSTROSKY-ZEICHNER, L., KULLBERG, BART J. Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*. (4):18026. 2018.

PASSOS XS, COSTA CR, ARAÚJO CR, NASCIMENTO ES, SOUZA LK, FERNANDES OLF, et al. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp. bloodstream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. *Mycopathologia* 163:145-151. 2007.

PERLIN DS. Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1354:1–11. 2015.

PETRIKKOS, G. SKIADA, A. Recent advances in antifungal chemotherapy. *International Journal of Antimicrobial Agents* 30:108–117. 2007.

PEYTON, L.R. GALLAGHER, S. HASHEMZADEH, M. Triazole antifungals: a review. *Drugs of Today* 51:705–718. 2015.

PFALLER M.A, DIEKEMA D.J, GIBBS D.L. Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion. *Journal of Clinical Microbiology* 45:1735–45. 2007.

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* 42: 4419–4431. 2004.

PFALLER, M.A., DIEKEMA, D.J., RINALDI, M.G., BARNES, G., HU, B., VESELOV, A.V. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* and Other Yeast Species to Fluconazole and Voriconazole by Standardized Disk Diffusion Testing. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (12): 5848-5859. 2005.

PFALLER, M.A., MOET, G.J., MESSER, S.A., JONES, R.N., CASTANHEIRA, M. Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). *Journal of Clinical Microbiology* 49(1):396-9. 2011.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Role of Sentinel Surveillance of Candidemia: Trends in Species Distribution and Antifungal Susceptibility. *Journal Clinical Microbiological* 40: 3551-3557. 2002.

PINCUS, D. H., ORENGA, S., CHATELLIER, S. Yeast identification: past, present, and future methods. *Medical Mycology*, 45, 97-121. 2007.

POSTERARO, B. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for discrimination between molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(7):2472-6. 2012.

POSTERARO, B., VELLA, A., COGLIATI, M., DE CAROLIS, E., FLORIO, A. R., POSTERARO, P., SANGUINETTI, M., TORTORANO, A. M. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-based method for discrimination between molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Journal of Clinical Microbiology* 50:2472–2476. 2012.

PRAKASH, A., SHARMA, C., SINGH, A., KUMAR SINGH, P., KUMAR, A., HAGEN, F., GOVENDER, N.P., COLOMBO, A.L., MEIS, J.F., CHOWDHARY, A. Evidence of genotypic diversity among *Candida auris* isolates by multilocus sequence typing, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and amplified fragment length polymorphism. *Clinical Microbiology and Infection*. 22:277.e1-277.e9. 2016.

QUINDÓS, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Revista Iberoamericana de Micología*. 31(1):42–48. 2014.

RAMAGE, G., MARTÍNEZ, J.P, LÓPEZ-RIBOT, J.L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Research* 6:979-986. 2006.

ROBBINS, N., CAPLAN, T., AND COWEN, L. E. Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* 71:753–75. 2017.

ROSSONI, R.D., BARBOSA, J.O., VILELA, S.F.G., JORGE, A.O.C., & JUNQUEIRA, J.C. Comparison of the hemolytic activity between *C. albicans* and non-*albicans* *Candida* species. *Brazilian Oral Research*, 27(6), 484-489. 2013.

SARDI JC, SCORZONI L, BERNARDI T, FUSCO-ALMEIDA AM, MENDES GIANNINI MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol* 62:10-24. 2013.

SCOTT L.J. Micafungin: A Review in the Prophylaxis and Treatment of Invasive *Candida* Infections in Paediatric Patients. *Pediatric Drugs* 19(1):81-90. 2017.

SENEVIRATNE, C.J., JIN, L., SAMARANAYAKE, L.P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Diseases* 14:582-590. 2008.

SHAPIRO RS, ROBBINS N, COWEN LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75:213–67. 2011.

SILVA, SÓNIA; NEGRI, MELYSSA; HENRIQUES, MARIANA; OLIVEIRA, ROSÁRIO; WILLIAMS, DAVID W.; AZEREDO, JOANA. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 36, Issue 2, Pages 288–305. 2012.

SILVA, C.M., CARVALHO, P.A.M.R., LEÃO, M.P.C., OLIVEIRA, N.T., JESUS, M.A.R., NEVES, R.P. Fungemia by *Candida pelliculosa* (*Pichia anomala*) in a Neonatal Intensive Care Unit: A Possible Clonal Origin. *Mycopathologia*, 174: 2. 2013.

SILVA, C.M.; PARAHYM, A. M. R. C.; MACEDO, D. P. C.; LIMA-NETO, R. G.; FRANCISCO, E. C.; MELO, A. S. A.; SILVA, M. C. M.; JUCÁ, M.B.; MELO, L. R. B.; AMORIM, R.; NEVES, R. P. Neonatal Candidemia Caused by *Candida haemulonii*: Case Report and Review of Literature. *Mycopathologia* 179: 1-5. 2015.

SILVA, S., HENRIQUES, M., MARTINS, A., OLIVEIRA, R., WILLIAMS, D., AZEREDO, J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Medical Mycology* 47: 681–689. 2009a.

SILVA, S., NEGRI, M., HENRIQUES, M., OLIVEIRA, R., WILLIAMS, D., AZEREDO, J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends in Microbiology* 19: 241-247. 2011.

SILVA, S., NEGRI, M., HENRIQUES, M., OLIVEIRA, R., WILLIAMS, D., AZEREDO, J. Silicone colonization by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine. *Journal of Medical Microbiology* 59: 747-754. 2010.

SILVA, S., NEGRI, M., HENRIQUES, M., OLIVEIRA, R., WILLIAMS, D.W., AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews* 36: 288-305. 2012.

SKLENÁR, Z., SCIGEL, V., HORÁCKOVA, K., SLANAR, O. Compounded preparations with nystatin for oral and oromucosal administration. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. 70: 759–762. 2013.

SOW D., B. FALL, M. NDIAYE, B.S. BA, K. SYLLA, R. TINE, A.C. LÔ, A. ABIOLA, B. WADE, DIENG T. *et al.*, Usefulness of MALDI-TOF mass spectrometry for routine identification of *Candida* species in a resource-poor setting. *Mycopathologia* 180: 173–179. 2015.

SPETTEL K, BAROUSCH W, MAKRISTATHIS A, ZELLER I, NEHR M, SELITSCH B, *et al.* Analysis of antifungal resistance genes in *Candida albicans* and *Candida glabrata* using next generation sequencing. *PLoS ONE* 14(1): e0210397. 2019.

STEFANIUK E, BARANIAK A, FORTUNA M, HRYNIEWICZ W. Usefulness of CHROMagar *Candida* Medium, Biochemical Methods--API ID32C and VITEK 2 Compact and Two MALDI-TOF MS Systems for *Candida* spp. Identification. *Polish Journal of Microbiology*. 65(1):111–114. 2016.

SURAJIT DAS, HIRAK R. DASH, NEELAM MANGWANI, JAYA CHAKRABORTY, SUPRIYA KUMARI. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms, *Journal of Microbiological Methods*. 103, 80-100, 2014.

SUTCU, M., SALMAN, N., AKTURK, H., DALGIC, N., TUREL, O., KUZDAN, C., KADAYIFCI, E. K., SENER, D., KARBUZ, A., ERTURAN, Z., SOMER, A. Epidemiologic and microbiologic evaluation of nosocomial infections associated with *Candida* spp in children: A multicenter study from Istanbul, Turkey. *American Journal of Infection Control* 44:1139-43. 2016.

THOMAZ DY, DE ALMEIDA JN JR, LIMA GME, NUNES MO, CAMARGO CH, GRENFELL RC, BENARD G, DEL NEGRO GMB. An Azole-Resistant *Candida* parapsilosis Outbreak: Clonal Persistence in the Intensive Care Unit of a Brazilian Teaching Hospital. *Front. Microbiol.* 9:2997. 2018.

TAFF, H.T, MITCHELL, K.F, EDWARD, J.A., ANDES D.R. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiology* 8: 1325-1337. 2013.

VAN VEEN S.Q., E.C. CLAAS AND E.J. KUIJPER. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *Journal of Clinical Microbiology* 48: 900–907. 2010.

VANDEPUTTE, P. FERRARI, S. COSTE, A.T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *International Journal of Microbiology*. Article ID 713687, 26 pages, doi:10.1155/2012/713687. 2012.

VAZQUEZ, J.A. SOBEL, J.D. Anidulafungin: a novel echinocandin. *Clinical Infectious Diseases* 43: 215–222. 2006.

VILGALYS, R., HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172 (8) 4238-4246; 1990.

VINCENT BM, LANCASTER AK, SCHERZ-SHOUVAL R, WHITESELL L, LINDQUIST S. Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B. *PLOS Biol.* 11:e1001692. 2013.

WANG, H., FAN, Y., KUDINHA, T., XU, Z., XIAO, M., ZHANG, L., FAN, X., KONG, F., XU, Y. A Comprehensive Evaluation of the Bruker Biotyper MS and Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Systems for Identification of Yeasts, Part of the National China Hospital Invasive Fungal Surveillance Net (CHIF-NET) Study, 2012 to 2013. *Journal of Clinical Microbiology* 54(5) 1376-1380. 2016.

WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, L. Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetics. In "PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications" (Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. Eds). *Academic Press*, 315–322, 1990.

WILLIAMS, D. W. et al. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. *Journal of Oral Microbiology*, v. 5, p. 1–8. 2013.

WISPLINGHOFF, H., BISCHOFF, T., TALLENT, S.M., SEIFERT, H., WENZEL, R.P., EDMOND, M.B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases* 39:309-17. 2004.

XIAO, D., ZHAO, F., ZHANG, H., MENG, F. AND ZHANG, J. Novel strategy for typing *Mycoplasma pneumoniae* isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry coupled with ClinProTools™. *Journal of Clinical Microbiology* 52, 3038–3043. 2014.

YANG ZT, WU L, LIU XY, ZHOU M, LI J, WU JY, et al. Epidemiology, species distribution and outcome of nosocomial *Candida* spp. bloodstream infection in Shanghai. *BMC Infectious Diseases* 14:241. 2014.

ZAKIKHANY K, NAGLIK J.R, SCHMIDT-WESTHAUSEN A, HOLLAND G, SCHALLER M, HUBE B. In vivo transcript profiling of *Candida albicans* identifies a gene essential for interepithelial dissemination. *Cellular Microbiology* 9:2938-2954. 2007.

ZARAGOZA, R. PEMÁN, J. The diagnostic and therapeutic approach to fungal infections in critical care settings. *Adv. Sepsis* 6:90-98. 2008.