Danilo Yamamoto Thomaz

Complexo *Candida parapsilosis*: identificação molecular das espécies, análise proteômica dos biofilmes por MALDI-TOF MS e investigação de um surto envolvendo isolados clínicos resistentes aos azólicos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Dermatologia
Orientadora: Dra. Gilda Maria Barbaro Del Negro

Versão corrigida conforme CoPGr6018/11

São Paulo
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Thomaz, Danilo Yamamoto
Complexo Candida parapsilosis : identificação molecular das espécies, análise proteômica dos biofilmes por MALDI-TOF MS e investigação de um surto envolvendo isolados clínicos resistentes aos azólicos / Danilo Yamamoto Thomaz. -- São Paulo, 2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.
Orientadora: Gilda Maria Barbaro Del Negro.

Descritores: 1.Micologia 2.Candidemia 3.Candida parapsilosis 4.Antifúngicos 5.Farmacorresistência fúngica 6.Biofilme 7.Biologia molecular 8.Técnicas de genotipagem 9.Mutação 10.Espectrometria de massas

USP/FM/DBD-415/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Aos meus amados tios, Valter, Nancy e Eliza, por me ensinarem, durante toda a caminhada deste trabalho, que a maior herança de uma família é a amizade que se constrói e se cultiva dentro dela.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me conceder a vida e a sabedoria para valorizá-la.

Aos meus pais, por proporcionarem as condições necessárias para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos meus tios Valter, Nancy e Eliza, por me adotarem em São Paulo-SP, e compartilharem comigo valores e princípios que jamais esquecerei.

Ao meu querido Ditian, por me ensinar que a idade não é um obstáculo para sermos melhores, mais humildes, simples e gratos.

Aos meus primos e irmãos, pela torcida e compreensão da minha presença diminuída nesse momento.

À Dra. Gilda Maria Barbaro Del Negro, pelos ensinamentos, orientação, dedicação, confiança e amizade. Um exemplo de orientadora e de caráter, de raro profissionalismo e autenticidade, além de sua enorme prestatividade e solidariedade. A gratidão e a admiração serão eternas.

Aos chefes do Laboratório de Micologia Médica (LIM-53), Prof. Dr. Gil Benard e Prof. Titular Carlos P. Taborda, pelo apoio e por me estimularem a desenvolver um olhar mais crítico em relação à pesquisa.

Aos funcionários, alunos, estagiários do LIM-53, e em especial aos meus irmãos de orientadora, Gabriel e Fernanda, por terem sido como uma família nesses quatro anos de convívio e aprendizado.

À Cintia Telles, gerente administrativa do laboratório na época, por ajudar diariamente um desconhecido, com aulas de inglês, preparatórias para o exame de proficiência. Inesquecível o quão grande é a sua boa vontade em ajudar o próximo.

À Ma. Gláucia e à Ma. Maína, do Laboratório de Micologia do HUMAP-UFMS, de Campo Grande-MS, por me incentivarem a ingressar na pesquisa, e pela colaboração no presente estudo, cedendo os isolados.

À farmacêutica Silvia, do Setor de Microbiologia do HU-USP, de São Paulo-SP, pela colaboração no presente estudo, cedendo os isolados.

Ao Dr. João Nobrega de Almeida Jr, médico da Divisão de Laboratório Central (LIM-03) do HC-FMUSP, pelos ensinamentos, apoio, incentivo e colaborações.

Ao Prof. Titular aposentado Luiz Juliano Neto, do Departamento de Biofísica da UNIFESP, por disponibilizar o espectrômetro de massas para a realização das análises proteômicas.

À Ma. Rafaella Grenfell de Carvalho, do Departamento de Biofísica da UNIFESP, pela amizade, auxílio nas análises de MALDI-TOF MS, colaborações e companheirismo nos congressos.

Ao Dr. Carlos Henrique Camargo, pesquisador científico do Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, pelo auxílio nas análises de genotipagem.

À Dra. Michele, do Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical (LIM-07), pelo auxílio nas análises pré-analíticas dos sequenciamentos.

À Profa. Dra. Marta Heloisa Lopes e à Profa. Titular aposentada Maria Aparecida Shikanai Yasuda, responsáveis pelo Labortatório de Imunologia (LIM-48), por disponibilizarem os equipamentos para a realização de experimentos.

A todos os funcionários e alunos do LIM-48, pelo convívio, amizade e auxílio no uso dos equipamentos.

Aos amigos do Laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos, do ICB-USP, em especial à Dra. Luciana Thomaz, pelos ensinamentos e as colaborações.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia (LIM-54), em especial à Ma. Ana Paula, pelo apoio, convívio, e principalmente, pela amizade, comemorando conquistas e superando frustrações, juntos.

Aos amigos do Laboratório de Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM-56), em especial à Isabel, Paulinha e a Ma. Juliana, por dividirem as angústias da pós-graduação, e principalmente os sorrisos e alegrias.

À Ma. Gabriela, do Laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose e outras Parasitoses (LIM-06), pela amizade e as trapalhadas que me fizeram rir nos momentos que eram para chorar.

Aos funcionários da infraestrutura e da teconolgia da informação, por nos socorrerem nas quedas de energia e dos sistemas.

Aos seguranças do IMT-USP e da FMUSP, que zelam por nós.

Às funcionárias da limpeza, por manterem a higiene do nosso local de trabalho.

Aos funcionários das secretarias do Departamento de Dermatologia, da Pós-Graduação e da Biblioteca, da FMUSP, pelas orientações e esclarecimentos.

Aos funcionários dos restaurantes universitários (bandejões), da Escola de Enfermagem e da Faculdade de Saúde Pública, da USP, pela refeição servida diariamente, e pelo simpático atendimento.

Aos órgãos de fomento à pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil, Nº Processo 455905/2014-2, e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas
Lista de tabelas
Lista de figuras
Resumo
Abstract
1 INTRODUÇÃO 1
2 OBJETIVOS 17
2.1 Objetivo geral 17
2.2 Objetivos específicos 17
3 MÉTODOS 18
3.1 Obtenção dos isolados do complexo *Candida parapsilosis* 18
3.2 Identificação molecular das espécies do complexo *Candida parapsilosis* 19
3.2.1 Extração do DNA genômico das leveduras 19
3.2.2 Preparo do *mix* de reagentes da *Polymerase Chain Reaction* (PCR) . 20
3.2.3 Identificação das espécies crípticas por RAPD 20
3.2.4 Identificação das espécies crípticas por RFLP 21
3.3 Identificação das espécies crípticas por MALDI-TOF MS 21
3.4 Teste de suscetibilidade aos antifúngicos (TSA) 22
3.5 Ensaios de formação de biofilme 24
3.5.1 Condições de cultivo e preparo do inóculo fúngico 24
3.5.2 Formação do biofilme 25
3.5.3 Quantificação da biomassa do biofilme 25
3.5.4 Quantificação da atividade metabólica do biofilme 26
3.5.5 Atividade *in vitro* dos antifúngicos contra os biofilmes 27
3.6 Análise proteômica de células planctônicas e sésseis por MALDI-TOF MS .. 29
3.6.1 Condições de cultivo das células planctônicas 29
3.6.2 Condições de cultivo das células sésseis 29
3.6.3 Extração proteica das células planctônicas e sésseis 30
3.6.4 Obtenção dos espectros de massas e criação dos superespectros 30
3.6.4.1 Plataforma VITEK-MS™ 30
3.6.4.2 Plataforma Microflex™ 31

3.7 Sequenciamento do gene *ERG11* dos isolados não suscetíveis aos azólicos ... 31
3.7.1 Amplificação do gene *ERG11* ... 32
3.7.2 Sequenciamento do gene *ERG11* ... 32
3.8 Genotipagem dos isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) ... 33
3.8.1 PFGE do DNA genômico dos isolados de *C. parapsilosis* NSA ... 33
3.8.1.1 Extração do DNA cromossômico ... 33
3.8.1.2 Digestão enzimática do DNA cromossômico ... 34
3.8.1.3 Eletroforese em campo pulsado do DNA cromossômico ... 35
3.8.1.4 Análise do padrão de bandas ... 35
3.8.2 Análise de microssatélites do genoma de *C. parapsilosis* ... 36
3.9 Investigação de um surto envolvendo isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) resistentes aos azólicos e correlação com os dados clínicos ... 37
3.10 Ética ... 38
3.11 Análise estatística ... 38
4 RESULTADOS ... 39
4.1 Isolados do complexo *Candida parapsilosis* obtidos ... 39
4.2 Identificação das espécies do complexo *Candida parapsilosis* ... 39
4.3 Suscetibilidade aos antifúngicos das células planctônicas ... 39
4.4 Quantificação da biomassa e da atividade metabólica dos biofilmes ... 40
4.5 Atividade *in vitro* dos antifúngicos contra os biofilmes ... 44
4.6 Análise proteômica de células planctônicas e sésseis por MALDI-TOF MS .. 44
4.7 Mutações do gene *ERG11* dos isolados de *C. parapsilosis* NSA ... 52
4.8 Genotipagem dos isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) ... 53
4.8.1 PFGE do DNA genômico dos isolados de *C. parapsilosis* NSA ... 53
4.8.2 Análise de microssatélites do genoma de *C. parapsilosis* ... 53
4.9 Investigação de um surto envolvendo isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) resistentes aos azólicos e correlação com os dados clínicos ... 57
5 DISCUSSÃO ... 60
6 CONCLUSÕES ... 74
7 ANEXOS ... 76
8 REFERÊNCIAS ... 86
Apêndice – Artigos científicos publicados

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D-DIGE	*Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis*
2D-PAGE	*Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
AAM	Alta Atividade Metabólica
AFB	Alta Formação de Biofilme
AMO	Aspirado de Medula Óssea
ANB	Anfotericina B
ANF	Anidulafungina
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
ATCC	*American Type Culture Collection*
BAM	Baixa Atividade Metabólica
BFB	Baixa Formação de Biofilme
CAF	Caspofungina
CCI	*Composite Correlation Index*
CHCA	*α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid*
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	*Clinical and Laboratory Standards Institute*
CNA	*Candida* não-*albicans*
CTI	Centro de Terapia Intensiva
CVC	Cateter Venoso Central
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	*Deoxyribonucleic acid*
DNS	*Dummy No Salt*
dNTP	*deoxyribonucleotide triphosphate*
DO	Densidade Óptica
EDTA	*Ethylenediamine tetraacetic acid*
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	*European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*
FLC	Fluconazol
HU-USP	Hospital Universitário da Universidade de São Paulo
HUMAP-UFMS	Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
IMT-USP	Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
ITS	*Internally Transcribed Spacer*

LIM	Laboratório de Investigação Médica
LS	Log-score
MALDI-TOF MS	*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry*
MAM	Moderada Atividade Metabólica
MFB	Moderada Formação de Biofilme
MIF	Micafungina
MLST	*Multilocus Sequence Typing*
MOPS	*3-(N-morpholino)propanesulfonic*
MSP	*Main Spectra*
NP	Nutrição Parenteral
NSA	Não Suscetíveis aos Azólicos
ORF	*Open Reading Frame*
PBS	*Phosphate Buffered Saline*
PC	Ponta de Cateter
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
PFGE	*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*
RAPD	*Random Amplified Polymorphic DNA*
RFLP	*Restriction Fragment Length Polymorphism*
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
RUO	*Research Use Only*
SA	Suscetíveis aos Azólicos
SADH	*Secondary Alcohol Dehydrogenase*
SDS	*Sodium Dodecyl Sulfate*
SMIC	*Sessile Minimal Inhibitory Concentration*
SNC	Sistema Nervoso Central
Taq	*Thermus aquaticus*
TRIS	*Tris(hydroxymethyl)aminomethane*
TSA	Teste de Suscetibilidade aos Antifúngicos
UPGMA	*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages*
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VRC	Voriconazol
XTT	*2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-(phenylamino)-carbonyl-2H-tetrazolium*
YPD	*Yeast Extract-Peptone-Dextrose*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de ponto de corte estabelecidos para interpretação dos testes de suscetibilidade aos antifúngicos para *Candida parapsilosis* 24

Tabela 2 - *Primers* empregados no sequenciamento do gene *ERG11* dos isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) não suscetíveis aos azólicos..... 33

Tabela 3 - *Primers* empregados na análise de microssatélites do genoma dos isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) 37

Tabela 4 - Identificação das espécies do complexo *Candida parapsilosis* e resultados dos testes de suscetibilidade aos antifúngicos dos isolados obtidos no HU-USP - 2008 a 2015 41

Tabela 5 - Identificação das espécies do complexo *Candida parapsilosis* e resultados dos testes de suscetibilidade aos antifúngicos dos isolados obtidos no HUMAP-UFMS - 2012 a 2016 42

Tabela 6 - Resultados dos testes de suscetibilidade aos antifúngicos das células sésseis dos isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) com alta formação de biofilme e da cepa *Candida albicans* SC5314..... 44

Tabela 7 - Perfil de suscetibilidade e análise das sequências do gene *ERG11* dos isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) não suscetíveis aos azólicos, obtidos no HUMAP-UFMS - 2012 a 2015..... 52

Tabela 8 - Matriz obtida pela análise de microssatélites dos 14 isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) e da cepa ATCC 22019 55

Tabela 9 - Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes do HUMAP-UFMS com culturas positivas para *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) não suscetíveis aos azólicos (NSA) clonais e isolados suscetíveis (SA) 59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de trabalho seguido durante o desenvolvimento deste estudo... 18

Figura 2 - Comparação da biomassa e atividade metabólica dos biofilmes formados por cepas de referência e isolados clínicos do complexo *Candida parapsilosis* 43

Figura 3 - Dendrograma gerado no VITEK-MS™ a partir dos *super-spectra* das células planctônicas (*planktonic*) e sésseis (*biofilm*) dos isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) com alta formação de biofilme e da cepa *Candida albicans* SC5314 (taxonomia absoluta) 45

Figura 4 - Matriz de *Composite Correlation Index* (CCI) gerada no VITEK-MS™ a partir dos *super-spectra* das células planctônicas (*planktonic*) e sésseis (*biofilm*) dos isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) com alta formação de biofilme e da cepa *Candida albicans* SC5314 (taxonomia absoluta)..... 45

Figura 5 - Dendrograma gerado no VITEK-MS™ a partir dos *super-spectra* das células planctônicas (*planktonic*) e sésseis (*biofilm*) dos isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) com alta formação de biofilme e da cepa *Candida albicans* SC5314 (taxonomia relativa) 46

Figura 6 - Matriz de *Composite Correlation Index* (CCI) gerada no VITEK-MS™ a partir dos *super-spectra* das células planctônicas (*planktonic*) e sésseis (*biofilm*) dos isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) com alta formação de biofilme e da cepa *Candida albicans* SC5314 (taxonomia relativa)..... 46

Figura 7 - Dendrograma gerado no Microflex™ a partir dos *Main Spectra* (MSP) das células planctônicas (*planktonic*) e sésseis (*biofilm*) dos isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) com alta formação de biofilme e da cepa *Candida albicans* SC5314 48

Figura 8 - Matriz de *Composite Correlation Index* (CCI) gerada no Microflex™ a partir dos *Main Spectra* (MSP) das células planctônicas (*planktonic*) e sésseis (*biofilm*) dos isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) com alta formação de biofilme e da cepa *Candida albicans* SC5314..... 48

Figura 9 - Espectros representativos dos MSP das células planctônicas (*planktonic*) e sésseis (*biofilm*) de *C. parapsilosis* (188 H) e de *C. albicans* SC5314. 49

Figura 10 - Sobreposição dos espectros representativos dos MSP das células planctônicas (*planktonic*) e sésseis (*biofilm*) do isolado 188 H de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*), no intervalo das massas relativas de 4000 a 8000 *m/z*..... 50

Figura 11 - Sobreposição dos espectros representativos dos MSP das células planctônicas (*planktonic*) e sésseis (*biofilm*) do isolado 188 H de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*), no intervalo das massas relativas de 8600 a 14600 *m/z*..... 50

Figura 12 - Sobreposição dos espectros representativos dos MSP das células planctônicas (*planktonic*) e sésseis (*biofilm*) da cepa *Candida albicans* SC5314, no intervalo das massas relativas de 4000 a 8000 *m/z*..... 51

Figura 13 - Sobreposição dos espectros representativos dos MSP das células planctônicas (*planktonic*) e sésseis (*biofilm*) da cepa *Candida albicans* SC5314, no intervalo das massas relativas de 8600 a 14600 *m/z*..... 51

Figura 14 - Padrão de bandas do PFGE do DNA genômico dos isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) não suscetíveis aos azólicos, após digestão com a enzima *Sfi*I 54

Figura 15 - Normalização pelo BioNumerics do padrão de bandas obtido no PFGE, utilizando como referência o marcador de peso molecular *Lambda Ladder*54

Figura 16 - Dendrograma de agrupamento dos 14 isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) e da cepa *Candida parapsilosis* ATCC 22019, baseado na análise de microssatélites de seus respectivos genomas..... 56

Thomaz DY. *Complexo Candida parapsilosis*: identificação molecular das espécies, análise proteômica dos biofilmes por MALDI-TOF MS e investigação de um surto envolvendo isolados clínicos resistentes aos azólicos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUÇÃO: A frequência de *Candida parapsilosis* tem apresentado considerável aumento em UTIs neonatais. Embora a taxa de resistência dessa espécie aos azólicos seja baixa, recentemente têm sido relatados surtos de candidemia por isolados resistentes. A capacidade de adesão e formação de biofilme por essa espécie confere maior potencial patogênico e resistência aos antifúngicos. Portanto, a vigilância epidemiológica, tanto da resistência aos antifúngicos como da virulência dos isolados, é fundamental para o controle e prevenção das infecções e surtos hospitalares. A técnica de MALDI-TOF MS pode ser uma ferramenta útil para realizar análises proteômicas das células planctônicas e sésseis de *Candida parapsilosis*, e identificar possíveis alvos terapêuticos ou biomarcadores, específicos do biofilme. MÉTODOS: Isolados clínicos do complexo *Candida parapsilosis* de dois hospitais universitários públicos brasileiros, foram submetidos à identificação por RAPD, RFLP e MALDI-TOF MS e aos testes de suscetibilidade aos antifúngicos. Ensaios de formação de biofilme foram realizados para quantificar a biomassa, a atividade metabólica e ainda, avaliar atividade *in vitro* dos antifúngicos contra as células sésseis dos isolados com alta formação de biofilme. A análise proteômica por MALDI-TOF MS das células planctônicas e sésseis dos isolados com alta formação de biofilme, foi realizada nas plataformas VITEK-MS™ e Microflex™. Isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) foram genotipados por PFGE e análise de microssatélites. Os genótipos foram correlacionados com dados clínicos, para investigar a ocorrência de um surto em CTI adulto, e as sequências do gene *ERG11* dos isolados não suscetíveis aos azólicos (NSA) foram analisadas. RESULTADOS: Foram obtidos 38 isolados do complexo *Candida parapsilosis*, sendo *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) a espécie de maior frequência, superando 80% em ambos os hospitais, seguida de *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Embora todos os isolados tenham sido suscetíveis à anfotericina B (< 2 mg/L) e apresentado suscetibilidade intermediária à anidulafungina, caspofungina e micafungina (> 0,002 mg/L), elevada frequência de não suscetibilidade (resistência ou suscetibilidade intermediária) ao fluconazol e voriconazol foi observada entre isolados de um dos

hospitais. Alta formação de biofilme foi observada apenas entre os isolados da espécie *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*). Por outro lado, a maioria dos isolados NSA, apresentou baixa formação de biofilme e baixa atividade metabólica. Apenas anfotericina B apresentou atividade contra os biofilmes de *Candida parapsilosis*. As duas plataformas de MALDI-TOF MS conseguiram diferenciar os perfis proteômicos das células planctônicas e sésseis dos isolados. A genotipagem de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) revelou a persistência de isolados clonais NSA e a mutação A395T no gene *ERG11* foi identificada exclusivamente entre os isolados resistentes ao azólicos. O uso de corticosteroide foi associado, estatisticamente, com a ocorrência de isolados clonais NSA. CONCLUSÕES: *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) se mantém como a principal espécie do complexo em infecções sanguíneas. Isolados resistentes aos azólicos, com mutações no gene *ERG11*, ocorreram nos dois hospitais avaliados. A correlação dos genótipos com os dados clínicos evidenciou a ocorrência de um surto envolvendo isolados clonais NSA, com associação estatisticamente significativa, ao uso prévio de corticosteroides. *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) foi a única espécie que apresentou alta formação de biofilme, o qual demonstrou elevada resistência às equinocandinas. As duas plataformas de MALDI-TOF MS, diferenciaram os perfis proteômicos, das células planctônicas e sésseis de *Candida parapsilosis*, demonstrando o potencial emprego dessa tecnologia na identificação de possíveis alvos terapêuticos ou biomarcadores, específicos de biofilmes.

Descritores: micologia; candidemia; *Candida parapsilosis*; antifúngicos; farmacorresistência fúngica; biofilme; biologia molecular; técnicas de genotipagem; mutação; espectrometria de massas.

Thomaz DY. *Candida parapsilosis complex*: molecular identification of species, proteomic analysis of biofilms by MALDI-TOF MS and investigation of an outbreak involving azole-resistant clinical isolates [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

INTRODUCTION: The frequency of *Candida parapsilosis* isolates has increased considerably in neonatal ICUs. Although resistance to azoles is usually low in this species, candidemia outbreaks by resistant isolates have been recently reported. The ability of adhesion and biofilm formation by this species confers higher pathogenic potential and resistance to antifungal agents. Therefore, establishment of profiles of antifungal susceptibility and virulence, besides the epidemiological surveillance of *C. parapsilosis* isolates are essential for the control and prevention of nosocomial infections and outbreaks. The MALDI-TOF MS technique can be a useful tool to perform proteomic analyzes of the planktonic and sessile cells of *Candida parapsilosis*, identifying possible biofilm-specific therapeutic targets or biomarkers. METHODS: *Candida parapsilosis* clinical isolates from two Brazilian public university hospitals were identified by RAPD, RFLP and MALDI-TOF MS and submitted to antifungal susceptibility tests. Biofilm formation assays were carried out to quantify the biomass and metabolic activity, and to evaluate the *in vitro* activity of antifungal drugs against the sessile cells of the isolates with high biofilm formation. Proteomic analysis of the planktonic and sessile cells of the isolates with high biofilm formation was performed in two MALDI-TOF MS platforms, VITEK-MS™ and Microflex™. *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) isolates were genotyped by PFGE and microsatellite analysis. The genotypes were correlated with clinical data to investigate the occurrence of an outbreak in the adult ICU and *ERG11* gene sequences from non-susceptible to azoles (NSA) isolates were also analyzed. RESULTS: 38 clinical isolates of the *Candida parapsilosis* complex were obtained, with *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) being the most frequent species (exceeding 80% in both hospitals), followed by *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*. Although all isolates were susceptible to amphotericin B (< 2 mg/L) and showed intermediate susceptibility to anidulafungin, caspofungin e micafungin (> 0,002 mg/L), high frequency of non-susceptibility (resistance or intermediate susceptibility) to fluconazole and voriconazole was observed among isolates from one of the hospitals. High biofilm formation was only observed among isolates of the *Candida parapsilosis*

(*sensu stricto*) species. On the other hand, most of the NSA isolates presented low biofilm formation and low metabolic activity. Only amphotericin B showed activity against *Candida parapsilosis* biofilms. The two MALDI-TOF MS platforms were able to differentiate the proteomic profiles of planktonic and sessile cells of isolates. *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) genotyping revealed the persistence of clonal NSA isolates. The A395T mutation in the *ERG11* gene was identified exclusively among azole resistant isolates. The use of corticosteroid was statistically associated with the occurrence of clonal NSA isolates. CONCLUSIONS: *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) remains the main species of the complex in bloodstream infections. Azole-resistant isolates with mutations in the *ERG11* gene are emerging in the two hospitals evaluated. Additionally, the correlation between the genotypes and the clinical data showed the occurrence of an outbreak involving isolates resistant to azoles, with a statistically significant association with previous use of corticosteroids. *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) was the only species that presented high biofilm formation and resistance against echinocandins. The two MALDI-TOF MS platforms differentiated the proteomic profiles of the planktonic and sessile cells of *Candida parapsilosis*, demonstrating the potential use of this technology to identify possible biofilm-specific therapeutic targets or biomarkers.

Descriptors: mycology; candidemia; *Candida parapsilosis*; antifungal agents; antifungal drug resistance; biofilm; molecular biology; genotyping techniques; mutation; mass spectrometry.

1 INTRODUÇÃO

A epidemiologia das infecções fúngicas sofreu grandes alterações nas últimas décadas, contudo, *Candida* permanece como um dos principais patógenos responsáveis por doenças graves em pacientes críticos (Bongomin *et al.*, 2017). Candidíase invasiva é um problema emergente em todo o mundo devido à implementação de terapias imunossupressoras agressivas (por exemplo, quimioterapia e transplantes), advento de novos fármacos imunomoduladores, aumento do uso de dispositivos invasivos, como cateter venoso central (CVC) e, ainda, cirugias abdominais de grande porte e uso de antibióticos de amplo espectro (Enoch *et al.*, 2017).

A taxa de mortalidade, o tempo de internação e os custos associados às infecções por *Candida* spp., estão entre os mais elevados dos episódios de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). Além disso, a emergência de isolados multirresistentes (duas ou mais classes de antifúngicos) reforça a importância da vigilância epidemiológica dessas infecções (Pfaller e Castanheira, 2016; Pappas *et al.*, 2018).

Aproximadamente 700 mil casos de candidíase invasiva, principalmente candidemia, foram estimados recentemente em uma análise global de infecções fúngicas que, entretanto, não incluiu China, India e EUA (Bongomin *et al.*, 2017). No Brasil, a prevalência de candidemia, com cerca de 29 mil casos por ano, foi a segunda maior entre 39 países, atrás apenas do Paquistão (Giacomazzi *et al.*, 2016; Bongomin *et al.*, 2017). A incidência brasileira dessa infecção tem aumentado acentuadamente nas duas últimas décadas, como consequência das mudanças nas características clínicas dos

pacientes e do limitado número de agentes antifúngicos disponíveis (Nucci, Queiroz-Telles, *et al.*, 2013).

A maior parte dos casos ocorre em unidades de terapia intensiva (UTI), com incidência de 5 a 10 vezes mais elevada, quando comparada às demais unidades hospitalares (Oud, 2016; Pappas *et al.*, 2016). Taxas de mortalidade superiores a 40% têm sido associadas a essas infeções, mesmo após a introdução de novos agentes antifúngicos (Antinori *et al.*, 2016).

A infecção de corrente sanguínea relacionada ao cateter é uma das infecções nosocomiais mais frequentes, com elevadas taxas de morbidade e mortalidade associadas (Bouza *et al.*, 2014). *Candida* spp. são responsáveis por cerca de 9% dos episódios dessas infecções na UTI, sendo o terceiro ou quarto agente mais frequentemente isolado (Bouza *et al.*, 2014; Candel *et al.*, 2018).

Espécies de *Candida* aderem avidamente aos materiais utilizados na fabricação de CVC, tornando-o uma fonte potencial de infecção e, consequentemente, um importante fator de risco para candidemia (Giri e Kindo, 2012). A manipulação inadequada dos dispositivos médicos pelos profissionais de saúde possibilita a infecção dos pacientes por isolados exógenos (Guinea, 2014).

O gênero *Candida* contém cerca de 300 espécies, das quais ao menos 30 causam doenças em humanos (Turner e Butler, 2014; Criseo *et al.*, 2015; Pfaller e Castanheira, 2016). Entretanto, mais de 90% das infecções invasivas são causadas por cinco espécies principais: *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, e *C. krusei* (Köhler *et al.*, 2017; Pappas *et al.*, 2018; Richardson *et al.*, 2018).

A ordem de distribuição dessas espécies pode variar de acordo com a localização geográfica e o grupo de risco atingido (Pemán e Quindós, 2016; Pfaller e Castanheira,

2016; Pappas *et al.*, 2018). *Candida albicans* tem sido a espécie mais frequentemente isolada dos episódios de candidemia, entretanto, nos últimos anos, espécies de *Candida* não-*albicans* (CNA) tornaram-se relevantes (Lamoth *et al.*, 2018; Pappas *et al.*, 2018). Dentre essas, estão as leveduras do complexo *C. parapsilosis*, ou denominadas *C. parapsilosis* (*sensu lato*), cuja frequência teve grande aumento nas últimas décadas (Guinea, 2014).

Três grandes programas de vigilância de base populacional, um mundial e dois norte-americanos (SENTRY, PATH, CDC), apresentaram a seguinte distribuição: *C. albicans* > *C. glabrata* > *C. parapsilosis* > *C. tropicalis* > *C. krusei* (Pfaller *et al.*, 2011; Cleveland *et al.*, 2012; Pfaller *et al.*, 2012), enquanto no programa de vigilância brasileiro (BrSCOPE), *C. glabrata* apresentou menor frequência: *C. albicans* > *C. parapsilosis* > *C. tropicalis* > *C. glabrata* > *C. krusei* (Doi *et al.*, 2016). Embora *C. albicans* tenha sido o principal agente de candidemia, as CNA representaram mais da metade dos isolados em ambos os estudos, contrapondo-se aos resultados divulgados anteriormente pelos programas SCOPE e ARTEMIS DISK (Wisplinghoff *et al.*, 2004; Pfaller *et al.*, 2010). As diferenças encontradas na proporção de episódios causados por *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, podem ser consequência do impacto climático, e de diferentes condutas terapêuticas e cuidados com CVC (Guinea, 2014).

Candida parapsilosis tem sido o principal agente causador de candidemia em alguns centros médicos dos EUA, Europa, Ásia e da América Latina, dentre os quais o Brasil, principalmente em UTIs neonatais (Bassetti *et al.*, 2013; Nucci, Queiroz-Telles, *et al.*, 2013; Marcos-Zambrano, Escribano, Sánchez, *et al.*, 2014; Pfaller *et al.*, 2014; Chan *et al.*, 2015; Caggiano *et al.*, 2017; Da Matta *et al.*, 2017; Mantadakis *et al.*, 2018).

Essa levedura é considerada comensal de pele, unha e mucosas de seres humanos e de mamíferos, e também ubíqua na natureza, por ser facilmente isolada de solo, plantas e água do mar (Van Asbeck *et al.*, 2009). Foi identificada, pela primeira vez, como um agente patogênico em 1940, ao causar uma endocardite fatal em um usuário de drogas intravenosas (Joachim e Polayes, 1940; Trofa *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2012).

Manifestações clínicas de *C. parapsilosis* incluem: endocardite, meningite, peritonite, artrite, endoftalmite, ceratite, otomicose, onicomicose, vulvovaginite e infecção do trato urinário (Van Asbeck *et al.*, 2009; Singaravelu *et al.*, 2014). O acometimento do sistema nervoso central (SNC) por *Candida* spp. pode ser decorrente da disseminação da infecção, e eleva as taxas de mortalidade para aproximadamente 90% (Góralska *et al.*, 2018). O maior número de casos de candidíase do SNC tem sido observado em crianças e neonatos (Katragkou *et al.*, 2017). *Candida parapsilosis* merece atenção, devido ao aumento de sua frequência nesta população (Trofa *et al.*, 2008).

Com o advento das técnicas moleculares em estudos taxonômicos, foi demonstrada a heterogeneidade genética entre os isolados de *C. parapsilosis*, pelo sequenciamento da região *Internally Transcribed Spacer* (ITS) (Lin *et al.*, 1995); esta heterogeneidade foi então confirmada, pelo polimorfismo apresentado após restrição enzimática de seus DNA totais, indicando que esta espécie consistia em três grupos de variantes: grupo I, grupo II e grupo III (Roy e Meyer, 1998). Posteriormente, a análise de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) evidenciou diferenças genotípicas suficientes para a definição de novas espécies: *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*), *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*, correspondentes aos grupos I, II e II, respectivamente (Tavanti *et al.*, 2005).

Devido à insuficiência das técnicas micológicas tradicionais para distinguir com precisão as espécies crípticas pertencentes a esse complexo, métodos moleculares têm sido utilizados (Criseo *et al.*, 2015). Entre eles, estão as técnicas de *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) e de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), descritos por Tavanti *et al.* (2005). A técnica de *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) também tem sido empregada para a identificação de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*), *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, mas o seu desempenho varia de acordo com a plataforma e versão do *software* utilizadas (Chao *et al.*, 2014; Nobrega De Almeida Júnior *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2017).

Candida parapsilosis (*sensu stricto*) é isolada de espécimes clínicos, com maior frequência, e apenas cerca de 10% dos isolados são representados por *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Diferenças na suscetibilidade aos antifúngicos e capacidade de formação de biofilme têm sido observadas entre as três espécies (Trofa *et al.*, 2008; Nosek *et al.*, 2009).

As infecções por *C. parapsilosis* têm sido atribuídas ao uso prolongado de cateteres e outros dispositivos invasivos. Enquanto a doença invasiva por *C. albicans* e *C. tropicalis* ocorre por transmissão vertical, normalmente precedida de colonização, *C. parapsilosis* é frequentemente transmitida horizontalmente, por fontes externas contaminadas, como as mãos dos profissionais de saúde, fluídos, cateteres e outros dispositivos (Trofa *et al.*, 2008; Singaravelu *et al.*, 2014).

Diversos estudos de tipagem molecular têm demonstrado surtos hospitalares de infecção por *C. parapsilosis* por transmissão horizontal, ao evidenciar a similaridade genética entre os isolados clínicos e os isolados das mãos dos profissionais de saúde

(Huang *et al.*, 1999; Barchiesi *et al.*, 2004; Van Asbeck *et al.*, 2007; Hernández-Castro *et al.*, 2010; Chow *et al.*, 2012). Falhas nos programas de prevenção e controle de infecção, como a desinfecção ambiental e higienização das mãos inadequadas, podem ser a principal razão para a ocorrência desses episódios em condições nosocomiais (Guo *et al.*, 2015; Qi *et al.*, 2018).

Embora o surgimento de surtos causados por *C. parapsilosis* não seja recente, informações sobre o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos dos isolados são relatadas apenas em alguns estudos (Wang, Zhang, *et al.*, 2016; Benedict *et al.*, 2017).

Isolados de *Candida* spp. resistentes aos antifúngicos não são comuns, mas têm sido cada vez mais identificados em todo o mundo (Arendrup, 2014; Perlin *et al.*, 2015; Da Matta *et al.*, 2017; Lamoth *et al.*, 2018). Diante disso, os mecanismos de resistência, como a alteração ou superexpressão do alvo do fármaco, aumento da expressão de bombas de efluxo e ativação da resposta ao estresse, têm sido investigados entre esses isolados (Castanheira *et al.*, 2016; Wiederhold, 2017; Revie *et al.*, 2018).

Isolados do complexo *C. parapsilosis* resistentes não são comuns (0–4,6% para fluconazol), mas o uso prolongado ou profilático de antifúngicos possibilita o surgimento de resistência (Trofa *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.*, 2016). Ao aplicar os novos valores de ponto de corte espécie-específicos para fluconazol (FLC), propostos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), o grupo multicêntrico FUNGEMYCA, observou na Espanha, o aumento da taxa de resistência para 5,5% e 0,3% em *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) e *C. orthopsilosis*, respectivamente (Cantón *et al.*, 2011).

O número de casos de candidemia devido a isolados de *C. parapsilosis* resistentes ao FLC tem aumentado nos últimos anos (Gonçalves *et al.*, 2016). A incidência mundial

de infecções causadas por *C. parapsilosis* resistente ao FLC, tem variado de 2 a 5% (Whaley *et al.*, 2016). E recentemente, a análise de uma coleção global de leveduras, detectou a resistência ao FLC em 3,8% dos isolados de *C. parapsilosis*, superando *C. albicans* e *C. tropicalis* (Castanheira *et al.*, 2017).

As recentes mudanças epidemiológicas na distribuição das espécies de *Candida* aumentaram o número de isolados resistentes ao FLC, incluindo *C. parapsilosis*, associados à candidemia em pacientes com neoplasias hematológicas, na Europa e EUA (Gamaletsou *et al.*, 2018). Em isolados de *C. parapsilosis*, a resistência ao FLC pode envolver a combinação de vários mecanismos moleculares, como a superexpressão ou mutação do gene *ERG11*, e superexpressão de genes que codificam bombas de efluxo (Souza *et al.*, 2015).

No Brasil, estudos recentes demonstraram o surgimento de isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) e *C. orthopsilosis*, com diminuição da suscetibilidade ao FLC (Da Costa *et al.*, 2014; Giacobino *et al.*, 2016; Alencar *et al.*, 2017). E o primeiro surto de candidemia causado por isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) resistentes a esse azólico, foi descrito no país (Pinhati *et al.*, 2016). Além disso, o tratamento antifúngico inadequado pode aumentar o tempo de hospitalização e os custos associados (Arnold *et al.*, 2010). Portanto, diferenças na suscetibilidade antifúngica das espécies do complexo *C. parapsilosis* enfatizam a importância e a necessidade da vigilância epidemiológica, e da determinação do perfil de suscetibilidade aos antifúngicos desses isolados, para direcionar a terapia mais adequada (Cantón *et al.*, 2011).

Embora as equinocandinas [anidulafungina (ANF), caspofungina (CAF) e micafungina (MIF)] apresentem potente atividade antifúngica, tão eficaz quanto anfotericina B (ANB) e com menos toxicidade, a concentração inibitória mínima (CIM)

para *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* é maior do que para outras espécies de *Candida* (Arendrup, 2013). No entanto, mesmo com CIM elevada, ficou demonstrada sua atividade *in vitro* e *in vivo* contra *C. parapsilosis* (Trofa *et al.*, 2008; Pammi *et al.*, 2013). Por outro lado, a maior incidência de episódios de candidemia persistentes causada por *C. parapsilosis*, em pacientes usando equinocandinas pode ser explicada pela atividade fungistática e não fungicida desses agentes antifúngicos contra esta espécie (Gonçalves *et al.*, 2016).

Acredita-se que alterações na subunidade FKS1 do complexo glucano-sintase justifiquem essas CIM elevadas para as equinocandinas (Van Asbeck *et al.*, 2009). Foi observada a substituição de uma alanina por uma prolina, na posição 660 em Fks1 do complexo *C. parapsilosis*, resultante de um polimorfismo de ocorrência natural (Garcia-Effron *et al.*, 2008). Contudo, até mesmo entre os isolados invasivos de *C. parapsilosis*, a taxa de resistência às equinocandinas é muito baixa (Chow *et al.*, 2012; Wang, Xu, *et al.*, 2016).

Equinocandinas têm sido recomendadas como terapia inicial de candidíase invasiva em pacientes criticamente doentes, sendo FLC um fármaco alternativo para pacientes clinicamente estáveis (De Rosa *et al.*, 2014; Bassetti *et al.*, 2016; Pappas *et al.*, 2016; Oleary *et al.*, 2017). No entanto, nos países em desenvolvimento, FLC tem sido frequentemente utilizado como antifúngico de primeira escolha, provavelmente devido ao seu menor custo em relação às equinocandinas (Nucci, Queiroz-Telles, *et al.*, 2013; Nucci, Thompson-Moya, *et al.*, 2013). Apesar de já estarem disponíveis, estas ainda são pouco utilizadas nos casos de candidemia na América Latina (Da Matta *et al.*, 2017).

Muitos micro-organismos crescem predominantemente na forma de biofilme, caracterizado por uma comunidade microbiana envolvida por uma matriz extracelular, e

frequentemente aderida a superfícies sólidas (bióticas e abióticas), favorecendo a sobrevivência, inclusive em dispositivos médicos (Nobile e Johnson, 2015; Silva *et al.*, 2017; Iñigo e Del Pozo, 2018). Estas comunidades microbianas são praticamente ubíquas, sendo observadas em condições experimentais, e naturais, como em interfaces líquido-ar (Nobile e Johnson, 2015; Del Pozo, 2018).

Estima-se que o biofilme esteja envolvido em 60–80% das infecções microbianas em humanos (Sardi *et al.*, 2014; Iñigo e Del Pozo, 2018; Lohse *et al.*, 2018). Numerosas doenças infecciosas persistentes e/ou causadas pelo uso de dispositivos médicos, em ambientes hospitalares, têm sido atribuídas ao biofilme, após o seu reconhecimento na década de 80 (Sardi *et al.*, 2014). Estima-se que até 80% de todos os micro-organismos cresçam como comunidades sésseis aderidas a uma superfície (Silva *et al.*, 2012; Polke *et al.*, 2015). As infecções por biofilme têm sido associadas a mais de 50% dos cateteres implantados, mesmo com admistração de altas doses de antifúngicos e remoção do dispositivo colonizado (Nobile e Johnson, 2015).

O biofilme pode ser definido como uma estrutura tridimensional complexa, formada por uma comunidade microbiana multicelular, embebida em uma matriz extracelular polissacarídica (Sardi *et al.*, 2014). Sua arquitetura pode ser visualizada *in situ*, por meio da microscopia eletrônica de varredura e da microscopia confocal de varredura a laser (Pires *et al.*, 2011; Lohse *et al.*, 2018).

A formação do biofilme de *Candida* spp. envolve quatro estágios: adesão, proliferação, maturação e dispersão (Iñigo e Del Pozo, 2018; Lohse *et al.*, 2018). Após cerca de 24 horas, em condições experimentais *in vitro*, o biofilme maduro é caracterizado por uma estrutura multicelular, envolvida por uma matriz extracelular, composta de proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucléicos (Lohse *et al.*, 2018).

Essa matriz confere proteção aos organismos sésseis contra a resposta imune do hospedeiro, desidratação, radiação ultravioleta, e agentes desinfetantes (Sardi *et al.*, 2014; Chandra e Mukherjee, 2015).

Dentre os fungos oportunistas de ambientes hospitalares, *C. albicans* e *C. parapsilosis* são as espécies que formam biofilmes mais robustos e com maior frequência (Bouza *et al.*, 2014; Larkin *et al.*, 2018). Enquanto o biofilme formado por *C. albicans* é mais complexo, por apresentar hifas verdadeiras, no de *C. parapsilosis* observa-se apenas pseudo-hifas (Trofa *et al.*, 2008; Lohse *et al.*, 2018). Além da espécie e do isolado, a formação e a manutenção do biofilme também são influenciadas pela composição química da superfície sobre a qual ele é estabelecido (Cuéllar-Cruz, López-Romero, *et al.*, 2012; Iñigo e Del Pozo, 2018).

Candida parapsilosis apresenta maior afinidade por material protético do que *C. albicans*, principalmente na presença de alto teor de glicose e lipídeos, justificando sua maior associação com a nutrição parenteral (NP) (Chow *et al.*, 2012). Portanto, a presença de cateter vascular e a administração de NP são os principais fatores de risco para infecção por *C. parapsilosis*, por predisporem a formação de biofilme no cateter (Pammi *et al.*, 2013). Além disso, a NP pode aumentar em até 40% o peso seco do biofilme formado por esta espécie (Kuhn *et al.*, 2004).

O biofilme de *C. parapsilosis* permanece viável por pelo menos quatro semanas sobre superfícies plásticas, possibilitando a colonização de dispositivos médicos e a ocorrência de surtos nosocomiais (Kuhn *et al.*, 2004; Singaravelu *et al.*, 2014; Welsh *et al.*, 2017). A formação de biofilme por essa espécie resulta em infecções frequentemente relacionadas ao uso de cateter, e com suscetibilidade diminuída aos antifúngicos (Guinea, 2014; Sanguinetti e Posteraro, 2016).

Maiores taxas de mortalidade têm sido associadas a isolados formadores de biofilme, em comparação com isolados não formadores (Silva *et al.*, 2012; Tumbarello *et al.*, 2012; Rajendran *et al.*, 2016), assim como à célula desprendida do biofilme, do que ao micro-organismo planctônico (Uppuluri *et al.*, 2010). Tais observações indicam a formação de biofilme como um importante e independente preditor de mortalidade (Cuéllar-Cruz, López-Romero, *et al.*, 2012; Rajendran *et al.*, 2016).

De fato, a capacidade de formação de biofilme representa um dos principais fatores de virulência associados às infecções por *C. albicans* (Pierce *et al.*, 2017). Recentemente, isolados de *C. parapsilosis* com alta ou moderada formação de biofilme, foram associados a elevadas taxas de mortalidade em pacientes com candidemia (Soldini *et al.*, 2018).

A coloração com cristal violeta e a reação de redução do sal de tetrazólio XTT [*2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-(phenylamino)-carbonyl-2H-tetrazolium hydroxide*)] são os ensaios colorimétricos mais comuns, para mensurar a formação e a atividade metabólica do biofilme, respectivamente (Lohse *et al.*, 2018). Os principais modelos *in vitro* são realizados em placas de microtitulação (Bouza *et al.*, 2014), e valores de *cut-off* foram propostos para distinguir isolados de *Candida* spp. em relação à capacidade de formação e à atividade metabólica do biofilme (Marcos-Zambrano, Escribano, Bouza, *et al.*, 2014).

Os biofilmes de *Candida* spp. exibem o fenótipo de resistência intrínseca contra antifúngicos convencionais (azóis e polienos) devido a um processo complexo e multifatorial que inclui redução da taxa de crescimento, limitação de nutrientes, produção de matriz extracelular, superexpressão de esteróis e bomba de efluxo na membrana das células sésseis, alta densidade celular e presença de células persistentes

(Silva *et al.*, 2017; Iñigo e Del Pozo, 2018; Kean *et al.*, 2018). No entanto, o grau de resistência do biofilme à ANB é menor do que aos azólicos (Taff *et al.*, 2013).

Durante o início da formação do biofilme, após a adesão, foi descrito o aumento da expressão dos genes de bombas de efluxo CDR1, CDR2, MDR1 e FLU1, que estão relacionados à resistência ao FLC; a hiper-regulação de genes da síntese de ergosterol durante a formação, ou o reduzido teor de ergosterol apresentado nas fases tardias do desenvolvimento, também contribuem para a resistência aos poliênicos (Polke *et al.*, 2015). E mesmo em concentrações elevadas e em combinação com CAF, os azólicos apresentaram pouco efeito contra os biofilmes de *Candida* spp. (Bouza *et al.*, 2014).

Em relação às equinocandinas, as CIM para as células sésseis são elevadas, mesmo quando as células planctônicas de *Candida* spp. são suscetíveis. Enquanto ANF apresentou maior atividade do que ANB contra biofilmes de *C. albicans*, depois de 24h de maturação, ANB teve maior atividade sobre o biofilme maduro de mais de 48h (Bouza *et al.*, 2014).

A matriz extracelular do biofilme de *C. parapsilosis* apresenta uma grande quantidade de carboidratos e baixo teor de proteínas (Silva, S. *et al.*, 2009), enquanto a de *C. albicans* é rica em proteínas (Chow *et al.*, 2012). Além de funcionar como uma barreira física, essa estrutura apresenta em sua composição, 1,3-β-D-glucana que ao ligar-se aos antifúngicos, dificulta a difusão dos mesmos dentro do biofilme (Polke *et al.*, 2015; Lohse *et al.*, 2018).

A diminuição da produção de matriz extracelular pelas equinocandinas ao inibir a síntese de 1,3-β-D-glucana (Larkin *et al.*, 2018), assim como os relatos de suas eficácias *in vitro* e *in vivo* contra infecções relacionadas ao cateter, indicam o uso dessa classe

antifúngica como uma potencial terapia anti-biofilme de *Candida* spp. (Lazzell *et al.*, 2009; Katragkou *et al.*, 2015).

Embora a CIM das equinocandinas para as células planctônicas de *C. parapsilosis* seja intrinsecamente elevada (Garcia-Effron *et al.*, 2008), alguns estudos demonstraram atividade desses fármacos contra os biofilmes dessa espécie (Kuhn *et al.*, 2002; Cocuaud *et al.*, 2005; Katragkou *et al.*, 2008; Prażyńska *et al.*, 2018). Portanto, é necessário analisar os antifúngicos mais adequados para o tratamento de infecções associadas ao biofilme de *C. parapsilosis*.

As diferenças na expressão de proteínas entre as células planctônicas e sésseis têm sido analisadas principalmente em *C. albicans* (Mukherjee *et al.*, 2005; Chaffin, 2008; Sardi *et al.*, 2014). A análise mais recente que demonstrou diferenças na expressão de proteínas da parede celular das células sésseis, em resposta ao estresse oxidativo, incluiu *C. parapsilosis* (Serrano-Fujarte *et al.*, 2016). E assim como em outras espécies, a participação de proteínas na adesão, etapa inicial de formação do biofilme, foi demonstrada em *C. parapsilosis* (Núñez-Beltrán *et al.*, 2017). Portanto, análises proteômicas das células planctônicas e sésseis dessa espécie, são relevantes para identificar possíveis proteínas com potencial para uso como biomarcadores, ou como alvos terapêuticos.

Análises proteômicas de células planctônicas e sésseis de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, têm sido realizadas por *Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (2D-PAGE) ou sua versão modificada *Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis* (2D-DIGE) (Martínez-Gomariz *et al.*, 2009; Seneviratne *et al.*, 2010; Serrano-Fujarte *et al.*, 2016). No entanto, são métodos laboriosos e pouco automatizados (Meleady, 2018).

MALDI-TOF MS é uma técnica rápida e reprodutível, de fácil execução, e de baixo custo, utilizada para identificação de micro-organismos, com precisão igual ou superior aos sistemas automatizados baseados em testes bioquímicos ou fenotípicos (Florio *et al.*, 2018). Nos últimos 20 anos, ela tem sido aplicada com frequência em investigações clínicas e bioquímicas, devido a sua capacidade analítica de detectar um amplo espectro de biomoléculas, como peptídeos e proteínas (Greco *et al.*, 2018).

A técnica de MALDI-TOF MS tem sido utilizada para identificar proteínas separadas por métodos baseados na eletroforese em gel, como 2D-PAGE (Greco *et al.*, 2018). Também foi utilizada para caracterizar e diferenciar os perfis proteômicos das células planctônicas de *Pseudomonas aeruginosa* e de seus biofilmes, em diferentes estágios de desenvolvimento (Pereira *et al.*, 2015), demonstrando uma nova aplicação dessa sofisticada tecnologia.

Os avanços contínuos da espectrometria de massas possibilitam que a proteômica analise diferenças na expressão de proteínas em diversas condições fisiológicas dos organismos, e descubra novas aplicações clínicas, como a identificação de biomarcadores, que podem auxiliar no diagnóstico precoce e melhor prognóstico da doença (Greco *et al.*, 2018). Contudo, poucos trabalhos têm explorado essa técnica para analisar células planctônicas e sésseis de *C. parapsilosis* (Kubesová *et al.*, 2012; Mlynáriková *et al.*, 2016).

JUSTIFICATIVA

Candida continua sendo um dos principais patógenos de infecções fúngicas em pacientes críticos, associada a elevadas taxas de mortalidade, tempo de internação e custos hospitalares. Episódios de candidíase invasiva têm aumentado no mundo todo, decorrente da introdução de novas abordagens clínicas imunossupressoras e do frequente uso de dispositivos médicos invasivos, como o CVC.

A maior parte dessas infecções ocorre em UTIs, frequentemente relacionadas ao cateter, devido à capacidade de *Candida* spp. de formar biofilme e colonizar este dispositivo. *Candida parapsilosis* é predominante em UTIs neonatais, e a principal espécie responsável pelos casos de candidemia, em alguns centros médicos dos EUA, Europa, Ásia e da América Latina.

Embora a resistência antifúngica em *C. parapsilosis* não seja comum, episódios de candidemia causada por isolados resistentes ao FLC têm aumentado nos últimos anos. Além disso, surtos de infecção por esta espécie têm sido descritos, inclusive no Brasil. No entanto, ainda são poucos os trabalhos que monitoram essa resistência e investigam a relação genética entre os isolados, possibilitando a ocorrência de surtos hospitalares não identificados.

Candida parapsilosis apresenta elevada afinidade por material protético, predispondo à formação de biofilme em cateter, dispositivo considerado como um dos principais fatores de risco para infecção por esta espécie. O biofilme, além diminuir a suscetibilidade aos antifúngicos, representa um importante fator de virulência, que contribui para elevadas taxas de mortalidade.

Apesar da associação do biofilme de *C. parapsilosis* com infecções relacionadas ao cateter, poucos estudos analisaram as diferenças na expressão de proteínas entre células planctônicas e sésseis dessa espécie.

Deste modo, a vigilância epidemiológica e do perfil de suscetibilidade aos antifúngicos de *C. parapsilosis*, é necessária para o controle de infecções e prevenção de surtos hospitalares, principalmente envolvendo isolados resistentes. Métodos moleculares são importantes para a detecção de surtos, assim como para compreender os mecanismos envolvidos na resistência aos antifúngicos. Além disso, a elevada resistência e mortalidade associadas ao biofilme exigem a busca de novas abordagens terapêuticas, incluindo novos fármacos. A aplicação de tecnologias mais sofisticadas, que tornam as análises proteômicas mais rápidas, reprodutíveis e de menor custo, pode contribuir para a identificação de biomoléculas específicas do biofilme, com potencial para candidatas à biomarcadores ou novos alvos terapêuticos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo analisar a virulência e resistência antifúngica em espécies crípticas de isolados clínicos do complexo *Candida parapsilosis* e investigar a ocorrência de um surto hospitalar pela genotipagem dos isolados.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Definir a distribuição de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*), *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* em um hospital universitário de São Paulo-SP e um de Campo Grande-MS;

2.2.2 Analisar as técnicas de RAPD, RFLP e MALDI-TOF MS na identificação das espécies do complexo *C. parapsilosis*;

2.2.3 Verificar a ocorrência de resistência *in vitro* dos isolados à anfotericina B, fluconazol, voriconazol, anidulafungina, caspofungina e micafungina;

2.2.4 Avaliar a capacidade de formação de biofilme como atributo de virulência dos isolados, estabelecendo a relação entre biomassa e atividade metabólica, e avaliar a atividade *in vitro* da anfotericina B e equinocandinas sobre biofilmes;

2.2.5 Diferenciar os perfis proteômicos das células planctônicas e das células sésseis de *C. parapsilosis* por MALDI-TOF MS;

2.2.6 Investigar o mecanismo de resistência por sequenciamento do gene *ERG11* dos isolados não suscetíveis aos azólicos (NSA);

2.2.7 Investigar a ocorrência de um surto pela genotipagem dos isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) por PFGE e análise de microssatélites, e correlacionar os genótipos com os dados clínicos.

3 MÉTODOS

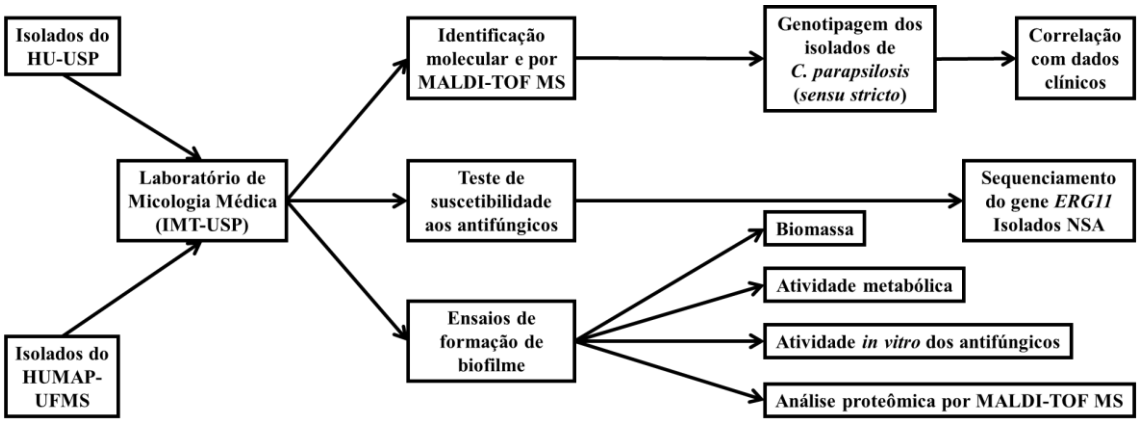


Figura 1 - Fluxograma de trabalho seguido durante o desenvolvimento deste estudo

3.1 Obtenção dos isolados do complexo *Candida parapsilosis*

Trinta e oito isolados do complexo *C. parapsilsosis* foram obtidos de sangue, ponta de cateter (PC), aspirado de medula óssea (AMO) e líquor, nos exames de rotina laboratorial de ambos os hospitais, entre 2008 e 2016. Apenas os isolados obtidos de PC cujas culturas apresentaram mais de 15 UFC/mL, foram incluídas no estudo, devido a sua provável relação com episódios de candidemia (Janum e Afshari, 2016). Antes do início deste estudo, alguns desses isolados estavam armazenados a -20 °C e/ou -80 °C nas coleções de culturas de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP) e do Laboratório de Micologia do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HUMAP-UFMS). Os demais isolados clínicos (11) foram obtidos no período de outubro de 2014 a março de 2016, tendo sido identificados como *C. parapsilosis* (*sensu lato*), em ambos os hospitais, pelo sistema automatizado

VITEK® 2 (bioMérieux, França), após a verificação da pureza das culturas em meio cromogênico seletivo CHROMagar *Candida*® (Becton Dickinson, EUA). Em seguida, os isolados foram encaminhados ao Laboratório de Micologia Médica (LIM-53) do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT-USP), para a realização das análises propostas neste estudo (Figura 1).

3.2 Identificação molecular das espécies do complexo *Candida parapsilosis*

Para a identificação molecular das espécies crípticas do complexo *C. parapsilosis*, os isolados foram submetidos às reações de RAPD e RFLP.

3.2.1 Extração do DNA genômico das leveduras

A extração das amostras de DNA foi realizada a partir da suspensão de leveduras contendo cerca de 10^6 células/mL, de acordo com a metodologia descrita por Van Burik *et al.* (1998) com algumas modificações. Um mililitro (1 mL) da suspensão foi submetido à centrifugação a 13.500 rpm (modelo 5804R, Eppendorf, Alemanha) por 10 minutos, e ao *pellet* de células foram adicionados 600 µL de uma solução contendo 50 mM de TRIS, 10 mM de EDTA, 250 U/mL de liticase (L-2524, Sigma, EUA) e 2% de β-mercaptoetanol (Merck, EUA). Os tubos foram mantidos a 37 ºC por 2 horas e 30 minutos para a digestão da parede celular. À suspensão de células foram adicionados 12 µL de *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS, Sigma) a 10% e 400 µg de proteinase K (Sigma), e os tubos foram mantidos a 65 ºC por 45 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes transferidos para tubos limpos. Para a precipitação do DNA, acrescentou-se isopropanol (Merck) v/v, e as amostras foram mantidas a -20 ºC *overnight*. No dia seguinte, o sobrenadante foi desprezado após centrifugação a 13.500 rpm por 20 minutos. Foram adicionados ao

pellet contendo o DNA, 500 µL de etanol a 70% (Merck) e os tubos foram novamente centrifugados a 13.500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos em banho seco a 70 ºC por 30 minutos para total evaporação do etanol residual. O material contendo o DNA foi eluído em cerca de 50–100 µL de TRIS-EDTA (50 mM-10 mM), e alíquotas dessas amostras foram coletadas para se determinar a concentração em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Fischer, EUA).

3.2.2 Preparo do *mix* de reagentes da *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Os *mix* de reagentes foram preparados em um volume final de 50 µL contendo: 1,25 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA); 1,5 mM de $MgCl_2$ (Invitrogen); 200 µM de dNTPs (GE Healthcare, Reino Unido) e 20 ng de DNA molde. As reações de amplificação foram realizadas no termociclador Veriti® (Applied Biosystems, EUA), e as concentrações dos *primers* (Invitrogen) variaram de acordo com a técnica utilizada.

3.2.3 Identificação das espécies crípticas por RAPD

As amostras de DNA foram submetidas às amplificações pela técnica de RAPD utilizando como *primer* o oligonucleotídeo RPO2 (5'–GCGATCCCCA–3') na concentração de 1 µM, nas condições de reação previamente descritas por Tavanti *et al.* (2005). Em todas as amplificações as cepas de referência *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. orthopsilosis* ATCC 96141 e *C. metapsilosis* ATCC 96143 foram incluídas. A detecção dos amplificados foi realizada em gel de agarose (Invitrogen) a 1,5%, por eletroforese horizontal a 80 V por uma hora. Para a revelação do perfil de bandas, os géis foram corados em solução de GelRed™ (Biotium, EUA) e registrados em sistema de foto-documentação (Uvitec, Reino Unido).

3.2.4 Identificação das espécies crípticas por RFLP

Para a técnica de RFLP, foi amplificada a região do gene que codifica a enzima *Secondary Alcohol Dehydrogenase* (SADH), usando os *primers* SADH-F e SADH-R, descritos por Tavanti *et al.* (2005), na concentração de 0,4 µM. Em todas as reações foram utilizadas as mesmas cepas de referência citadas no item 3.2.3. A detecção dos amplificados foi realizada e registrada conforme descrito para RAPD, utilizando gel de agarose a 2%. Os produtos da amplificação foram digeridos com a enzima *Ban*I (New England Biolabs, EUA) à 37 ºC por duas horas, e novamente submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% para a revelação dos fragmentos da digestão. O perfil de bandas obtido foi registrado em sistema de foto-documentação após coloração com GelRed™.

3.3 Identificação das espécies crípticas por MALDI-TOF MS

A identificação das espécies por MALDI-TOF MS foi realizada no espectrômetro Microflex™ (Bruker Daltonics, Alemanha). A extração proteica foi realizada a partir de uma suspensão de células de cada isolado do estudo, conforme descrito pelo fabricante do equipamento, com algumas modificações (Thomaz *et al.*, 2016). A suspensão foi preparada em 1 mL de água ultrapura contido em tubos estéreis de 1,5 mL a partir de uma alçada (10 µL) de células fúngicas, de cada isolado previamente cultivado em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) a 30 °C por 24 horas. Após centrifugação a 13.000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante foi desprezado e 300 µL de água ultrapura mais 900 µL de etanol absoluto (Merck) foram adicionados ao *pellet* de células. Após vigorosa homogeneização em vórtex, a suspensão foi novamente centrifugada e o sobrenadante desprezado. Em seguida o tubo com a tampa aberta foi submetido à centrifugação a vácuo por 30 minutos a 45 °C para a secagem total do *pellet*. O *pellet* seco foi

ressuspenso em 50 µL de ácido fórmico (Sigma) 70% e 50 µL de acetonitrila (Sigma). Após vigorosa homogeneização em vórtex, a suspensão foi centrifugada a 13.000 rpm por 2 minutos e 1,2 µL do sobrenadante contendo o extrato proteico foram depositados na placa metálica (Bruker Daltonics), em quadruplicata. Após a completa secagem à temperatura ambiente, foram adicionados 1,2 µL de solução da matriz [solução saturada de *α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid* (CHCA) em solvente orgânico (50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoroacético), Sigma] sobre cada analito. Depois de uma nova secagem à temperatura ambiente, a placa foi submetida à análise para a obtenção dos espectros de massas pelo *software* flexControl 3.4 (Bruker Daltonics). A calibração do equipamento foi realizada antes de cada experimento, utilizando o Bruker *Bacterial Test Standard* (Bruker Daltonics). Os espectros obtidos foram analisados com o *software* Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics), e os resultados expressos em valores de log-score (LS) entre 0 e 3,000. O LS a partir de 2,000 foi considerado aceitável para a identificação em nível de espécie, o LS entre 1,700 e 1,999 para a identificação em nível de gênero e o LS abaixo de 1,700 foi considerado como identificação não confiável.

3.4 Teste de suscetibilidade aos antifúngicos (TSA)

A determinação da CIM dos antifúngicos ANB (Sigma), FLC (Sigma), voriconazol (VRC, Sigma), ANF (Pfizer, EUA), CAF (Sigma) e MIF (Astellas, Japão), para todos os isolados, foi realizada segundo a metodologia de microdiluição em caldo preconizada pelo *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). A solução de estoque de todos os fármacos foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) e armazenada em criotubos estéreis em *ultrafreezer* por até seis meses.

O TSA foi realizado de acordo com o documento definitivo E.DEF 7.3.1 do EUCAST (Arendrup *et al.*, 2017). Cem microlitros da solução de cada concentração do antifúngico foram pipetados consecutivamente nos poços de cada coluna das placas. As placas foram fechadas, seladas com Parafilm M® ou papel alumínio (ANB e MIF são fotossensíveis) e armazenadas em *ultrafreezer* por até seis meses. Em cada placa foi realizado o controle de crescimento do fungo e o controle de esterilidade do meio. O inóculo fúngico foi preparado a partir de cultura prévia em ASD a 35 °C por 24 horas, em 3 mL de água ultrapura e ajustado para escala 0,5 McFarland no espectrofotômetro de tubo DensiCHEK™ Plus (bioMérieux). Posteriormente, a suspensão foi diluída 10 vezes com água ultrapura para obter concentração final de 1–5x10^5 UFC/mL. Em seguida 100 µL dessa suspensão foram adicionados aos poços das colunas 1 até a 11 nas placas contendo os fármacos, utilizando uma linha por amostra ou controle positivo. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas, e após esse período a densidade óptica (DO) foi mensurada em leitor de microplacas VERSAmax™ (Molecular Devices, EUA) no comprimento de onda de 530 nm. Todos os valores de DO das amostras, obtidos pelo *software* SOFTmax® PRO 3.1.2 (Molecular Devices), foram normalizados com os valores da DO dos controles negativos (meio de cultura sem antifúngico). A CIM da ANB foi considerada a concetração mais baixa que inibiu ≥ 90% o crescimento do inóculo em relação ao controle negativo, enquanto que para os azólicos (FLC e VRC) e equinocandinas (ANF, CAF e MIF), foi considerada a concetração mais baixa que inibiu ≥ 50%. A interpretação da CIM de cada antifúngico foi realizada de acordo com os valores de ponto de corte apresentados na Tabela 1 (EUCAST, 2018). Em todas as placas foram incluídas as cepas controles *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 e todos os ensaios foram repetidos em três experimentos independentes.

Tabela 1 - Valores de ponto de corte estabelecidos para interpretação dos testes de suscetibilidade aos antifúngicos para *Candida parapsilosis*

FÁRMACO	PONTO DE CORTE PARA INTERPRETAÇÃO DA CIM (mg/L)	
	Suscetível ≤	**Resistente >**
Anfotericina B	1	1
Anidulafungina	0,002	4
Caspofungina	Nota	Nota
Fluconazol	2	4
Micafungina	0,002	2
Voriconazol	0,12	0,25

FONTE: EUCAST *Antifungal Clinical Breakpoint Table* v. 9.0 (EUCAST, 2018).
NOTA: Isolados suscetíveis ou não suscetíveis (com suscetibilidade intermediária ou resistente) para anidulafungina e micafungina podem ser considerados na mesma categoria para caspofungina. A categoria intermediária é interpretada como os valores entre os pontos de corte para suscetível e resistente. Valores de ponto de corte para caspofungina ainda não foram estabelecidos devido à significativa variação inter-laboratorial observada.
CIM = Concentração Inibitória Mínima.

3.5 Ensaios de formação de biofilme

Todos os isolados obtidos foram submetidos ao ensaio de formação de biofilme, para quantificação da respectiva biomassa e atividade metabólica, enquanto que a atividade *in vitro* dos antifúngicos foi avaliada apenas contra os biofilmes de isolados que apresentaram alta formação. A cepa *C. albicans* SC5314 foi utilizada como controle de qualidade em todos os experimentos.

3.5.1 Condições de cultivo e preparo do inóculo fúngico

A propagação de células dos isolados foi adaptada do protocolo descrito por Pierce *et al.* (2008). Uma alçada (10 µL) de células fúngicas de cada isolado foi inoculada em 20 mL de *Yeast Extract-Peptone-Dextrose* (YPD, Difco, EUA) contidos em tubo falcon de 50 mL, e mantidos sob agitação orbital a 150 rpm na agitadora MaxQ 4000 (Thermo Fischer) a 30 °C por 12–16 horas. No dia seguinte, os tubos foram centrifugados a

4.830 rpm a 4 °C por 5 minutos e os sobrenadantes desprezados. Os *pellets* foram lavados duas vezes com 20 mL de PBS estéril sob vigorosa homogeneização em vórtex por 15 segundos, e nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições acima descritas. Em seguida, foi preparado uma suspensão de células em 3 mL do meio *Roswell Park Memorial Institute* 1640 com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio (Gibco, Holanda), suplementado com 2% de glicose (Sigma) (RPMI 2%G) e tamponado em pH 7,0 com 0,165 mol/L de ácido *3-(N-morpholino)propanesulfonic* (MOPS, Sigma). A concentração final do inóculo foi ajustada para 0,5 da escala de McFarland (1–5x10^6 UFC/mL) em espectrofotômetro de tubo DensiCHEK™ Plus.

3.5.2 Formação do biofilme

A formação do biofilme, também adaptada do protocolo de Pierce *et al.* (2008), foi executada em placas estéreis de microtitulação de 96 poços de fundo chato (TPP, Suíça). Após adição de 100 µL do inóculo padronizado de cada amostra em diferentes poços, a placa foi fechada com a própria tampa, selada com Parafilm M® e incubada a 37 °C por 24 horas. No dia seguinte, 50 µL do sobrenadante foram aspirados cuidadosamente para não destacar o biofilme formado. Usando uma pipeta multicanal, os biofilmes foram lavados duas vezes com 200 µL de *Phosphate Buffered Saline* (PBS) estéril para remover as células planctônicas ou não aderentes que permaneceram nos poços. Após cada lavagem, a placa foi drenada em posição invertida, com papel absorvente para remover o PBS residual.

3.5.3 Quantificação da biomassa do biofilme

A quantificação da biomassa do biofilme formado por cada isolado foi realizada pela coloração com cristal violeta, conforme descrito por Melo *et al.* (2011). Cem

microlitros (100 µL) do inóculo padronizado de cada amostra foram pipetados em cinco poços (quintuplicata) de uma linha, e 100 µL de PBS e RPMI 2%G foram pipetados nas colunas 6 e 7, respectivamente, para controle de esterilidade. Após a formação, lavagem e secagem do biofilme, o mesmo foi corado com 110 µL da solução aquosa de cristal violeta (Merck) a 0,4% por 45 minutos. Em seguida cada poço foi lavado três vezes com 200 µL de água ultrapura. Na última lavagem, o sobrenadante foi desprezado vertendo a placa e mantendo-a invertida sobre papel absorvente por 10 minutos para absorção do corante residual. O biofilme foi descorado com 200 µL de etanol absoluto por 45 minutos, e 100 µL do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa estéril de microtitulação de 96 poços de fundo chato. A DO da solução foi mensurada em leitor de microplacas VERSAmax™ no comprimento de onda de 595 nm. Todos os valores de DO das amostras, obtidos pelo *software* SOFTmax® PRO, foram normalizados com os valores da DO de seus respectivos brancos. Os isolados foram classificados conforme se segue: baixa formação de biofilme (BFB, DO < 0,44), moderada formação de biofilme (MFB, DO = 0,44–1,17) e alta formação de biofilme (AFB, DO > 1,17), de acordo com os valores de *cut-off* propostos por Marcos-Zambrano, Escribano, Bouza, *et al.* (2014). Os ensaios foram repetidos em três experimentos independentes, e a média aritmética das médias dos valores de DO obtidos em cada experimento, foi considerada como resultado final.

3.5.4 Quantificação da atividade metabólica do biofilme

A quantificação da atividade metabólica do biofilme formado por cada isolado foi realizada pela redução do sal de tetrazólio XTT, segundo protocolo de Pierce *et al.* (2008). Cem microlitros (100 µL) do inóculo padronizado de cada amostra foram

pipetados em cinco poços (quintuplicata) de uma linha, e 100 µL de PBS e RPMI 2%G foram pipetados nas colunas 6 e 7, respectivamente, para controle de esterilidade. Após a formação, lavagem e secagem do biofilme, foram adicionados em cada poço 100 µL da solução XTT/menadiona (1 µL de menadiona 10 mM em 10 mL de XTT 0,5g/L), preparada no momento do uso. A placa foi coberta com papel alumínio e incubada a 37 °C por 2 horas. Em seguida, 80 µL do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa estéril de 96 poços de fundo chato, inclusive do controle negativo (coluna 12) para subtração do *background*. A DO da solução foi mensurada em leitor de microplacas VERSAmax™ no comprimento de onda de 490 nm. Todos os valores de DO das amostras, obtidos pelo *software* SOFTmax® PRO, foram normalizados com os valores da DO de seus respectivos brancos. Os isolados foram classificados conforme se segue: baixa atividade metabólica (BAM, DO < 0,097), moderada atividade metabólica (MAM, DO = 0,097–0,2) e alta atividade metabólica (AAM, DO > 0,2), de acordo com os valores de *cut-off* propostos por Marcos-Zambrano, Escribano, Bouza, *et al.* (2014). Os ensaios foram repetidos em três experimentos independentes, e a média aritmética das médias dos valores de DO obtidos em cada experimento foi considerada como resultado final.

3.5.5 Atividade *in vitro* dos antifúngicos contra os biofilmes

Como já descrito na literatura, os antifúngicos azólicos apresentam pouca ou nenhuma atividade contra os biofilmes de *Candida* spp., mesmo em concentrações elevadas (Iñigo *et al.*, 2012). Deste modo, foi avaliada apenas a atividade *in vitro* da ANB e das três equinocandinas contra os biofilmes dos isolados de *C. parapsilosis* que apresentaram alta formação.

A *Sessile Minimal Inhibitory Concentration* (SMIC), para cada isolado, foi calculada a partir da determinação da atividade metabólica, pelo ensaio de redução de XTT, após o tratamento antifúngico (Pierce *et al.*, 2008). $SMIC_{50}$ e $SMIC_{80}$ foram definidas como a concentração antifúngica na qual a diminuição de 50% ou 80% na DO, respectivamente, foi detectada em comparação com o biofilme não tratado, do mesmo isolado.

Cem microlitros (100 µL) do inóculo de cada amostra, preparado em meio RPMI 2%G ($1x10^6$ UFC/mL), foram pipetados em duplicata, da coluna 1 até a coluna 11 da placa de microtitulação de 96 poços, exceto nos poços da coluna 12, utilizados como controles negativos e para subtração do *background*. Foram adicionados em cada poço, contendo o biofilme lavado e seco, 100 µL de cada solução de antifúngico, em diferentes concentrações (16 – 0,03 mg/L), preparadas no momento do uso. Essas soluções foram adicionadas ao biofilme em ordem decrescente de concentração, da coluna 1 até a coluna 10 da placa. Na coluna 11, foi adicionado apenas o meio RPMI 2%G, sem antifúngico, para o controle positivo. A placa foi fechada com a própria tampa, selada com Parafilm M® e incubada a 37 °C por 24 horas. No dia seguinte, todo o sobrenadante foi aspirado cuidadosamente sem tocar o fundo do poço, para não destacar o biofilme formado. Usando uma pipeta multicanal, os biofilmes foram novamente lavados duas vezes com 200 µL de PBS estéril. Após cada lavagem, a placa foi drenada em posição invertida, com papel absorvente, para remover qualquer PBS residual. Em seguida, a quantificação da atividade metabólica do biofilme, tratado ou não tratado com antifúngico, foi realizada pelo ensaio de redução de XTT, conforme descrito anteriormente no item 3.5.4. Os TSA das células sésseis foram repetidos em três experimentos independentes.

3.6 Análise proteômica de células planctônicas e sésseis por MALDI-TOF MS

Os perfis proteômicos das células planctônicas e sésseis dos isolados de *C. parapsilosis* com alta formação de biofilme, e da cepa *C. albicans* SC5314, foram comparados em duas plataformas de MALDI-TOF MS: VITEK-MS™ (bioMérieux) e Microflex™ (Bruker Daltonics). Os ensaios foram repetidos em três experimentos independentes para a obtenção de espectros de massas suficientes para a criação dos superespectros.

3.6.1 Condições de cultivo das células planctônicas

Os isolados foram cultivados em ágar RPMI 2%G tamponado em pH 7,0 com 0,165 mol/L de MOPS e incubadas a 37 °C por 24 horas. Em seguida, a partir de uma alçada (10 µL) de células fúngicas, uma suspensão foi preparada em tubo estéril de 1,5 mL contendo 1 mL de PBS estéril, para posterior extração proteica.

3.6.2 Condições de cultivo das células sésseis

Inicialmente, os isolados foram cultivados em YPD, conforme descrito no item 3.5.1. Após a propagação celular, o *pellet* foi lavado com PBS estéril, e uma suspensão de células foi preparada em 5 mL de RPMI 2%G tamponado em pH 7,0 com 0,165 mol/L de MOPS. A concentração final do inóculo foi ajustada para 0,5 da escala de McFarland (1–5x10^6 UFC/mL) em espectrofotômetro de tubo DensiCHEK™ Plus.

A formação do biofilme foi executada em placas estéreis de microtitulação de 24 poços de fundo chato (TPP). Após a adição de 1 mL do inóculo padronizado, de cada amostra, em cinco poços de uma linha, a placa foi fechada com a própria tampa, selada com Parafilm M® e incubada a 37 °C por 24 horas. Para controle de esterilidade do RPMI 2%G, 1 mL do meio foi adicionado aos poços da coluna 6. No dia seguinte, todo

o sobrenadante foi aspirado cuidadosamente, sem tocar o fundo do poço, para não destacar o biofilme formado. Os cinco poços, contendo o biofilme de uma amostra, foram lavados seriadamente com 1 mL de PBS estéril, por duas vezes. Em seguida, o biofilme dos cinco poços foram ressuspensos seriadamente com 1 mL de PBS estéril, e transferido para um tubo estéril de 1,5 mL, para posterior extração proteica.

3.6.3 Extração proteica das células planctônicas e sésseis

As suspensões de células planctônicas e sésseis foram centrifugadas a 13.000 rpm por 2 minutos, e o sobrenadante desprezado. Em seguida, os *pellets* foram ressuspensos em 300 µL de água ultrapura, e submetidos à extração proteica com etanol e ácido fórmico, conforme descrito no item 3.3.

3.6.4 Obtenção dos espectros de massas e criação dos superespectros

Após o processo de extração, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 2 minutos, e 1,2 µL dos sobrenadantes foram depositados em replicata de oito poços, no *slide* (VITEK-MS™) e na placa metálica (Microflex™). Após a completa secagem à temperatura ambiente, foram adicionados 1,2 µL de solução da matriz CHCA sobre cada analito. Depois de uma nova secagem à temperatura ambiente, o *slide* e a placa foram introduzidos nos respectivos espectrômetros de massas, para a obtenção dos espectros no modo automático de aquisição, com as configurações do fabricante.

3.6.4.1 Plataforma VITEK-MS™

Os espectros de massas foram obtidos pelo *software* Launchpad 2.8 (bioMérieux) do sistema VITEK® MS *Research Use Only* (RUO), e importados para o *software* SARAMIS Premium (bioMérieux), para análise. Os espectros que apresentaram 120–

250 picos, e pelo menos 70% de similaridade, foram selecionados, de acordo com os critérios utilizados por De Almeida *et al.* (2017). Em seguida, foram selecionados os 40 picos com maiores intensidades e massas relativas (m/z), para a criação dos superespectros (*super-spectra*) das células planctônicas e sésseis de cada isolado. Os dendrogramas e as matrizes de *Composite Correlation Index* (CCI) dos superespectros, foram gerados pelo *software* SARAMIS, com as configurações do fabricante.

3.6.4.2 Plataforma Microflex™

Os espectros de massas foram obtidos pelo *software* flexControl 3.4 (Bruker Daltonics), e importados para os *softwares* Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics) e flexAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics). No Biotyper, os espectros de baixa qualidade, com picos discrepantes ou de baixa intensidade, foram excluídos. Em seguida, os superespectros (*Main Spectra*, MSP) das células planctônicas e sésseis, de cada isolado, foram criados a partir dos espectros inteiros (todos os picos). Depois, o dendrograma e a matriz de CCI foram gerados pelo *software* Biotyper, com as configurações do fabricante. No flexAnalysis, os espectros de *C. parapsilosis* e *C. albicans* SC5314 com melhor qualidade, foram selecionados para a análise dos picos específicos das células sésseis.

3.7 Sequenciamento do gene *ERG11* dos isolados não suscetíveis aos azólicos

Todo o *Open Reading Frame* (ORF), do gene *ERG11* dos isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) não suscetíveis aos azólicos (NSA), foi sequenciado utilizando quatro *primers* específicos previamente descritos por Souza *et al.* (2015), e listados na Tabela 2, para verificar a presença de mutações relacionadas à suscetibilidade diminuída aos azólicos.

3.7.1 Amplificação do gene *ERG11*

O gene *ERG11* foi amplificado por PCR, em volume de 50 µL contendo: 1,25 U de Taq DNA polimerase; 1,5 mM de $MgCl_2$; 200 µM de dNTPs, 0,4 µM dos *primers* ERG11_F1 e ERG11_F2 (Tabela 2), e 80 ng de DNA molde. As reações de amplificação foram realizadas no termociclador Veriti®, nas seguintes condições: denaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 48 °C e 1 minuto a 72 °C; e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram purificados utilizando illustra™ ExoProStar™ 1-Step (GE Healthcare), e posteriormente armazenados a -20 ºC até o momento do sequenciamento.

3.7.2 Sequenciamento do gene *ERG11*

O sequenciamento de DNA dos produtos purificados foi realizado pelo método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977), com todos os *primers* da Tabela 2, para que a região correspondente a ORF do gene *ERG11* fosse sequenciada por completo. As reações foram realizadas, como prestação de serviços, no Núcleo Multiusuário Sequenciamento de DNA - Grupo 3, localizado no Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical (LIM-07) da Faculdade de Medicina da USP, que dispõe do sequenciador ABI PRISM® 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). As sequências do *ERG11* foram analisadas no BioEdit v.7.2.3 (Hall, 1999), e comparadas com a sequência correspondente de *C. parapsilosis* ATCC 22019 (GenBank GQ302972).

Tabela 2 - *Primers* empregados no sequenciamento do gene *ERG11* dos isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) não suscetíveis aos azólicos

OLIGONUCLEOTÍDEOS	SEQUÊNCIA (5′ → 3′)
ERG11_CP_F1	CGAGATAATCATCAACGAACATTC
ERG11_CP_R1	CGTTTAAAACATCCAAAGACCTTA
ERG11_CP_F2	AATCTGAGGGTTTCCTTGATGGT
ERG11_CP_R2	AAAGACCGCATTGACTACCGAT

FONTE: Souza AC *et al.*, 2015.
NOTA: F1 e F2 correspondem aos *primers forward*, e R1 e R2 aos *primers reverse*.

3.8 Genotipagem dos isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*)

A tipagem molecular dos isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) NSA foi realizada por duas metodologias: separação dos fragmentos do DNA genômico por eletroforese em campo pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis* – PFGE), após digestão com uma endonuclease, e análise de microssatélites de regiões não codificantes do genoma de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*).

3.8.1 PFGE do DNA genômico dos isolados de *C. parapsilosis* NSA

A análise por PFGE do DNA genômico, após digestão enzimática, foi adaptada do protocolo descrito por Chen *et al.* (2005).

3.8.1.1 Extração do DNA cromossômico

Os isolados foram cultivados em ASD a 37 °C por 48 horas. Uma alçada de colônias foi suspensa em 1 mL de água ultrapura, e a suspensão foi submetida à agitação em vórtex; em seguida, a suspensão foi centrifugada a 13000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e mais uma lavagem com água foi realizada. Os tubos de 1,5 mL, previamente pesados vazios, e agora contendo o *pellet* de células, foram novamente pesados. Em seguida foi adicionado o volume exato de EDTA 50 mM pH 8,0 para se obter a concentração final de 1 mg de células/µL em cada tubo.

Cinquenta microlitros dessa suspensão foram adicionados a 150 µL de EDTA 50 mM pH 8,0 em outro tubo de 1,5 mL, e submetidos à agitação em vórtex. Foram adicionados 40 µL (50 UI) da solução de liticase (L-2524, Sigma) 1,25 U/µL em cada tubo, com vagarosa homogeneização. Em seguida, 240 µL de agarose de baixo ponto de fusão (Bio-Rad, EUA) a 2% em EDTA 125 mM pH 7,5 a 50 °C, foram adicionados e homogeneizados com pipeta. De imediato, a solução foi cuidadosamente dispensada, em moldes de acrílico (Bio-Rad), para a formação dos pequenos blocos de gel de agarose. Os moldes preenchidos foram incubados em câmara úmida a 4 °C por 15 minutos, para solidificação da agarose, e em seguida, a 37 °C por duas horas. Os blocos foram gentilmente removidos dos moldes e imersos em proteinase K (Invitrogen) na concentração de 1 mg/mL em solução tampão (TRIS 1 M, pH = 7,5; EDTA 0,5 M, pH = 8,0; lauroilsarcosina 10%), e incubados a 56 °C por 8–16 horas. Em seguida, a solução foi aspirada cuidadosamente e os blocos foram lavados três vezes com 2 mL de detergente anfipático CHEF TE (TRIS 1 M, pH = 7,0, TRIS 1 M pH = 8,0, EDTA 0,5 M, pH = 7,0 e EDTA 0,5 M pH = 8,0), em temperatura ambiente, mantendo a solução em contato com o bloco por uma hora em cada lavagem, para a retirado de restos celulares. Após a última lavagem, o tampão CHEF TE foi trocado e os blocos armazenados a 4 °C.

3.8.1.2 Digestão enzimática do DNA cromossômico

Um bloco de cada amostra foi transferido para um tubo de 2 mL, e lavados três vezes com 1,5 mL do tampão *Dummy No Salt* [DNS (TRIS 100 mM, pH = 8,0; $MgCl_2$ 5 mM)], em temperatura ambiente, mantendo a solução em contato com o bloco por uma hora, em cada lavagem. Em seguida, o tampão DNS foi substituído por 200 µL da

solução de digestão contendo 20 UI da enzima *Sfi*I (Thermo Fischer), incubando-se a 50 °C por 14–16 horas. No dia seguinte, a solução de digestão foi aspirada, e os blocos lavados com 1,5 mL da solução de TE de baixa molaridade (TRIS 0,01 M, pH = 7,5; EDTA 0,001 M, pH = 7,5), por duas horas.

3.8.1.3 Eletroforese em campo pulsado do DNA cromossômico

A corrida eletroforética foi realizada no sistema CHEF-DR III (Bio-Rad), empregando-se para cada corrida o marcador de peso molecular *Lambda Ladder PFG Marker* (New England Biolabs). Os blocos de gel de agarose, contendo o DNA cromossômico digerido foram colocados no suporte utilizado para montar o gel de agarose da corrida. Em seguida, foram adicionados 100 mL de agarose 1% a 45–50 °C, e após a solidificação da agarose, o gel foi levado ao equipamento. A corrida foi realizada em bloco único, com o tempo da variação da corrente (*switch time*) inicial de 10 segundos, e o final de 90 segundos, voltagem de 6,0 V/cm, a 14 °C por 23 horas. Após o término da corrida, o gel foi corado em solução de GelRed™ por 30 minutos, e registrado no sistema de foto-documentação.

3.8.1.4 Análise do padrão de bandas

A similaridade genética foi avaliada com base na presença ou ausência de bandas, nos perfis obtidos para cada isolado, e a análise do dendrograma foi realizada pelo *software* BioNumerics 7.5 (Applied Maths, Bélgica), com a tolerância de posição fixada em 1% e a otimização em 3%. O coeficiente de Dice foi utilizado para analisar a similaridade entre os perfis de bandas, e a análise dos *clusters* foi realizada pelo método *Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages* (UPGMA) (Chen *et al.*, 2005).

3.8.2 Análise de microssatélites do genoma de *C. parapsilosis*

Para investigar possíveis evidências de alterações microevolutivas, tanto os isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) NSA, quanto os suscetíveis aos azólicos (SA) foram incluídos na análise. A genotipagem foi realizada por meio da amplificação de oito *loci* gênicos (Tabela 3).

As amplificações por PCR foram realizadas no termociclador Veriti® em um volume de reação de 50 µL contendo: 20 ng do DNA molde; 0,2 µM de cada *primer*; 200 µM dNTPs, 1,25 U de Taq DNA polimerase e 1,5 mM de $MgCl_2$, com a seguinte ciclagem para todos os oito pares de *primers*: denaturação inicial a 95 °C por 10 minutos, seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 57 °C e 45 segundos a 72 °C; e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,5% por uma hora a 80 V, e registrados em sistema de foto-documentação após coloração com GelRed™. A similaridade dos perfis alélicos foi avaliada pelo coeficiente de Dice, e os *clusters* analisados por UPGMA, no *software* BioNumerics.

Tabela 3 - *Primers* empregados na análise de microssatélites do genoma dos isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*)

LOCUS	SEQUÊNCIA DO *PRIMER*
LOCUS A	5′-AGCGCTGCAATCTAAACAGA-3′ 5′-TTGCATCTGCAGAGAGCGTA-3′
LOCUS B	5′-AGGTTTGTAGTAGTGTCCCTATGG-3′ 5′-TATCTCTCTCGCCATTTGAACG-3′
LOCUS C	5′-AGCTTGAGCCTATGTCAATGCCTA-3′ 5′-TACAGCCTCGTCCCCCTCAC-3′
LOCUS D	5′-GTGAGTGCTAAGTCTTGGCTAGTTG-3′ 5′-TCTCACAGTACACACCAGTCAGTAC-3′
LOCUS G	5′-TGCACCCGATTGCTGAAATGGTT-3′ 5′-CGATTTTCCATGGAGCTCGCCAT-3′
CP1	5′-AAAGTGCTACACACGCATCG-3′ 5′-GGCTTGCAATTTCATTTCCT-3′
CP4	5′-CAAATCATCCAGCTTCAAACC-3′ 5′-CATCAAACAAGAATTCGATATCAC-3′
CP6	5′-CAGGAACAGGACAATGGTGA-3′ 5′-TCTGGAGCCTCTAGGACGTTT-3′

FONTE: PULCRANO G *et al.*, 2012.

3.9 Investigação de um surto envolvendo isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) resistentes aos azólicos e correlação com os dados clínicos

A investigação de um possível surto foi realizada no hospital com o maior número de isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) NSA, para identificar características dos pacientes que poderiam estar associadas à infecção/colonização pelo genótipo resistente. Dados epidemiológicos e clínicos, incluindo demográficos, doenças subjacentes, comorbidades, procedimentos invasivos, histórico de uso de antibióticos e antifúngicos, foram coletados dos prontuários dos pacientes infectados/colonizados por isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) suscetíveis ou não aos azólicos, por meio de um formulário específico para o presente estudo (Anexo A). Posteriormente, os dados foram inseridos em planilha do Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, EUA) para análise.

3.10 Ética

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo parecer de número 1.912.028 (Anexo B).

3.11 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no *software* SPSS 18.0 (IBM, EUA), e os valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. A análise univariada foi realizada para avaliar possíveis fatores de risco para colonização/infecção por *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) NSA, em relação a *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) SA. As comparações entre os grupos foram realizadas pelos testes qui-quadrado ou exato de Fisher, quando apropriado, para as variáveis categóricas. A comparação das variáveis não paramétricas contínuas foi realizada pelo teste U de Mann-Whitney.

4 RESULTADOS

4.1 Isolados do complexo *Candida parapsilosis* obtidos

Trinta e oito isolados clínicos do complexo *C. parapsilosis* foram avaliados neste estudo. Desses, 21 eram provenientes do HU-USP (20 de sangue e 1 de líquor), obtidos no período 2008-2015. Os 17 restantes foram recuperados no HUMAP-UFMS (12 de sangue, 4 de PC e 1 de AMO), entre 2012 e 2016.

4.2 Identificação das espécies do complexo *Candida parapsilosis*

A identificação das espécies crípticas de *C. parapsilosis* está apresentada nas Tabelas 4 e 5. Entre os isolados provenientes do HU-USP, 18 (85,7%) foram identificados como *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) e três (14,3%) como *C. orthopsilosis*; entre os isolados provenientes do HUMAP-UFMS, 14 (82,3%) foram identificados como *C. parapsilosis* (*sensu stricto*), dois (11,8%) como *C. orthopsilosis* e um (5,9%) *C. metapsilosis*. Na distribuição global, 32 (84,2%) foram *C. parapsilosis* (*sensu stricto*), cinco (13,2%) *C. orthopsilosis* e um (2,6%) *C. metapsilosis*, sendo as duas últimas espécies obtidas exclusivamente de hemoculturas. Os três métodos utilizados (RAPD, RFLP e MALDI-TOF MS) apresentaram 100% de concordância na identificação das espécies dos 38 isolados.

4.3 Suscetibilidade aos antifúngicos das células planctônicas

De acordo com os valores de ponto de corte descritos na Tabela 1 (EUCAST, 2018), um isolado (4,8%) obtido no HU-USP apresentou resistência ao FLC, e outro (4,8%) suscetibilidade intermediária. Os 19 (90,4%) restantes foram suscetíveis ao FLC

e VRC. Entre os isolados provenientes do HUMAP-UFMS, 8 (47%) apresentaram resistência cruzada para FLC e VRC, 2 (11,8%) apresentaram suscetibilidade intermediária ao FLC, e 7 (41,2%) foram suscetíveis ao FLC e VRC. Todos os 38 isolados foram suscetíveis à ANB, e apresentaram suscetibilidade intermediária as equinocandinas. Os resultados do TSA estão demonstrados nas Tabelas 4 e 5.

4.4 Quantificação da biomassa e da atividade metabólica dos biofilmes

Os 38 isolados foram submetidos aos ensaios de formação de biofilme. De acordo com os valores de *cut-off* propostos por Marcos-Zambrano, Escribano, Bouza, *et al.* (2014), 3 isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) apresentaram alta formação de biofilme (biomassa), e 4 isolados (3 *C. parapsilosis* e 1 *C. orthopsilosis*) apresentaram alta atividade metabólica. Todos os isolados *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) NSA apresentaram baixa formação de biofilme e baixa atividade metabólica, exceto um isolado resistente (69155) do HU-USP, que apresentou alta formação de biofilme com alta atividade metabólica, conforme demonstrado na Figura 2.

Tabela 4 - Identificação das espécies do complexo *Candida parapsilosis* e resultados dos testes de suscetibilidade aos antifúngicos dos isolados obtidos no HU-USP - 2008 a 2015

ISOLADO	MATERIAL	ESPÉCIE	CIM (mg/L)					
			ANB	FLC	VRC	ANF	CAF	MIF
6557	Sangue	*C. orthopsilosis*	0,12	1,0	0,03	0,25	0,25	0,25
36688	Sangue	*C. orthopsilosis*	0,12	2,0	0,06	0,25	1,0	0,25
989	Sangue	*C. orthopsilosis*	0,12	1,0	0,03	0,5	0,25	0,25
233	Sangue	*C. parapsilosis*	1,0	**4,0**	0,06	2,0	1,0	1,0
577	Sangue	*C. parapsilosis*	0,25	1,0	0,03	2,0	1,0	1,0
1035	Sangue	*C. parapsilosis*	1,0	2,0	0,06	0,5	0,5	0,5
42542	Sangue	*C. parapsilosis*	0,12	0,5	0,06	1,0	1,0	1,0
46615	Sangue	*C. parapsilosis*	0,12	2,0	0,06	0,25	1,0	1,0
51228	Líquor	*C. parapsilosis*	0,5	1,0	0,06	0,5	1,0	1,0
69155	Sangue	*C. parapsilosis*	0,25	**8,0**	0,06	0,5	1,0	1,0
88130	Sangue	*C. parapsilosis*	0,25	2,0	0,06	0,5	0,5	0,5
88404	Sangue	*C. parapsilosis*	0,25	2,0	0,03	0,5	0,5	0,5
96688	Sangue	*C. parapsilosis*	0,25	1,0	0,03	2,0	1,0	1,0
97925	Sangue	*C. parapsilosis*	0,5	1,0	0,03	1,0	1,0	1,0
695	Sangue	*C. parapsilosis*	0,5	1,0	0,016	1,0	1,0	1,0
1069	Sangue	*C. parapsilosis*	0,5	2,0	0,03	1,0	1,0	1,0
346777	Sangue	*C. parapsilosis*	0,25	2,0	0,03	1,0	0,5	1,0
376	Sangue	*C. parapsilosis*	0,5	1,0	0,03	1,0	1,0	1,0
570	Sangue	*C. parapsilosis*	0,5	0,5	0,03	0,5	1,0	0,5
15/97	Sangue	*C. parapsilosis*	0,25	0,5	0,016	0,5	1,0	0,5
15/362	Sangue	*C. parapsilosis*	0,5	0,25	0,016	2,0	1,0	1,0

NOTA: Os números em negrito correspondem aos valores das concentrações inibitórias mínimas do fluconazol para os isolados não suscetíveis a esse antifúngico.
ANB = Anfotericina B; ANF = Anidulafungina; CAF = Caspofungina; CIM = Concentração Inibitória Mínima; FLC = Fluconazol; MIF = Micafungina; VRC = Voriconazol.

Tabela 5 - Identificação das espécies do complexo *Candida parapsilosis* e resultados dos testes de suscetibilidade aos antifúngicos dos isolados obtidos no HUMAP-UFMS - 2012 a 2016

ISOLADO	MATERIAL	ESPÉCIE	CIM (mg/L)					
			ANB	FLC	VRC	ANF	CAF	MIF
119 H	Sangue	*C. metapsilosis*	0,25	2,0	0,03	0,25	0,5	0,25
65 H	Sangue	*C. orthopsilosis*	0,5	0,5	0,03	0,25	0,25	0,25
191 H	Sangue	*C. orthopsilosis*	0,5	0,5	0,016	0,5	0,25	0,25
16 PC	PC	*C. parapsilosis*	1,0	**64**	**1,0**	2,0	1,0	1,0
58 H	Sangue	*C. parapsilosis*	0,5	**32**	**0,5**	1,0	1,0	1,0
87 H	Sangue	*C. parapsilosis*	0,5	**64**	**2,0**	2,0	1,0	1,0
88 H	Sangue	*C. parapsilosis*	1,0	**64**	**1,0**	2,0	1,0	1,0
137 H	Sangue	*C. parapsilosis*	0,5	**64**	**1,0**	2,0	1,0	1,0
542 AMO	AMO	*C. parapsilosis*	1,0	**64**	**1,0**	2,0	1,0	1,0
340 PC	PC	*C. parapsilosis*	1,0	**64**	**1,0**	2,0	2,0	1,0
422 PC	PC	*C. parapsilosis*	1,0	**4,0**	0,06	2,0	1,0	1,0
29 H	Sangue	*C. parapsilosis*	0,5	**4,0**	0,12	2,0	1,0	1,0
188 H	Sangue	*C. parapsilosis*	0,5	1,0	0,03	1,0	1,0	1,0
199 H	Sangue	*C. parapsilosis*	0,25	1,0	0,03	2,0	1,0	1,0
559 H	Sangue	*C. parapsilosis*	0,5	2,0	0,06	1,0	1,0	0,5
1131 PC	PC	*C. parapsilosis*	0,5	**32**	**0,5**	2,0	1,0	1,0
662 H-II	Sangue	*C. parapsilosis*	0,06	0,5	0,008	0,5	0,5	0,5

NOTA: Os números em negrito correspondem aos valores das concentrações inibitórias mínimas dos azólicos testados (fluconazol e voriconazol) para os isolados não suscetíveis a esses antifúngicos.
AMO = Aspirado de Medula Óssea; ANB = Anfotericina B; ANF = Anidulafungina; CAF = Caspofungina; CIM = Concentração Inibitória Mínima; FLC = Fluconazol; MIF = Micafungina; PC = Ponta de Cateter; VRC = Voriconazol.

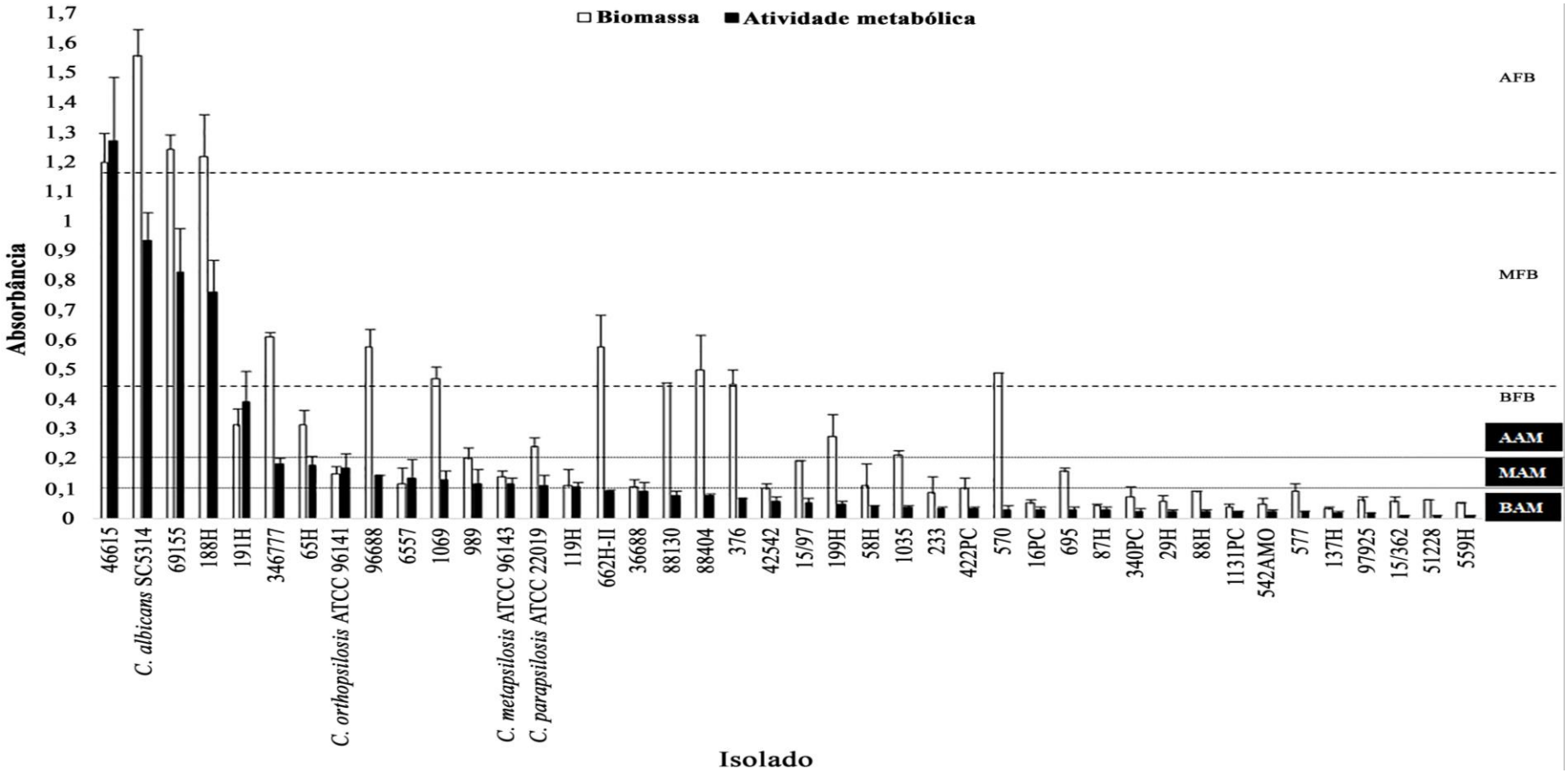


Figura 2 - Comparação da biomassa e atividade metabólica dos biofilmes formados por cepas de referência e isolados clínicos do complexo *Candida parapsilosis*
Linhas tracejadas (classificação da produção de biomassa): baixa formação de biofilme (BFB), moderada formação de biofilme (MFB) e alta formação de biofilme (AFB). Linhas pontilhadas (classificação da atividade metabólica): baixa atividade metabólica (BAM), moderada atividade metabólica (MAM) e alta atividade metabólica (AAM). *Candida albicans* SC5314 foi utilizada como controle de qualidade dos experimentos, e as barras de erro representam o desvio padrão.

4.5 Atividade *in vitro* dos antifúngicos contra os biofilmes

A atividade da ANB e de três equinocandinas (ANF, CAF e MIF) foi avaliada contra os biofilmes de três isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) que apresentaram alta formação de biofilme com alta atividade metabólica (46615, 69155 e 188 H). Apenas a ANB apresentou atividade contra as células sésseis dos isolados analisados (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultados dos testes de suscetibilidade aos antifúngicos das células sésseis dos isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) com alta formação de biofilme e da cepa *Candida albicans* SC5314

ISOLADO	ANB (mg/L)		ANF (mg/L)		CAF (mg/L)		MIF (mg/L)	
	$SMIC_{50}$	$SMIC_{80}$	$SMIC_{50}$	$SMIC_{80}$	$SMIC_{50}$	$SMIC_{80}$	$SMIC_{50}$	$SMIC_{80}$
46615	0,25	0,5	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16
69155	0,25	0,5	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16
188 H	0,25	0,5	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16
SC5314	0,5	1	0,03	0,25	0,03	0,06	0,03	0,25

NOTA: SMIC50, SMIC80 = *Sessile Minimum Inhibitory Concentrations* (SMICs) correspondentes à redução de 50% e 80%, respectivamente, na atividade metabólica do biofilme tratado com antifúngico, em relação ao biofilme não tratado do mesmo isolado. ANB = Anfotericina B; ANF = Anidulafungina; CAF = Caspofungina; MIF = Micafungina.

4.6 Análise proteômica de células planctônicas e sésseis por MALDI-TOF MS

Os perfis proteômicos dos superespectros (*super-spectra* e MSP) das células planctônicas e sésseis, dos três isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) que apresentaram alta formação de biofilme com alta atividade metabólica (46615, 69155 e 188 H) e da cepa *C. albicans* SC5314, apresentaram diferenças em ambas plataformas utilizadas (VITEK-MS™ e Microflex™). O nível das diferenças está demonstrado nos dendrogramas (Figuras 2, 4 e 6) e matrizes de CCI (Figuras 3, 5 e 7) a seguir.

Os superespectros das células planctônicas e sésseis de cada isolado foram construídos, nas duas plataformas, a partir de pelo menos oito espectros que se enquadraram dentro dos critérios de qualidade estabelecidos nos itens 3.6.4.1 e 3.6.4.2.

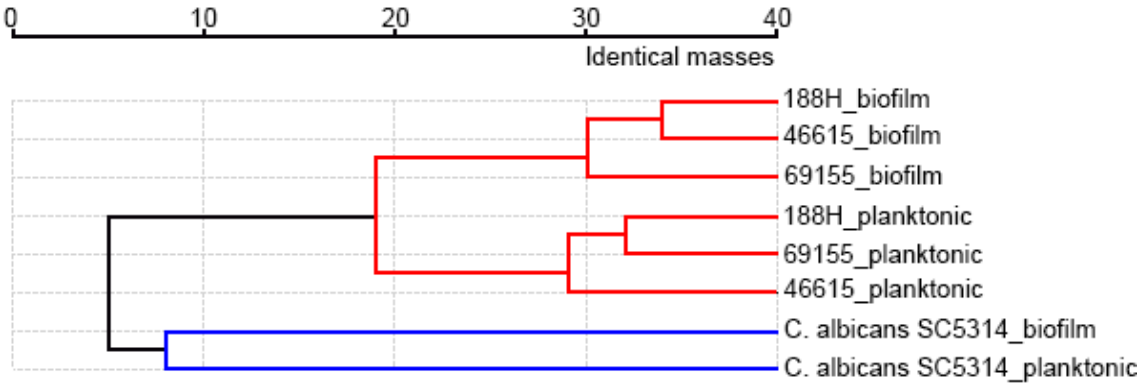
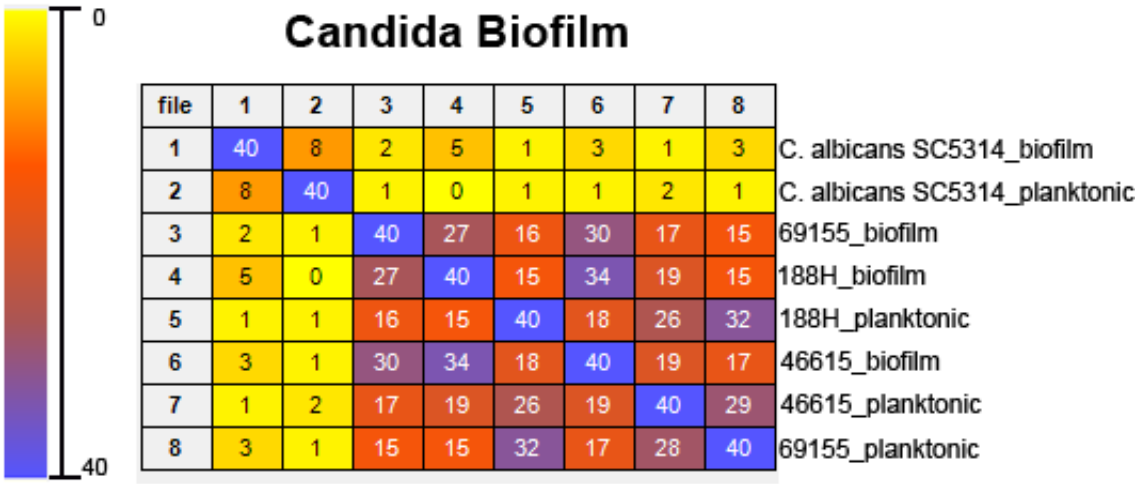


Figura 3 - Dendrograma gerado no VITEK-MS™ a partir dos *super-spectra* das células planctônicas (*planktonic*) e sésseis (*biofilm*) dos isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) com alta formação de biofilme e da cepa *Candida albicans* SC5314 (taxonomia absoluta)

As distâncias no eixo x indicam a quantidade de massas idênticas entre os 40 picos analisados dos superespectros.



file	1	2	3	4	5	6	7	8	
1	40	8	2	5	1	3	1	3	C. albicans SC5314_biofilm
2	8	40	1	0	1	1	2	1	C. albicans SC5314_planktonic
3	2	1	40	27	16	30	17	15	69155_biofilm
4	5	0	27	40	15	34	19	15	188H_biofilm
5	1	1	16	15	40	18	26	32	188H_planktonic
6	3	1	30	34	18	40	19	17	46615_biofilm
7	1	2	17	19	26	19	40	29	46615_planktonic
8	3	1	15	15	32	17	28	40	69155_planktonic

Figura 4 - Matriz de *Composite Correlation Index* (CCI) gerada no VITEK-MS™ a partir dos *super-spectra* das células planctônicas (*planktonic*) e sésseis (*biofilm*) dos isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) com alta formação de biofilme e da cepa *Candida albicans* SC5314 (taxonomia absoluta)

Cores diferentes indicam a distância de correlação (quantidade de massas idênticas).

Na plataforma VITEK-MS™, os *super-spectra* das células planctônicas e sésseis dos isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) apresentaram 19 (47,5%) massas idênticas, enquanto da cepa *C. albicans* SC5314 apresentaram 8 (20%), entre os 40 picos analisados pelo *software* SARAMIS Premium (Figuras 2, 3, 4 e 5).

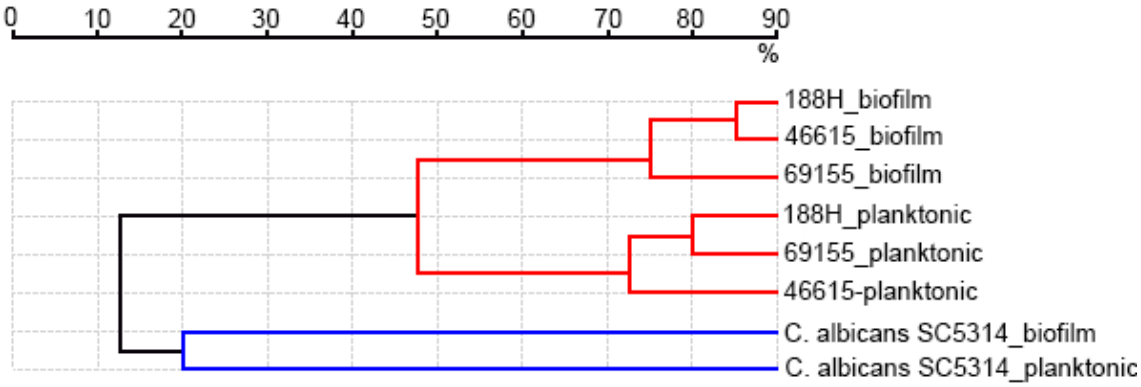
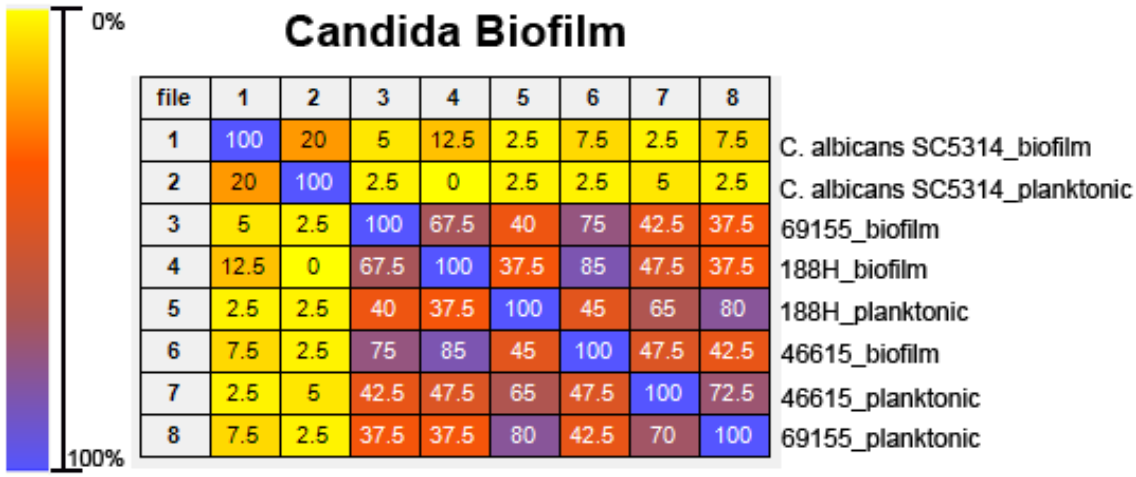


Figura 5 - Dendrograma gerado no VITEK-MS™ a partir dos *super-spectra* das células planctônicas (*planktonic*) e sésseis (*biofilm*) dos isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) com alta formação de biofilme e da cepa *Candida albicans* SC5314 (taxonomia relativa)

As distâncias no eixo x indicam o percentual de similaridade entre os 40 picos analisados dos superespectros.



file	1	2	3	4	5	6	7	8	
1	100	20	5	12.5	2.5	7.5	2.5	7.5	C. albicans SC5314_biofilm
2	20	100	2.5	0	2.5	2.5	5	2.5	C. albicans SC5314_planktonic
3	5	2.5	100	67.5	40	75	42.5	37.5	69155_biofilm
4	12.5	0	67.5	100	37.5	85	47.5	37.5	188H_biofilm
5	2.5	2.5	40	37.5	100	45	65	80	188H_planktonic
6	7.5	2.5	75	85	45	100	47.5	42.5	46615_biofilm
7	2.5	5	42.5	47.5	65	47.5	100	72.5	46615_planktonic
8	7.5	2.5	37.5	37.5	80	42.5	70	100	69155_planktonic

Figura 6 - Matriz de *Composite Correlation Index* (CCI) gerada no VITEK-MS™ a partir dos *super-spectra* das células planctônicas (*planktonic*) e sésseis (*biofilm*) dos isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) com alta formação de biofilme e da cepa *Candida albicans* SC5314 (taxonomia relativa)

Cores diferentes indicam a distância de correlação (percentual de similaridade).

Na plataforma Microflex™, o nível de distância foi maior entre os MSP das células planctônicas e sésseis dos isolados clínicos de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) (Figura 6). Os MSP das células planctônicas e sésseis da cepa *C. albicans* SC5314, analisados pelo *software* Biotyper, apresentaram 49,9% de similaridade (Figura 7).

As análises pelo *software* flexAnalysis permitiram alinhar os espectros representativos dos MSP das células planctônicas e das células sésseis de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*), e da cepa *C. albicans* SC5314, para verificar as principais diferenças entre os respectivos perfis proteômicos (Figura 8).

O perfil proteômico das células sésseis dos isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*), representado pela amostra 188 H, apresentou as principais diferenças em relação ao perfil proteômico das suas respectivas células planctônicas, nos intervalos das massas relativas de 4000 a 8000 *m/z* e de 8600 a 14600 *m/z* (Figuras 9 e 10). Por outro lado, no perfil proteômico das células sésseis da cepa *C. albicans* SC5314, poucas diferenças foram perceptíveis em relação ao perfil proteômico das suas respectivas células planctônicas, nesses mesmos intervalos de massas relativas (Figuras 11 e 12).

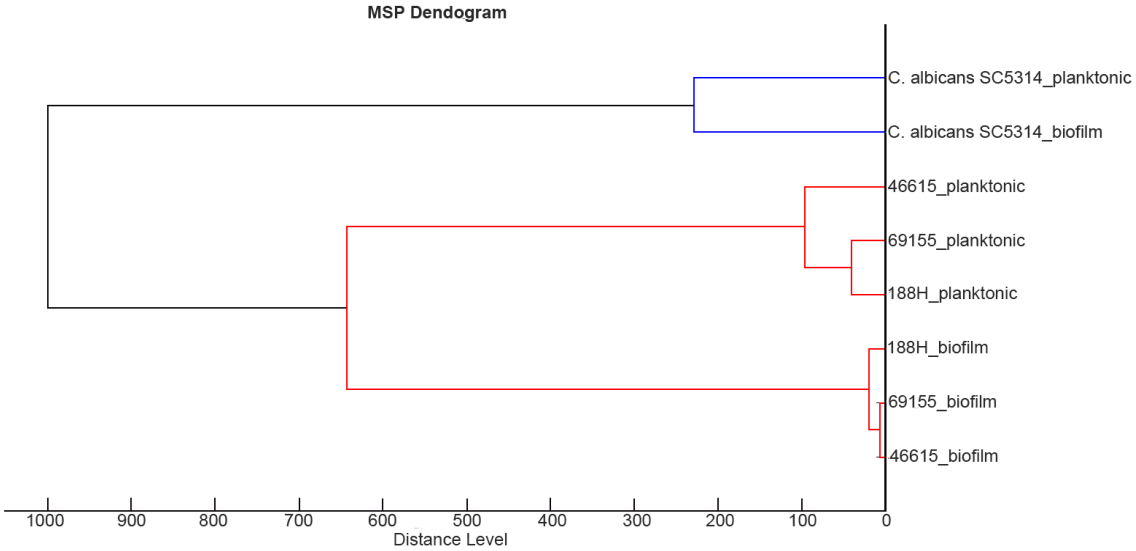


Figura 7 - Dendrograma gerado no Microflex™ a partir dos *Main Spectra* (MSP) das células planctônicas (*planktonic*) e sésseis (*biofilm*) dos isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) com alta formação de biofilme e da cepa *Candida albicans* SC5314

As distâncias estão exibidas em unidades relativas no eixo x.

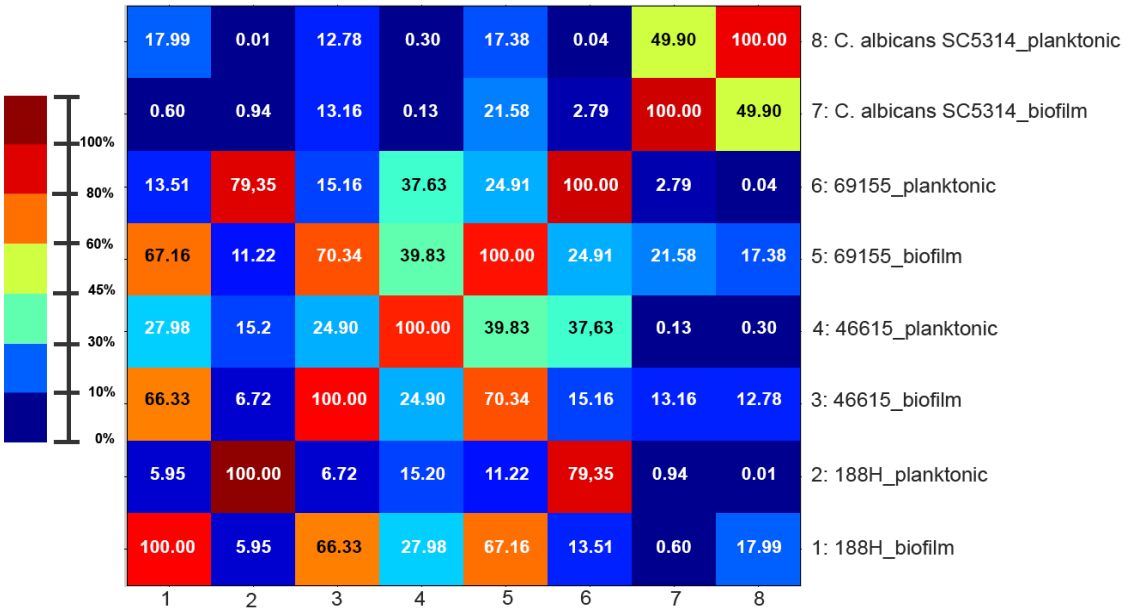


Figura 8 - Matriz de *Composite Correlation Index* (CCI) gerada no Microflex™ a partir dos *Main Spectra* (MSP) das células planctônicas (*planktonic*) e sésseis (*biofilm*) dos isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) com alta formação de biofilme e da cepa *Candida albicans* SC5314

Cores diferentes indicam a distância de correlação (percentual de similaridade).

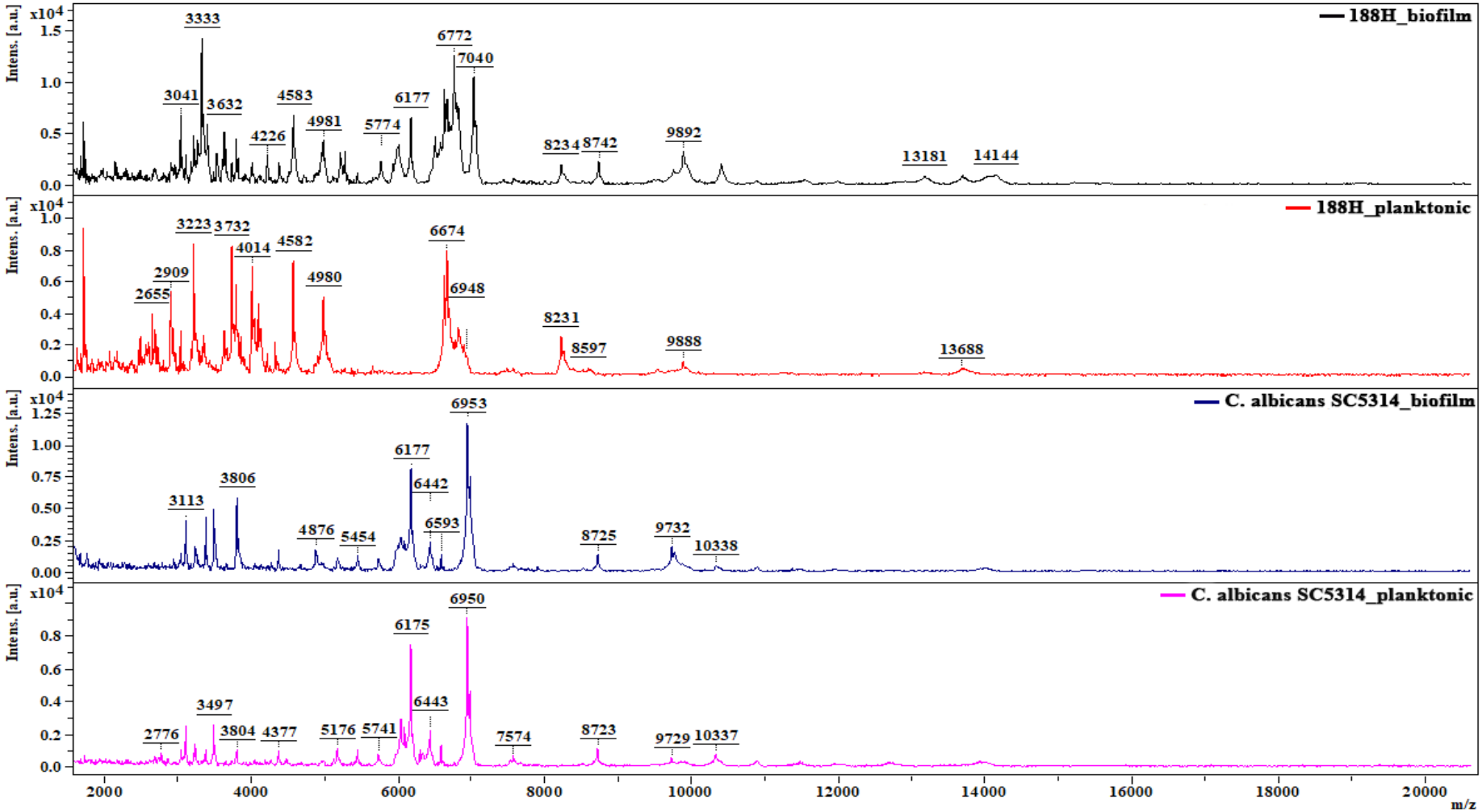


Figura 9 - Espectros representativos dos MSP das células planctônicas (*planktonic*) e sésseis (*biofilm*) de *C. parapsilosis* (188 H) e de *C. albicans* SC5314.

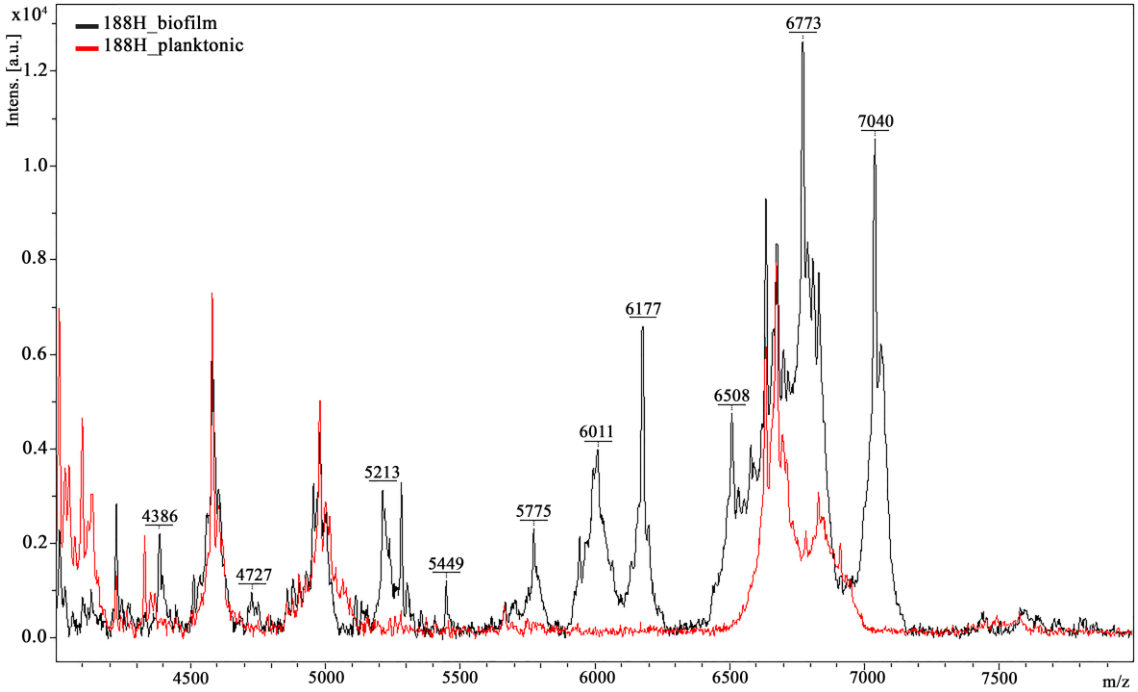


Figura 10 - Sobreposição dos espectros representativos dos MSP das células planctônicas (*planktonic*) e sésseis (*biofilm*) do isolado 188 H de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*), no intervalo das massas relativas de 4000 a 8000 *m/z*
As massas quantificadas correspondem a alguns picos específicos das células sésseis.

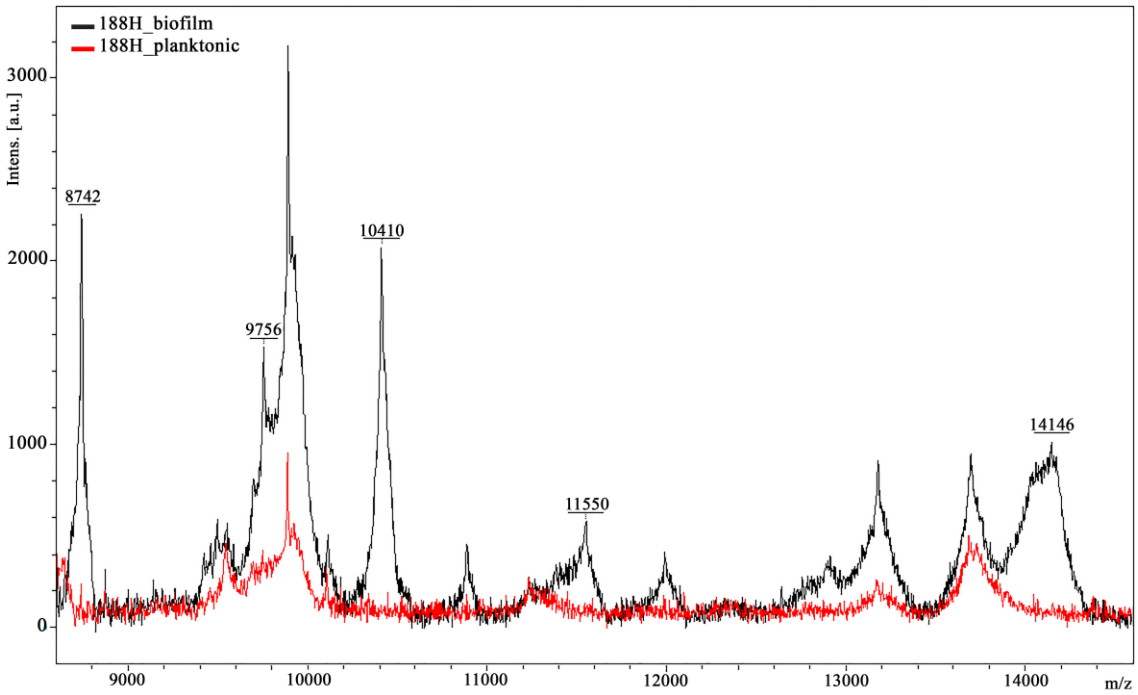


Figura 11 - Sobreposição dos espectros representativos dos MSP das células planctônicas (*planktonic*) e sésseis (*biofilm*) do isolado 188 H de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*), no intervalo das massas relativas de 8600 a 14600 *m/z*
As massas quantificadas correspondem a alguns picos específicos das células sésseis.

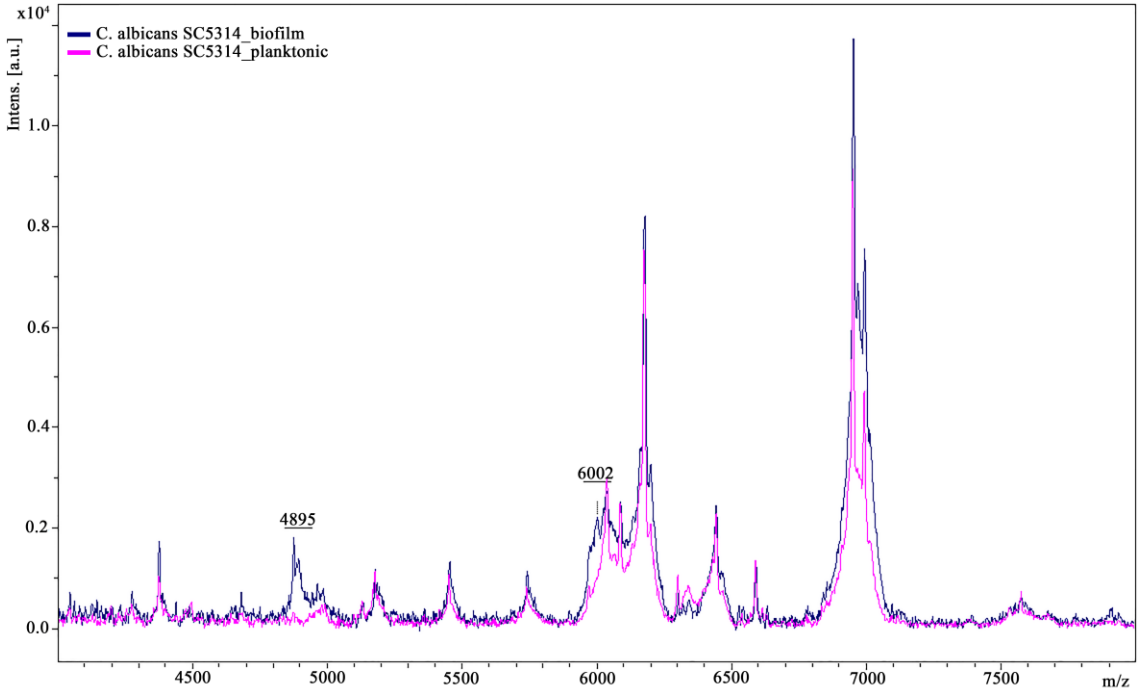


Figura 12 - Sobreposição dos espectros representativos dos MSP das células planctônicas (*planktonic*) e sésseis (*biofilm*) da cepa *Candida albicans* SC5314, no intervalo das massas relativas de 4000 a 8000 *m/z*

As massas quantificadas correspondem a alguns picos específicos das células sésseis.

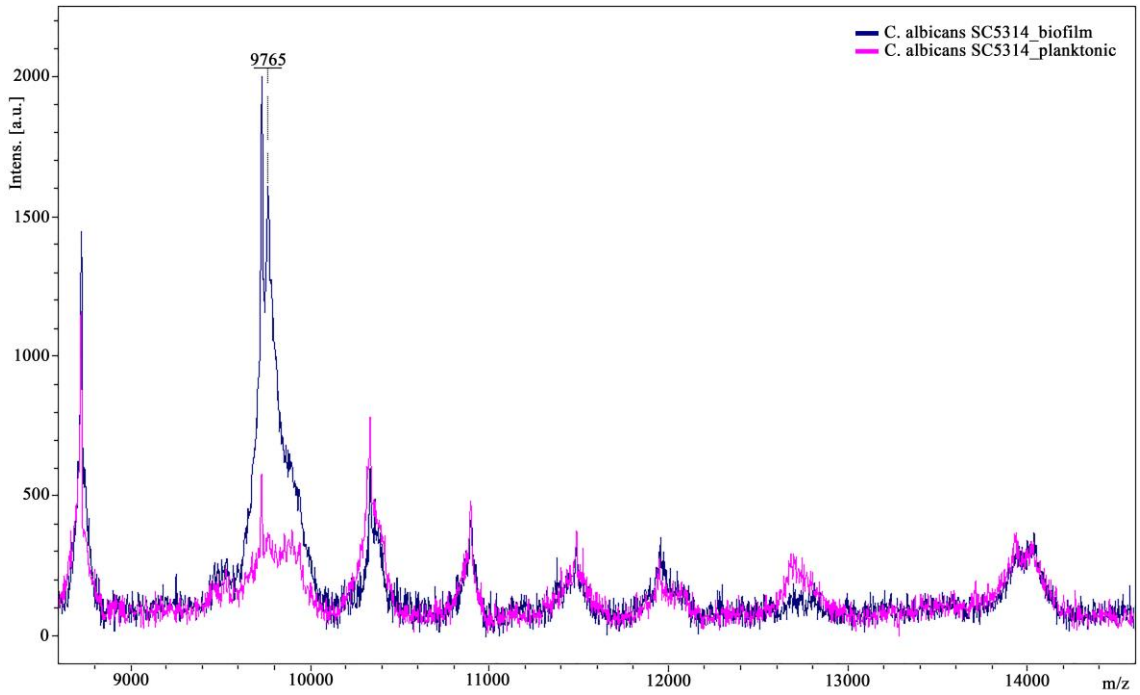


Figura 13 - Sobreposição dos espectros representativos dos MSP das células planctônicas (*planktonic*) e sésseis (*biofilm*) da cepa *Candida albicans* SC5314, no intervalo das massas relativas de 8600 a 14600 *m/z*

As massas quantificadas correspondem a alguns picos específicos das células sésseis.

4.7 Mutações do gene *ERG11* dos isolados de *C. parapsilosis* NSA

Foram analisadas as sequências de 1.569 pb do gene *ERG11* dos doze isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) NSA obtidos neste estudo (10 do HUMAP-UFMS e 2 do HU-USP). Todos os isolados NSA apresentaram uma mutação silenciosa (T591C) nesse gene. A mutação não sinônima (A→T) no nucleotídeo de posição 395 (A395T), que acarreta na troca do aminoácido tirosina por fenilalanina na posição de número 132 (Y132F), foi observada em sete (87,5%) dos oito isolados do HUMAP-UFMS, com resistência cruzada para FLC e VRC (Tabela 7). A mutação G1193T, que leva à substituição R398I, foi observada no único isolado do HU-USP resistente ao FLC (69155). Todas as mutações pontuais foram homozigóticas (em ambos os alelos), e podem ser visualizadas no Anexo C.

Tabela 7 - Perfil de suscetibilidade e análise das sequências do gene *ERG11* dos isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) não suscetíveis aos azólicos, obtidos no HUMAP-UFMS - 2012 a 2015

ISOLADO	DATA DA COLETA	UNIDADE[1]	SUSCETIBILIDADE		MUTAÇÃO NO GENE *ERG11*
			FLC	VRC	
58 H	11/04/2012	Renal	Resistente	Resistente	T591C
87 H	17/06/2013	CTI adulto	Resistente	Resistente	T591C, A395T
137 H	13/08/2013	CTI adulto	Resistente	Resistente	T591C, A395T
88 H	21/10/2013	CTI adulto	Resistente	Resistente	T591C, A395T
542 AMO	26/11/2013	CTI adulto	Resistente	Resistente	T591C, A395T
16 PC	21/01/2014	CTI adulto	Resistente	Resistente	T591C, A395T
340 PC	29/07/2014	CTI adulto	Resistente	Resistente	T591C, A395T
422 PC	06/08/2014	CTI adulto	Intermediária	Suscetível	T591C
29 H	08/01/2015	CTI adulto	Intermediária	Suscetível	T591C
1131 PC	06/09/2015	CTI adulto	Resistente	Resistente	T591C, A395T

[1] Unidade hospitalar na qual o paciente estava internado na respectiva data da coleta.
CTI = Centro de Terapia Intensiva; FLC = Fluconazol; VRC = Voriconazol.

4.8 Genotipagem dos isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*)

Dez (71,4%) dos 14 isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) provenientes do HUMAP-UFMS não foram suscetíveis aos azólicos [oito (57,1%) apresentaram resistência cruzada para FLC e VRC e dois (14,3%) suscetibilidade intermediária ao FLC] (Tabela 5). Eles foram obtidos predominantemente de pacientes internados no centro de terapia intensiva (CTI) adulto do referido hospital (Tabela 7), e apresentaram baixa formação de biofilme e baixa atividade metabólica (Figura 2). Deste modo, todos os isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) desse hospital, incluindo os SA, foram genotipados para investigar a ocorrência de um possível surto envolvendo isolados clonais.

4.8.1 PFGE do DNA genômico dos isolados de *C. parapsilosis* NSA

Os nove isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) NSA obtidos no HUMAP-UFMS apresentaram o mesmo padrão de bandas, após a separação por PFGE dos fragmentos do DNA digerido com *Sfi*I (Figura 14). O isolado 1131 PC foi obtido depois que a investigação molecular foi iniciada, tendo sido incluído apenas na análise de microssatélites.

A análise por UPGMA do dendrograma gerado indicou 100% de similaridade genética entre eles (dados não mostrados). As bandas, que variaram entre 50 e 1.300 Kb, foram normalizadas no *software* BioNumerics, utilizando como referência o marcador de peso molecular *Lambda Ladder* (Figura 15).

4.8.2 Análise de microssatélites do genoma de *C. parapsilosis*

A análise dos 14 isolados (10 NSA e 4 SA) de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) do HUMAP-UFMS e da cepa *C. parapsilosis* ATCC 22019 revelou a presença de 26 alelos,

a partir de oito genótipos diferentes. A detecção de mais de uma banda após amplificação do material genômico por PCR, foi relacionada à presença de alelos diferentes no genótipo, sendo considerado heterozigoto. Na presença de banda única, o isolado foi considerado homozigoto para o respectivo *locus*. Os fragmentos, obtidos de cada isolado foram utilizados para montar uma matriz, demonstrando a presença dos alelos nos *loci* (Tabela 8). O dendrograma (Figura 16) foi gerado após a importação dessa matriz para o *software* BioNumerics.

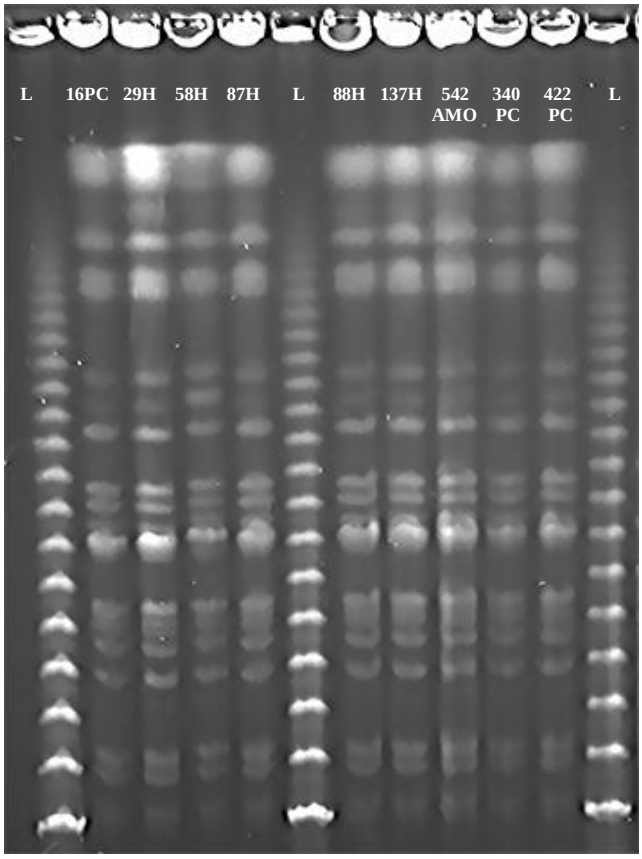


Figura 14 - Padrão de bandas do PFGE do DNA genômico dos isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) não suscetíveis aos azólicos, após digestão com a enzima *Sfi*I

L = *Lambda Ladder* (48,5–1.018,5 Kb)

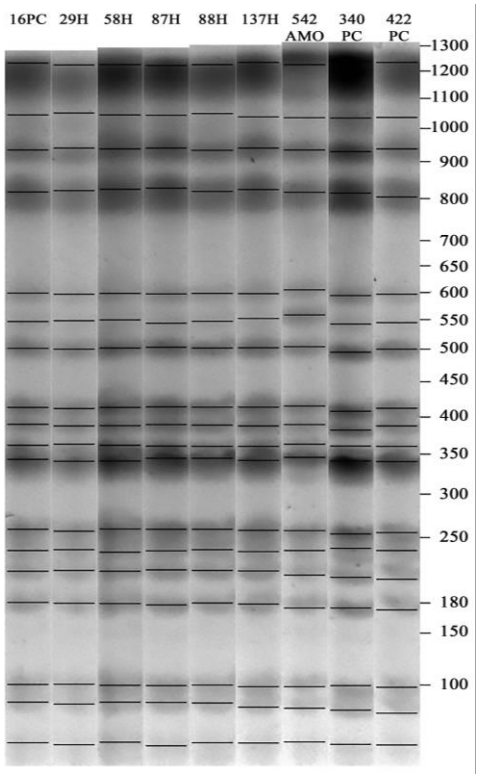


Figura 15 - Normalização pelo BioNumerics do padrão de bandas obtido no PFGE, utilizando como referência o marcador de peso molecular *Lambda Ladder*

Tabela 8 - Matriz obtida pela análise de microssatélites dos 14 isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) e da cepa ATCC 22019

ISOLADO	*LOCUS*																									
	A	**B**				**C**	**D**				**G**		**CP 1**				**CP 4**					**CP 6**				
	110 pb	**120 pb**	**145 pb**	**160 pb**	**185 pb**	**130 pb**	**110 pb**	**125 pb**	**135 pb**	**150 pb**	**120 pb**	**140 pb**	**215 pb**	**235 pb**	**250 pb**	**290 pb**	**290 pb**	**300 pb**	**325 pb**	**350 pb**	**380 pb**	**265 pb**	**280 pb**	**300 pb**	**315 pb**	**360 pb**
58 H	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0
87 H	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
137 H	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
88 H	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
542 AMO	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
16 PC	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
340 PC	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
422 PC	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
188 H	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
199 H	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
29 H	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
559 H	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
1131 PC	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
662 H - II	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0
ATCC 22019	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0

NOTA: O número 0 (zero) corresponde à ausência e o número 1 (um) à presença do respectivo produto de PCR de cada *locus*.
pb = pares de bases.

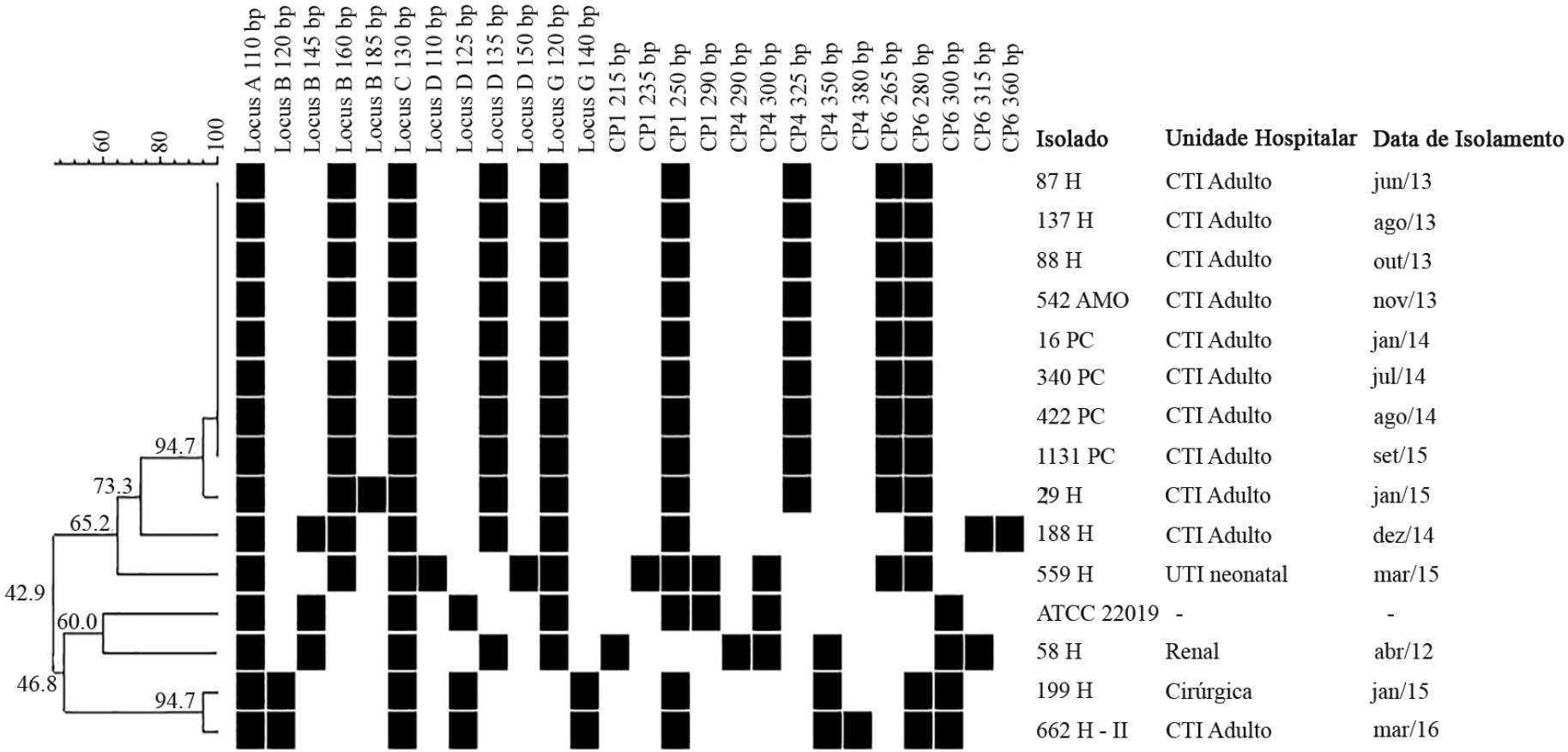


Figura 16 - Dendrograma de agrupamento dos 14 isolados de *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) e da cepa *Candida parapsilosis* ATCC 22019, baseado na análise de microssatélites de seus respectivos genomas

A similaridade genética entre cada ramo está indicada no nó entre eles. O quadrado preto indica a presença de um produto de amplificação.

4.9 Investigação de um surto envolvendo isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) resistentes aos azólicos e correlação com os dados clínicos

Os dados clínicos e epidemiológicos foram coletados dos prontuários dos 14 pacientes do HUMAP-UFMS, cujos isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) foram previamente genotipados, pela análise de microssatélites.

O primeiro isolado de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) NSA (58 H) foi detectado em abril de 2012, obtido de um paciente idoso com insuficiência renal crônica e sob tratamento dialítico via CVC. O paciente não possuía histórico de uso de antifúngicos durante essa internação, e desenvolveu candidemia na unidade renal do referido hospital. De acordo com a análise de microssatélites, este isolado não apresentou relação genética com os demais isolados NSA, provenientes do CTI adulto (Figura 16).

O primeiro isolado clonal NSA (87 H) era de junho de 2013, proveniente de um paciente adulto jovem, com lúpus eritematoso sistêmico, que desenvolveu candidemia após 19 dias de tratamento com FLC, e prolongada internação no CTI adulto. Após este caso, outros oito pacientes da mesma unidade apresentaram culturas positivas para *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) NSA (Tabela 7). De acordo com a análise de microssatélites, todos os isolados NSA do CTI adulto foram agrupados em um único *cluster*, sendo o último (1131 PC) detectado em setembro de 2015 (Figura 16), evidenciando a ocorrência de um surto nessa unidade hospitalar.

Os quatro isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) SA obtidos entre dezembro de 2014 e março de 2016 não foram geneticamente relacionados aos isolados clonais envolvidos no surto. Dois dos pacientes infectados por esses isolados estavam internados no CTI adulto, um na UTI neonatal e outro na unidade cirúrgica (Figura 16).

Ao comparar os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes com culturas positivas para os isolados clonais de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) NSA (9), com os dados dos pacientes infectados pelos isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) SA (4), verificou-se que ambos os grupos estavam hospitalizados por um período prolongado antes do isolamento das leveduras (média de 46 vs. 23,5 dias, P = 0,3). A maioria dos pacientes possuía CVC antes das culturas positivarem (100% NSA vs. 75% SA).

Os pacientes com culturas positivas para isolados clonais NSA tenderam a ter mais comorbidades do que os infectados por isolados AS: diabetes mellitus (44% vs. 0%) e doenças pulmonares crônicas (89% vs. 25%). Contudo, as diferenças não foram estatisticamente significantes.

Todos os pacientes com culturas positivas para isolados clonais NSA tinham sido hospitalizados no CTI adulto, enquanto os isolados SA infectaram apenas dois pacientes nessa unidade (100% vs. 50%, P = 0,08). Todos os pacientes com isolados clonais de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) NSA possuíam histórico de uso de corticosteroides, enquanto em nenhum dos pacientes com isolados SA haviam sido administrados (P = 0,001).

A maioria dos pacientes (78%) com culturas positivas para isolados clonais NSA foi tratada com FLC (intervalo 2-67 dias) antes do isolamento de *C. parapsilosis*. Entre os pacientes infectados pelos isolados SA, um (25%) também recebeu FLC (P = 0,2). A mediana do tempo de tratamento prévio com FLC, nos pacientes com os isolados clonais NSA, foi maior do que nos pacientes infectados pelos isolados SA (12 vs. 0 dias), sem significância estatística (P = 0,07, dados não mostrados). Os dados clínicos e epidemiológicos estão resumidos na Tabela 9.

Tabela 9 - Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes do HUMAP-UFMS com culturas positivas para *Candida parapsilosis* (*sensu stricto*) não suscetíveis aos azólicos (NSA) clonais e isolados suscetíveis (SA)

CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES	CLONE NSA (N = 9)	SA (N = 4)	P
Idade (anos) – média (intervalo)	41 (22–84)	28 (1–45)	0,2
Gênero Feminino – n (%)	5 (56)	3 (75)	1
Hospitalização (dias) antes da cultura positiva	46 (1–106)	23,5 (10–92)	0,3
Admissão prévia no CTI adulto – n (%)	9 (100)	2 (50)	0,08
Comorbidades – n (%)			
Câncer	0 (0)	1 (25)	0,3
Doença pulmonar	8 (89)	1 (25)	0,09
Doença cardíaca	2 (22)	1 (25)	1
Diabetes mellitus	4 (44)	0 (0)	0,2
Insuficiência renal	5 (56)	1 (25)	0,5
Insuficiência hepática	2 (22)	0 (0)	1
Histórico de procedimentos invasivos – n (%)			
Cateter urinário	8 (89)	2 (50)	0,2
Cateter venoso central	9 (100)	3 (75)	0,3
Hemodiálise	4 (44)	0 (0)	0,2
Uso prévio de antibióticos	9 (100)	4 (100)	1
Uso prévio de corticosteroides	9 (100)	0 (0)	**0,001**
Uso prévio de antifúngicos	9 (100)	2 (50)	0,07
Uso prévio de fluconazol	7 (78)	1 (25)	0,2
Mortalidade geral	7 (78)	2 (50)	0,5

NOTA: Valor de P em negrito significa que foi estatisticamente significativo (P < 0,05).
CTI = Centro de Terapia Intensiva.

5 DISCUSSÃO

Candidíase invasiva frequentemente acomete pacientes hospitalizados em UTIs, e está associada a elevadas taxas de mortalidade, devido ao diagnóstico e tratamento tardios, determinantes cruciais para o desfecho clínico (Ben-Ami, 2018; Clancy e Nguyen, 2018; O'leary *et al.*, 2018). A difusão de procedimentos invasivos, do uso de antibióticos de amplo espectro e de potentes imunossupressores, bem como de CVC, tem aumentando consideravelmente a incidência de candidemia nas últimas décadas (Mellinghoff *et al.*, 2018).

Embora o intestino seja considerado um reservatório fúngico primário, o CVC possivelmente é uma via alternativa para a disseminação hematogênica de *Candida* spp., associando as infecções de corrente sanguínea a esse dispositivo (Epelbaum e Chasan, 2017). A análise molecular de isolados de *C. parapsilosis* obtidos, simultaneamente, da corrente sanguínea e PC, reforça essa observação ao demonstrar a similaridade entre os genótipos (Wang, Zhang, *et al.*, 2016).

A presença de micro-organismos na PC contribui para a ocorrência de infecções de corrente sanguínea relacionadas ao CVC. Crescimento de *Candida* spp. em culturas desse segmento do cateter, acima de 15 UFC/PC, tem sido utilizado como critério para considerar episódios de candidemia relacionados a esse dispositivo (Janum e Afshari, 2016).

Em nossa casuística, quatro isolados clonais de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) NSA, provenientes de ponta de cateter de pacientes hospitalizados no CTI adulto do HUMAP-UFMS (Tabelas 5 e 7), apresentaram crescimento acima de 15 UFC/PC. Esses

pacientes apresentavam fatores de risco semelhantes àqueles com candidemia, no entanto, as hemoculturas foram negativas. Porém, como já demonstrado por diversos autores, esta técnica tem uma baixa sensibilidade, de aproximadamente 50% (Phoompoung e Chayakulkeeree, 2016).

Candida parapsilosis (*sensu stricto*) tem sido descrita como a espécie mais comum entre os isolados clínicos do complexo *C. parapsilosis*, representando mais de 80% do total (Xiao *et al.*, 2015; Barchiesi *et al.*, 2016; Lovero *et al.*, 2016; Magobo *et al.*, 2017; Moreno *et al.*, 2017; Neji, Trabelsi, *et al.*, 2017). Menos de 20% dos nossos isolados foram identificados como *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (Tabelas 4 e 5), em acordo com outros estudos brasileiros (Bonfietti *et al.*, 2012; Trabasso *et al.*, 2015; Ziccardi *et al.*, 2015), e mostrando que a distribuição dessas espécies se mantém inalterada no país. Estas duas espécies são pouco isoladas de amostras clínicas, e ainda mais raramente de sangue (Gomez-Lopez *et al.*, 2008; Silva, A. P. *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010).

As primeiras análises demonstraram que a plataforma Microflex™ de MALDI-TOF MS, não apresentava acurácia na identificação das espécies do complexo *C. parapsilosis*, provavelmente devido à insuficiência de espectros de massas de referência de cada espécie, disponíveis no *software* Biotyper 2.0 (Hendrickx *et al.*, 2011; Putignani *et al.*, 2011; Jamal *et al.*, 2014). No presente estudo, as espécies dos isolados clínicos, previamente determinadas por RAPD e RFLP, foram identificadas corretamente pelo *software* Biotyper 3.1, atualizado com novos espectros de referência, mostrando 100% de concordância com as técnicas moleculares, e resultados similares a outros relatos (Chao *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2017). Portanto, a plataforma Microflex™ pode ser uma ferramenta útil, rápida e confiável para identificação das espécies crípticas desse complexo, contudo, depende da versão do *software* Biotyper utilizada.

Embora ainda sejam incomuns, os isolados de *Candida* spp. resistentes aos antifúngicos, têm sido cada vez mais identificados em todo o mundo (Arendrup, 2014; Perlin *et al.*, 2015). Recentemente, a análise de uma coleção global com 2.809 isolados clínicos de *Candida* spp. de 29 países, detectou resistência ao FLC em 3,8% dos isolados de *C. parapsilosis*, superando *C. albicans* e *C. tropicalis*, com 0,4% e 2,7%, respectivamente (Castanheira *et al.*, 2017).

Baixas taxas de resistência ao FLC têm sido relatadas entre os isolados de *C. parapsilosis* em todo o mundo, incluindo a América Latina (1,1%) (Nucci, Queiroz-Telles, *et al.*, 2013), EUA (4,0%) (Pfaller e Castanheira, 2016), Ásia e Pacífico Ocidental (5,7%) (Pfaller *et al.*, 2015), e Europa (5,6%) (Trouvé *et al.*, 2017). Nos últimos anos, casos de candidíase invasiva causada por isolados NSA têm sido relatados no Brasil (Da Costa *et al.*, 2014; Giacobino *et al.*, 2016; Pinhati *et al.*, 2016; Alencar *et al.*, 2017).

Da Costa *et al.* (2014) e Pinhati *et al.* (2016) observaram resistência ao FLC em 26,9% e 75%, respectivamente, dos isolados de *C. parapsilosis* obtidos de casos de candidemia, no Brasil. Nossos resultados reforçam a importância do monitoramento do perfil de suscetibilidade aos azólicos dessa levedura no país, ao demonstrar a presença de isolados NSA em dois hospitais universitários públicos brasileiros de diferentes Estados (9,6% no HU-USP e 58,8% no HUMAP-UFMS).

As três espécies do complexo *C. parapsilosis* podem formar biofilme, no entanto, tal capacidade e o tipo de estrutura formada, dependem da cepa envolvida (Cordeiro *et al.*, 2017; Cavalheiro e Teixeira, 2018). Apesar desta dependência, os isolados com maior produção de biofilme são predominantemente de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) (Neji, Hadrich, *et al.*, 2017; Paula-Mattiello *et al.*, 2017; Brilhante *et al.*, 2018),

enquanto a menor produção tem sido observada principalmente em *C. metapsilosis* (Cordeiro *et al.*, 2014; Neji, Hadrich, *et al.*, 2017; Brilhante *et al.*, 2018). Em concordância com tais relatos, os três isolados da nossa casuística, com alta formação de biofilme (46615, 69155 e 188 H), foram identificados como *C. parapsilosis* (*sensu stricto*), e o único isolado de *C. metapsilosis* (119 H) apresentou baixa formação (Figura 2). Assim como este último, os isolados de *C. orthopsilosis* (989, 65 H e 191 H) apresentaram baixa formação, mas alta formação já foi observada em isolados dessa espécie em outro estudo (Treviño-Rangel *et al.*, 2015).

Enquanto três isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) aparesentaram alta formação de biofilme com alta atividade metabólica, foi observada moderada formação com baixa atividade em outros três isolados (570, 88404 e 662 H-II), e um isolado de *C. orthopsilosis* (191 H) apresentou baixa formação com alta atividade (Figura 2). Tais achados corroboram com estudos anteriores (Lattif *et al.*, 2010; Melo *et al.*, 2011; Treviño-Rangel *et al.*, 2015), ao demonstrar a falta de relação da biomassa e da viabilidade celular dos biofilmes de *C. parapsilosis* (*sensu lato*), ou seja, a atividade metabólica parece ser independente da quantidade de biomassa.

A quantificação de biofilmes tem sido realizada principalmente pela coloração com cristal violeta, que quantifica a biomassa total do mesmo, corando componentes da matriz extracelular, bem como células vivas e mortas. Já o ensaio de redução de XTT, ao mensurar a atividade metabólica, avalia apenas as células vivas (Azeredo *et al.*, 2017). Além dessas diferenças metodológicas, os biofilmes microbianos apresentam uma importante heterogeneidade estrutural, biológica e química (Stewart e Franklin, 2008), que podem explicar a discrepância entre a biomassa e a atividade metabólica do biofilme de alguns isolados.

A formação de biofilme por *Candida* spp. representa um importante problema clínico para pacientes criticamente doentes, devido às opções terapêuticas limitadas. Embora o desenvolvimento de resistência do biofilme contra as equinocandinas pareça ser mais lento, um perfil elevado tem sido observado contra os azólicos (Fiori *et al.*, 2011; Maiolo *et al.*, 2016; Swaminathan *et al.*, 2018). E por isso, as equinocandinas têm sido consideradas como tratamento de escolha para episódios de candidemia e de candidíase invasiva associados a biofilmes (Almirante *et al.*, 2017).

Um estudo conduzido em 2002 demonstrou a suscetibilidade dos biofilmes de *C. albicans* e *C. parapsilosis*, apenas às formulações lipídicas de ANB (complexo lipídico e a lipossomal) e equinocandinas (CAF e MIF), sendo resistentes aos triazóis (FLC, VRC e ravuconazol), nistatina, clorexidina, terbinafina e ANB desoxicolato (Kuhn *et al.*, 2002). Entretanto, recentemente foi demonstrada que tanto a ANB desoxicolato, quanto a ANB lipossomal foram capazes de reduzir a biomassa de biofilmes de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (Rodrigues e Henriques, 2017).

Além disso, foi demonstrada maior atividade da ANB desoxicolato quando comparada à ANF contra biofilmes de *C. parapsilosis* (Valentín *et al.*, 2016), em concordância com nossos resultados, que extrapolam essa observação para CAF e MIF. Resultados anteriores sugerem que ANF seja mais efetiva contra biofilmes de *C. albicans* e *C. tropicalis* do que de *C. parapsilosis* (Rosato *et al.*, 2013).

Moderada e baixa atividade das equinocandinas contra biofilmes de *C. parapsilosis* têm sido relatadas em vários estudos (Simitsopoulou *et al.*, 2013; Guembe *et al.*, 2014; Shirazi e Kontoyiannis, 2015; Kovács *et al.*, 2016; Kovács *et al.*, 2017; Prażyńska *et al.*, 2018). Particularmente, a MIF tem apresentado a melhor atividade anti-biofilme (Simitsopoulou *et al.*, 2013; Shirazi e Kontoyiannis, 2015).

Recentemente foi descrita maior atividade *in vitro* da MIF contra biofilmes de *C. albicans*, com alta atividade metabólica ou alta produção de biomassa, sugerindo que a suscetibilidade a essa equinocandina teria relação direta com a atividade metabólica ou produção de biomassa (Marcos-Zambrano, Escribano, González Del Vecchio, *et al.*, 2014; Marcos-Zambrano *et al.*, 2016). De fato, os biofilmes de *C. glabrata*, com as maiores atividades metabólicas, exibiram maior suscetibilidade à MIF, enquanto os biofilmes de *C. parapsilosis* mostraram as menores atividades, sendo os menos suscetíveis (Prażyńska *et al.*, 2018). No entanto, nossos resultados não mostraram qualquer atividade *in vitro* da MIF, contra biofilmes de *C. parapsilosis* com alta atividade metabólica e alta produção de biomassa, assim como observado recentemente por outros autores (Kovács *et al.*, 2017), demonstrando que essas características não influenciam na suscetibilidade do biofilme dessa espécie.

A grande variabilidade na formação de biofilme entre os isolados de *C. parapsilosis* (Silva, S. *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011) e a atividade anti-biofilme da ANB desoxicolato espécie e cepa-dependente (Prażyńska e Gospodarek, 2014; Rodrigues e Henriques, 2017) já foram demonstradas. Desta forma, ANB desoxicolato pode ser considerada uma alternativa, quando possível, ao tratamento antifúngico das infecções associadas ao biofilme de *C. parapsilosis*. Esta opção poderia ser proposta, particularmente em países cujos recursos na área da saúde são limitados, o que dificulta o acesso às formulações lipídicas de ANB, de custos substancialmente mais elevados (Tonin *et al.*, 2017). De fato, nossos resultados mostraram a boa atividade *in vitro* da ANB desoxicolato contra biofilmes de *C. parapsilosis*, oposto aos resultados obtidos com as equinocandinas testadas.

Estudos multicêntricos, com isolados exibindo diferentes perfis de formação de biofilme, bem como a atividade *in vivo* da ANB desoxicolato, devem ser avaliados para confirmar nossos resultados. No entanto, esses dados reforçam o alerta aos médicos, sobre a possível persistência de infecções causadas por *C. parapsilosis* no ambiente hospitalar, devido à prescrição empírica de equinocandinas para tratar candidemias relacionadas ao cateter (Larkin *et al.*, 2018).

Várias proteínas da parede celular, denominadas adesinas, são responsáveis pela adesão das células de *Candida* spp. em superfícies bióticas e abióticas, como a do cateter (Cavalheiro e Teixeira, 2018). Deste modo, a análise proteômica pode identificar potenciais marcadores diagnósticos e alvos terapêuticos das infecções associadas ao biofilme (Sardi *et al.*, 2014).

A técnica de 2D-PAGE continua sendo a mais utilizada na análise proteômica de um sistema biológico, sendo sua versão modificada (2D-DIGE) a mais sensível e reprodutível, devido à marcação diferencial das amostras de proteína com fluoróforos (Meleady, 2018).

Análises proteômicas de células planctônicas e sésseis de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, têm sido realizadas por 2D-PAGE ou 2D-DIGE (Martínez-Gomariz *et al.*, 2009; Seneviratne *et al.*, 2010; Serrano-Fujarte *et al.*, 2016). Em um desses estudos, a análise por 2D-PAGE, mostrou a diminuição da expressão de nove proteínas da parede celular, nas células sésseis de *C. parapsilosis*, na presença de diferentes concentrações de H_2O_2, em resposta ao estresse oxidativo (Serrano-Fujarte *et al.*, 2016). Contudo, além de ser laboriosa, demorada (pelo menos uma semana), e pouco automatizada, essa técnica pode apresentar baixa resolução para as proteínas de difícil separação (Meleady, 2018).

A técnica de MALDI-TOF MS tem sido utilizada para identificar proteínas da parede, membrana e superfície celular das leveduras, hifas e biofilmes de *C. albicans* (Cabezón *et al.*, 2009; Martínez-Gomariz *et al.*, 2009; Vialás *et al.*, 2012; Awad *et al.*, 2018; El Khoury *et al.*, 2018). Um estudo prévio indicou o potencial uso dessa ferramenta, para diferenciar a expressão proteica dos isolados, em diferentes condições de cultivo (Qian *et al.*, 2008). Mais recentemente, esse método foi capaz de distinguir os perfis proteômicos da forma filamentosa e não filamentosa do mesmo isolado de *C. albicans* (Zohbi *et al.*, 2014).

O estudo de Kubesová *et al.* (2012) demonstrou a potencial aplicação do MALDI-TOF MS na discriminação fenotípica de isolados de *C. parapsilosis*, produtores de biofilme e isolados não produtores. No entanto, a análise de maior quantidade de isolados demonstrou baixa reprodutibilidade dessa técnica, mesmo utilizando diferentes matrizes, meios de cultivos e tempos de incubação (Mlynáriková *et al.*, 2016).

Poucas diferenças entre os perfis proteômicos de células planctônicas e sésseis de *C. parapsilosis* foram previamente observadas por MALDI-TOF MS por Mlynáriková *et al.* (2016). Embora tenha sido utilizado o mesmo meio para os cultivos das células sésseis e planctônicas, estas foram cultivadas em meio líquido, contido em frascos de um material não descrito pelos autores. A formação de biofilme por *C. parapsilosis*, na superfície de diversos biomateriais tem sido descrita (Ciok-Pater *et al.*, 2009; Estivill *et al.*, 2011; Cuéllar-Cruz, Vega-González, *et al.*, 2012), como por exemplo, nas superfícies plásticas dos tubos utilizados em ensaios laboratoriais (Cerikcioglu *et al.*, 2004). Do mesmo modo, já foi demonstrada a capacidade de *C. parapsilosis* de aderir e formar biofilme em superfícies de vidro (Gallardo-Moreno *et al.*, 2004; Rajkowska e Kunicka-Styczyńska, 2018). Portanto, a provável formação de biofilme na parede dos

frascos utilizados pelos autores para os cultivos das células planctônicas, justificaria as diferenças pouco perceptíveis em relação ao perfil proteômico das células sésseis.

Em nosso estudo, para evitar esta limitação técnica, as células planctônicas foram cultivadas no mesmo meio (RPMI 2%G) utilizado nos ensaios de biofilme, na forma de ágar. Além disso, foi realizada a análise dos perfis proteômicos das células planctônicas e sésseis de *C. parapsilosis*, inclusive de *C. albicans* SC5314, em duas plataformas distintas, de MALDI-TOF MS. O menor tempo e quantidade de amostra necessária, assim como a maior reprodutibilidade dos dados nesse método, quando comparado com as técnicas de eletroforese em gel (Kubesová *et al.*, 2012), demonstram a potencial e atrativa aplicação de MALDI-TOF MS em análises proteômica de biofilmes.

As plataformas VITEK-MS™ e Microflex™ diferenciaram os perfis proteômicos das células planctônicas e sésseis de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) com alta formação de biofilme, e da cepa *C. albicans* SC5314, indicando a presença de proteínas específicas de biofilme. Contudo, análises multicêntricas, de isolados exibindo diferentes perfis de formação de biofilme, e de outras espécies patogênicas de *Candida*, são necessárias para validar a aplicação da técnica de MALDI-TOF MS, sugerida no presente estudo.

Os azólicos são os fármacos mais utilizados para o tratamento de infecções por *Candida* spp., principalmente o FLC, devido ao seu baixo custo e toxicidade, além de excelente biodisponibilidade em diferentes formulações (Ben-Ami, 2018; De Oliveira Santos *et al.*, 2018). No entanto, são vários os relatos de desenvolvimento de resistência a esta classe de antifúngico, inclusive em *C. parapsilosis* (Choi *et al.*, 2018; De Oliveira Santos *et al.*, 2018; Maria *et al.*, 2018). A presente investigação microbiológica revelou

a emergência de isolados resistentes ao FLC e VRC, em dois hospitais universitários públicos brasileiros.

A contribuição de mutações presentes no gene *ERG11*, para a resistência aos azólicos em *C. parapsilosis*, foi demonstrada em estudos prévios (Berkow *et al.*, 2015; Grossman *et al.*, 2015; Asadzadeh *et al.*, 2017; Choi *et al.*, 2018). Na presente análise, a mutação A395T no gene *ERG11*, foi identificada exclusivamente entre isolados resistentes ao azólicos do HUMAP-UFMS (Tabela 7). No entanto, essa mutação não foi observada em dois isolados resistentes ao FLC (58 H e 69155), indicando o envolvimento de outros mecanismos moleculares, como a superexpressão de *ERG11* e bombas de efluxo (Souza *et al.*, 2015). Apesar de detectada no isolado 69155 do HU-USP, a mutação G1193T, isoladamente, parece não contribuir para a resistência aos azólicos, pois também foi observada, tanto em isolados resistentes como em suscetíveis, em outros estudos (Berkow *et al.*, 2015; Grossman *et al.*, 2015; Asadzadeh *et al.*, 2017).

Maiores persistência e proporção de isolados de *C. parapsilosis*, portadores da mutação A395T no gene *ERG11* no ambiente hospitalar, têm sido relatadas quando comparadas às de isolados resistentes, sem essa mutação (Grossman *et al.*, 2015; Choi *et al.*, 2018). Esses resultados indicam a maior propensão dos isolados com a mutação A395T em causar transmissão clonal, o que explicaria a ocorrência do surto apenas no HUMAP-UFMS.

Alguns estudos têm demonstrado que isolados de *C. parapsilosis* NSA tendem a se agrupar em UTIs (Pfaller *et al.*, 2008; Raghuram *et al.*, 2012; Govender *et al.*, 2016), embora a análise molecular dos isolados não tenha sido realizada nesses relatos. Confirmando essa tendência, Pinhati *et al.* (2016) e Magobo *et al.* (2017) evidenciaram,

pela tipagem molecular dos isolados, a ocorrência de surtos de candidemia, causada por *C. parapsilosis* resistente ao FLC, nas UTIs adulta e neonatal, respectivamente.

O baixo grau de discriminação do PFGE, para investigar a relação genética entre isolados de *C. parapsilosis*, foi demonstrado em estudos anteriores (Riederer *et al.*, 1998; Pulcrano *et al.*, 2012). Por outro lado, a análise de microssatélites tem sido capaz de distinguir isolados epidemiologicamente relacionados, e identificar alterações microevolutivas entre os isolados envolvidos em surtos (Sabino *et al.*, 2010; Pulcrano *et al.*, 2012).

A investigação epidemiológica molecular, realizada no HUMAP-UFMS pela análise de microssatélites, revelou que todos os isolados clonais de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) NSA foram detectados no CTI adulto (Figura 16). O isolado 29 H apresentou uma heterozigose exclusiva no Locus B, que sugere a ocorrência de uma microevolução genética, possivelmente relacionada a condições de estresse, como o contato prévio com antifúngicos (Sampaio *et al.*, 2005). Essa metodologia também diferenciou dois isolados (29 H e 58 H), que apresentaram o mesmo perfil de bandas no PFGE (Figuras 13 e 14). Apesar de resistente ao FLC, o isolado 58 H apresentou baixa similaridade genética (42,9%) com os isolados clonais de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) NSA (Figura 16). A distância entre o CTI adulto e a unidade renal, de onde o isolado 58 H era proveniente, assim como o intervalo de tempo entre os isolamentos (mais de um ano), poderiam explicar a falta de relação entre esses isolados.

Apesar do poder discriminatório elevado, a análise de microssatélites não foi capaz de diferenciar o isolado 422 PC, sem a mutação A395T no *ERG11*, dos isolados clonais de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) NSA com essa mutação. Uma limitação deste método

é o número restrito de *loci* analisados, que pode ser insuficiente para distinguir isolados não relacionados (Alanio *et al.*, 2017).

Este estudo revelou a persistência de isolados clonais de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) NSA, por mais de dois anos, no CTI adulto de um hospital universitário público brasileiro (Tabela 7 e Figura 16), evidenciando o segundo surto, envolvendo isolados resistentes aos azólicos, documentado no Brasil. O primeiro relato descreveu um surto de candidemia causada por isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) resistentes ao FLC, na UTI adulta de um hospital privado (Pinhati *et al.*, 2016).

Ainda são poucos os estudos que se propuseram a monitorar a resistência aos azólicos e investigar a relação molecular entre os isolados de *C. parapsilosis*, concomitantemente (Pinhati *et al.*, 2016; Magobo *et al.*, 2017; Choi *et al.*, 2018). Portanto, surtos não detectados de infecções causadas por isolados NSA, podem estar ocorrendo, silenciosamente, em ambientes hospitalares no Brasil e em outros países.

Estudos que correlacionaram os surtos causados por *C. parapsilosis* com fatores de virulência dos isolados envolvidos são ainda mais raros. Análises iniciais observaram que os isolados clonais produziam mais biofilme do que os isolados geneticamente não relacionados, sugerindo que a capacidade de formação de biofilme poderia desempenhar algum papel em surtos de *C. parapsilosis* (Kuhn *et al.*, 2004). Contrariamente, baixa capacidade de formação de biofilme foi observada nos isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) NSA do HUMAP-UFMS (Figura 2), indicando que essa capacidade pode não ser um fator causal crítico para a ocorrência de surtos.

Vários estudos têm demonstrado a transmissão horizontal, em surtos de candidíase invasiva por *C. parapsilosis*, ao evidenciar a similaridade genética entre isolados clínicos e aqueles encontrados nas mãos dos profissionais de saúde (Huang *et al.*, 1999;

Barchiesi *et al.*, 2004; Van Asbeck *et al.*, 2007; Hernández-Castro *et al.*, 2010). Em nosso estudo, quatro isolados clonais de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) NSA foram recuperados de PC, indicando o manuseio inadequado do CVC, como uma provável via de transmissão do surto no CTI adulto do HUMAP-UFMS.

Uma limitação da nossa investigação foi ter sido realizada retrospectivamente, não tendo sido possível coletar amostras das mãos dos profissionais de saúde e do ambiente hospitalar. A triagem de amostras adicionais das mãos dos profissionais de saúde, dos dispositivos médicos invasivos e de superfícies do ambiente hospitalar, poderia ter melhorado a compreensão do processo de transmissão nosocomial, e contribuído, mais efetivamente, para controlar a propagação dos isolados clonais de *C. parapsilosis* NSA.

Diabetes mellitus foi identificada, em estudo prévio, como fator de risco independente para infecção por *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) NSA (Pinhati *et al.*, 2016). No presente estudo, foi observado um padrão semelhante, sendo que 44% dos pacientes, com cultura positiva para isolados NSA, tinham diabetes, enquanto nenhum dos pacientes infectado por isolados SA era portador dessa doença. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, devido ao baixo número de pacientes analisados (Tabela 9).

Pacientes que fizeram uso de antifúngicos previamente, apresentaram uma tendência a ter culturas positivas para os isolados clonais de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) NSA, enquanto ter recebido corticosteroide foi estatisticamente associado. De fato, a maioria dos pacientes internados no CTI adulto apresentavam doenças pulmonares, que necessitavam de tratamento com corticosteroides (Tabela 9).

Lotes específicos de esteroides injetáveis contaminados têm sido associados a infecções por fungos filamentosos (CDC, 2002), e ao maior surto relacionado aos

cuidados de saúde já detectado nos EUA (Kauffman e Malani, 2016). Os pacientes infectados pelos isolados clonais de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) NSA identificados no nosso estudo, receberam diferentes fármacos da classe dos corticosteroides (dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona). Portanto, a possibilidade de a contaminação desses medicamentos ter sido a causa do surto no CTI adulto do HUMAP-UFMS é improvável. A persistência dos isolados clonais NSA, nesta unidade hospitalar, pode ter sido decorrente da inadequada higienização das mãos e desinfecção do ambiente hospitalar (Guo *et al.*, 2015; Qi *et al.*, 2018), e o uso de corticosteroides acarreta no aumento da manipulação do cateter implantado no paciente.

6 CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstram que, a distribuição das espécies do complexo *C. parapsilosis* foi semelhante nos dois hospitais universitários públicos brasileiros avaliados, com o predomínio de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) entre os isolados clínicos.

A técnica de MALDI-TOF MS identificou as espécies *C. parapsilosis* (*sensu stricto*), *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* com acurácia, demonstrando o mesmo desempenho das técnicas moleculares de RAPD e RFLP. Estas duas últimas espécies devem ser consideradas como potenciais agentes de candidemia.

Isolados não suscetíveis aos azólicos estão emergindo nos dois hospitais avaliados, com a maior frequência no HUMAP-UFMS, de Campo Grande-MS.

Todos os isolados do complexo *C. parapsilosis* apresentaram capacidade de produção de biofilme, sendo sua atividade metabólica independente da quantidade de biomassa. A alta formação foi observada apenas em *C. parapsilosis* (*sensu stricto*).

As células sésseis dos isolados com alta formação de biofilme apresentaram elevada resistência à anidulafungina, caspofungina e micafungina. A anfotericina B foi o único antifúngico que apresentou atividade *in vitro* contra esses biofilmes.

Ambas as plataformas, Microflex™ e VITEK-MS™, foram capazes de diferenciar os perfis proteômicos das células planctônicas e sésseis de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) com alta formação de biofilme, indicando a possibilidade de identificar novos alvos terapêuticos ou biomarcadores por esta técnica.

A mutação A395T foi identificada exclusivamente entre os isolados clonais NSA do HUMAP-UFMS, e outros mecanismos de resistência podem estar envolvidos no isolados sem essa mutação.

A genotipagem de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) pela análise de microssatélites revelou persistência de isolados clonais não suscetíveis aos azólicos por mais de dois anos no CTI adulto do HUMAP-UFMS.

A correlação dos genótipos com os dados clínicos coletados demonstrou associação estatística do uso de corticosteroide com culturas positivas para isolados clonais de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) não suscetíveis aos azólicos.

7 ANEXOS

Anexo A - Formulário para coleta de dados dos prontuários dos pacientes

PROJETO: BIOFILMES NO COMPLEXO *Candida parapsilosis*: ANÁLISE PROTEÔMICA E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES POR MALDI-TOF, E DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

RG – HU: | | | | | | | |

Nome:_____

Sexo: ( ) Masc ( ) Fem **Idade:** _____ **Data nascimento**:___/___/___

Setor de internação:

( ) PAM ( ) Emergência ( ) Clínica Médica
( ) DIP ( ) Cirúrgicas I, II ou III ( ) Unidade Renal
( ) UCO/RCPO ( ) CTI adulto

APACHE II _____ ( ) Não realizado

Data Internação:___/___/___ ( ) Motivo:_____

Data coleta	Material (sangue, ponta de cateter, AMO, LCR)	Identificação (1 H, 2 PC, 3 AMO, 4 LCR)

Dias de internação até candidemia:_____

Neutrófilo total no dia da Infecção:_____

Comorbidades:

( ) HIV positivo ( ) Câncer/Leucemia
( ) Doença pulmonar:_____ ( ) Doença cardíaca:_____
( ) Diabetes mellitus ( ) Insuficiência renal (aguda/crônica)
( ) Insuficiência hepática ( ) Doença auto-imune:_____
( ) Doença neurológica ( ) Hemopatias:_____

continua

Anexo A - Formulário para coleta de dados dos prontuários dos pacientes (conclusão)

Exposição prévia a procedimentos médicos e medicamentos, e colonização prévia:

( ) Cateter urinário ( ) Cateter de diálise peritoneal ( ) Cateter venoso central

( ) Hemodiálise ( ) Diálise peritoneal ( ) Cirurgia

( ) Ventilação Mecânica ( ) Nutrição Parenteral ( ) Hospitalização prévia

( ) Corticóide (dexametasona e outros): dose? _____mg/kg

( ) Antibiótico: Qual(ais):_____

( ) Antifúngico: Qual?(ais)_____

( ) Internação no CTI ( ) Colonização prévia por *Candida*? Espécie_____

Tratamento antifúngico sistêmico PRÉVIO a candidíase: ( ) SIM ( ) NÃO

Antifúngico prévio	Início	Término	Posologia	Dias de tratamento

Tratamento antifúngico APÓS a coleta: ( ) SIM ( ) NÃO

Antifúngico	Início	Término	Posologia	Dias de tratamento

Troca de antifúngico após identificação da *C. parapsilosis*: ( ) SIM ( ) NÃO

Antifúngico prévio	Início	Término	Posologia	Dias de tratamento

Combinação de antifúngicos sistêmicos: ( ) SIM ( ) NÃO

( ) Fluconazol ( ) Voriconazol

( ) Anfotericina B desoxicolato ( ) Anfotericina B Lipossomal

( ) Anidulafungina ( ) Micafungina

Negativação da Cultura: SIM ( ) NÃO ( ) **Data:**___/___/___

Após quantos dias de tratamento antifúngico:_____

Desfecho clínico: ( ) alta hospitalar **Data da alta hospitalar:**___/___/___

( ) óbito **Data do óbito:**___/___/___

Total de dias de internação:_____

Anexo B - Aprovação do comitê de ética em pesquisa

USP - FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Biofilmes no complexo Candida parapsilosis: análise proteômica e identificação das espécies por MALDI-TOF, e determinação do perfil de suscetibilidade aos antifúngicos

Pesquisador: Gilda Maria Barbaro Del Negro
Área Temática:
Versão: 2
CAAE: 32118414.8.0000.0065
Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.912.028

Apresentação do Projeto:
Trata-se de estudo nacional, descritivo transversal, retrospectivo e prospectivo.

Objetivo da Pesquisa:
O objetivo principal é a análise proteômica e identificação das espécies do complexo Candida parapsilosis por MALDI-TOF e determinação do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos. Os locais de estudo serão dois hospitais públicos, um no estado de SP e outro em MS.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Riscos: baixos, os mesmos pertinentes ao profissional da saúde.
Benefícios: perfil de biofilmes e perfil de sensibilidade ao antifúngico pode colaborar com a terapêutica específica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
Pesquisa inédita, tema de relevância e com impacto futuro nas estratégias terapêuticas antifúngicas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Todos apresentados de forma adequada.

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

continua

Anexo B - Aprovação do comitê de ética em pesquisa (continuação)

USP - FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 1.912.028

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Versão do projeto com emenda - justificativa: aplicação de formulário de coleta de dados dos prontuários de pacientes no HU-UFMS para investigação de surto de infecções hematogênicas causadas por isolados resistentes aos antifúngicos azólicos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_855025_E1.pdf	18/01/2017 11:54:01		Aceito
Outros	Carta_Anuencia_prontuarios_NHUUFMS.pdf	18/01/2017 11:46:08	Gilda Maria Barbaro Del Negro	Aceito
Outros	FormularioProntuarios.pdf	18/01/2017 11:39:46	Gilda Maria Barbaro Del Negro	Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto Plataforma Brasil (assinada).pdf	06/06/2014 16:58:08		Aceito
Outros	Cadastro de Protocolo de Pesquisa CEP -FMUSP.pdf	06/06/2014 11:33:56		Aceito
Outros	Declaração Anuência - HU-USP.PDF	06/06/2014 09:36:21		Aceito
Outros	Declaração Anuência UNIFESP.pdf	06/06/2014 09:35:52		Aceito
Outros	Declaração anuência - LAC NHU UFMS.jpg	06/06/2014 09:34:27		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO DE DOUTORADO.pdf	30/05/2014 16:48:08		Aceito
Outros	Cadastro-Protocolo-Pesquisa HU-USP.pdf	30/05/2014 16:44:11		Aceito
Outros	Orcamento financeiro HU-USP.pdf	30/05/2014 16:40:55		Aceito
Outros	Cronograma de execucao HU-USP.pdf	30/05/2014 16:40:02		Aceito
Outros	Solicitacao de insencao de TCLE - HU-USP.pdf	30/05/2014 16:39:15		Aceito
Outros	Declaracao dos beneficios HU-USP.pdf	30/05/2014 16:37:11		Aceito
Outros	Declarações de Anuência CP e Infraestrutura HU-USP.pdf	30/05/2014 16:36:04		Aceito

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

continua

Anexo B - Aprovação do comitê de ética em pesquisa (conclusão)

USP - FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 1.912.028

Outros	Declaracao de confidencialidade.pdf	30/05/2014 16:35:50		Aceito
Outros	Declaracao de compromisso HU-USP.pdf	30/05/2014 16:35:35		Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 08 de Fevereiro de 2017

Assinado por:
Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

Anexo C - Alinhamento das sequências do gene *ERG11* (1.569 pb) dos isolados de *Candida parapsilosis* não suscetíveis aos azólicos com a sequência da cepa ATCC 22019. As mutações pontuais (T591C, A395T, G1193T) estão realçadas no texto

```
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                         10         20         30         40         50         60         70         80
ATCC 22019       ATGGCATTAG TTGATTTAGC CCTTCATGGG TACAACTACT TTATGACTCT TAGTACCCTT CAACAATTTG GTTTACTTGT
58 H             ATGGCATTAG TTGATTTAGC CCTTCATGGG TACAACTACT TTATGACTCT TAGTACCCTT CAACAATTTG GTTTACTTGT
87 H             ATGGCATTAG TTGATTTAGC CCTTCATGGG TACAACTACT TTATGACTCT TAGTACCCTT CAACAATTTG GTTTACTTGT
137 H            ATGGCATTAG TTGATTTAGC CCTTCATGGG TACAACTACT TTATGACTCT TAGTACCCTT CAACAATTTG GTTTACTTGT
88 H             ATGGCATTAG TTGATTTAGC CCTTCATGGG TACAACTACT TTATGACTCT TAGTACCCTT CAACAATTTG GTTTACTTGT
542 AMO          ATGGCATTAG TTGATTTAGC CCTTCATGGG TACAACTACT TTATGACTCT TAGTACCCTT CAACAATTTG GTTTACTTGT
16 PC            ATGGCATTAG TTGATTTAGC CCTTCATGGG TACAACTACT TTATGACTCT TAGTACCCTT CAACAATTTG GTTTACTTGT
340 PC           ATGGCATTAG TTGATTTAGC CCTTCATGGG TACAACTACT TTATGACTCT TAGTACCCTT CAACAATTTG GTTTACTTGT
422 PC           ATGGCATTAG TTGATTTAGC CCTTCATGGG TACAACTACT TTATGACTCT TAGTACCCTT CAACAATTTG GTTTACTTGT
29 H             ATGGCATTAG TTGATTTAGC CCTTCATGGG TACAACTACT TTATGACTCT TAGTACCCTT CAACAATTTG GTTTACTTGT
1131 PC          ATGGCATTAG TTGATTTAGC CCTTCATGGG TACAACTACT TTATGACTCT TAGTACCCTT CAACAATTTG GTTTACTTGT
233              ATGGCATTAG TTGATTTAGC CCTTCATGGG TACAACTACT TTATGACTCT TAGTACCCTT CAACAATTTG GTTTACTTGT
69155            ATGGCATTAG TTGATTTAGC CCTTCATGGG TACAACTACT TTATGACTCT TAGTACCCTT CAACAATTTG GTTTACTTGT

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                         90        100        110        120        130        140        150        160
ATCC 22019       GTTTGCTCCT TTCATTTACA ACATCATTTG GCAACTACTT TATTCACTCA GAAAAGATCG TGTTCCATTA GTATTTTATT
58 H             GTTTGCTCCT TTCATTTACA ACATCATTTG GCAACTACTT TATTCACTCA GAAAAGATCG TGTTCCATTA GTATTTTATT
87 H             GTTTGCTCCT TTCATTTACA ACATCATTTG GCAACTACTT TATTCACTCA GAAAAGATCG TGTTCCATTA GTATTTTATT
137 H            GTTTGCTCCT TTCATTTACA ACATCATTTG GCAACTACTT TATTCACTCA GAAAAGATCG TGTTCCATTA GTATTTTATT
88 H             GTTTGCTCCT TTCATTTACA ACATCATTTG GCAACTACTT TATTCACTCA GAAAAGATCG TGTTCCATTA GTATTTTATT
542 AMO          GTTTGCTCCT TTCATTTACA ACATCATTTG GCAACTACTT TATTCACTCA GAAAAGATCG TGTTCCATTA GTATTTTATT
16 PC            GTTTGCTCCT TTCATTTACA ACATCATTTG GCAACTACTT TATTCACTCA GAAAAGATCG TGTTCCATTA GTATTTTATT
340 PC           GTTTGCTCCT TTCATTTACA ACATCATTTG GCAACTACTT TATTCACTCA GAAAAGATCG TGTTCCATTA GTATTTTATT
422 PC           GTTTGCTCCT TTCATTTACA ACATCATTTG GCAACTACTT TATTCACTCA GAAAAGATCG TGTTCCATTA GTATTTTATT
29 H             GTTTGCTCCT TTCATTTACA ACATCATTTG GCAACTACTT TATTCACTCA GAAAAGATCG TGTTCCATTA GTATTTTATT
1131 PC          GTTTGCTCCT TTCATTTACA ACATCATTTG GCAACTACTT TATTCACTCA GAAAAGATCG TGTTCCATTA GTATTTTATT
233              GTTTGCTCCT TTCATTTACA ACATCATTTG GCAACTACTT TATTCACTCA GAAAAGATCG TGTTCCATTA GTATTTTATT
69155            GTTTGCTCCT TTCATTTACA ACATCATTTG GCAACTACTT TATTCACTCA GAAAAGATCG TGTTCCATTA GTATTTTATT

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        170        180        190        200        210        220        230        240
ATCC 22019       GGATTCCCTG GGTTGGTTCA GCCGTATCTT ATGGACAGGA TCCATATGGG TTTTTTGAAC AATGTCGTGA AAAATATGGT
58 H             GGATTCCCTG GGTTGGTTCA GCCGTATCTT ATGGACAGGA TCCATATGGG TTTTTTGAAC AATGTCGTGA AAAATATGGT
87 H             GGATTCCCTG GGTTGGTTCA GCCGTATCTT ATGGACAGGA TCCATATGGG TTTTTTGAAC AATGTCGTGA AAAATATGGT
137 H            GGATTCCCTG GGTTGGTTCA GCCGTATCTT ATGGACAGGA TCCATATGGG TTTTTTGAAC AATGTCGTGA AAAATATGGT
88 H             GGATTCCCTG GGTTGGTTCA GCCGTATCTT ATGGACAGGA TCCATATGGG TTTTTTGAAC AATGTCGTGA AAAATATGGT
542 AMO          GGATTCCCTG GGTTGGTTCA GCCGTATCTT ATGGACAGGA TCCATATGGG TTTTTTGAAC AATGTCGTGA AAAATATGGT
16 PC            GGATTCCCTG GGTTGGTTCA GCCGTATCTT ATGGACAGGA TCCATATGGG TTTTTTGAAC AATGTCGTGA AAAATATGGT
340 PC           GGATTCCCTG GGTTGGTTCA GCCGTATCTT ATGGACAGGA TCCATATGGG TTTTTTGAAC AATGTCGTGA AAAATATGGT
422 PC           GGATTCCCTG GGTTGGTTCA GCCGTATCTT ATGGACAGGA TCCATATGGG TTTTTTGAAC AATGTCGTGA AAAATATGGT
29 H             GGATTCCCTG GGTTGGTTCA GCCGTATCTT ATGGACAGGA TCCATATGGG TTTTTTGAAC AATGTCGTGA AAAATATGGT
1131 PC          GGATTCCCTG GGTTGGTTCA GCCGTATCTT ATGGACAGGA TCCATATGGG TTTTTTGAAC AATGTCGTGA AAAATATGGT
233              GGATTCCCTG GGTTGGTTCA GCCGTATCTT ATGGACAGGA TCCATATGGG TTTTTTGAAC AATGTCGTGA AAAATATGGT
69155            GGATTCCCTG GGTTGGTTCA GCCGTATCTT ATGGACAGGA TCCATATGGG TTTTTTGAAC AATGTCGTGA AAAATATGGT

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        250        260        270        280        290        300        310        320
ATCC 22019       GATTTATTTT CATTTGTTAT GTTGGGTAGA GTAATGACGG TGTACTTGGG TCCCAAGGGT CATGAATTTG TGTTTAATGC
58 H             GATTTATTTT CATTTGTTAT GTTGGGTAGA GTAATGACGG TGTACTTGGG TCCCAAGGGT CATGAATTTG TGTTTAATGC
87 H             GATTTATTTT CATTTGTTAT GTTGGGTAGA GTAATGACGG TGTACTTGGG TCCCAAGGGT CATGAATTTG TGTTTAATGC
137 H            GATTTATTTT CATTTGTTAT GTTGGGTAGA GTAATGACGG TGTACTTGGG TCCCAAGGGT CATGAATTTG TGTTTAATGC
88 H             GATTTATTTT CATTTGTTAT GTTGGGTAGA GTAATGACGG TGTACTTGGG TCCCAAGGGT CATGAATTTG TGTTTAATGC
542 AMO          GATTTATTTT CATTTGTTAT GTTGGGTAGA GTAATGACGG TGTACTTGGG TCCCAAGGGT CATGAATTTG TGTTTAATGC
16 PC            GATTTATTTT CATTTGTTAT GTTGGGTAGA GTAATGACGG TGTACTTGGG TCCCAAGGGT CATGAATTTG TGTTTAATGC
340 PC           GATTTATTTT CATTTGTTAT GTTGGGTAGA GTAATGACGG TGTACTTGGG TCCCAAGGGT CATGAATTTG TGTTTAATGC
422 PC           GATTTATTTT CATTTGTTAT GTTGGGTAGA GTAATGACGG TGTACTTGGG TCCCAAGGGT CATGAATTTG TGTTTAATGC
29 H             GATTTATTTT CATTTGTTAT GTTGGGTAGA GTAATGACGG TGTACTTGGG TCCCAAGGGT CATGAATTTG TGTTTAATGC
1131 PC          GATTTATTTT CATTTGTTAT GTTGGGTAGA GTAATGACGG TGTACTTGGG TCCCAAGGGT CATGAATTTG TGTTTAATGC
233              GATTTATTTT CATTTGTTAT GTTGGGTAGA GTAATGACGG TGTACTTGGG TCCCAAGGGT CATGAATTTG TGTTTAATGC
69155            GATTTATTTT CATTTGTTAT GTTGGGTAGA GTAATGACGG TGTACTTGGG TCCCAAGGGT CATGAATTTG TGTTTAATGC
```

continua

Anexo C - Alinhamento das sequências do gene *ERG11* (1.569 pb) dos isolados de *Candida parapsilosis* não suscetíveis aos azólicos com a sequência da cepa ATCC 22019. As mutações pontuais (T591C, A395T, G1193T) estão realçadas no texto (continuação)

```
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        330        340        350        360        370        380        390        400
ATCC 22019      TAAATTGTCT GATGTTTCTG CTGAAGACGC CTATCAACAT TTGACTACCC CTGTTTTTGG AAAAGGTGTT ATTTACGATT
58 H            TAAATTGTCT GATGTTTCTG CTGAAGACGC CTATCAACAT TTGACTACCC CTGTTTTTGG AAAAGGTGTT ATTTACGATT
87 H            TAAATTGTCT GATGTTTCTG CTGAAGACGC CTATCAACAT TTGACTACCC CTGTTTTTGG AAAAGGTGTT ATTTTCGATT
137 H           TAAATTGTCT GATGTTTCTG CTGAAGACGC CTATCAACAT TTGACTACCC CTGTTTTTGG AAAAGGTGTT ATTTTCGATT
88 H            TAAATTGTCT GATGTTTCTG CTGAAGACGC CTATCAACAT TTGACTACCC CTGTTTTTGG AAAAGGTGTT ATTTTCGATT
542 AMO         TAAATTGTCT GATGTTTCTG CTGAAGACGC CTATCAACAT TTGACTACCC CTGTTTTTGG AAAAGGTGTT ATTTTCGATT
16 PC           TAAATTGTCT GATGTTTCTG CTGAAGACGC CTATCAACAT TTGACTACCC CTGTTTTTGG AAAAGGTGTT ATTTTCGATT
340 PC          TAAATTGTCT GATGTTTCTG CTGAAGACGC CTATCAACAT TTGACTACCC CTGTTTTTGG AAAAGGTGTT ATTTTCGATT
422 PC          TAAATTGTCT GATGTTTCTG CTGAAGACGC CTATCAACAT TTGACTACCC CTGTTTTTGG AAAAGGTGTT ATTTACGATT
29 H            TAAATTGTCT GATGTTTCTG CTGAAGACGC CTATCAACAT TTGACTACCC CTGTTTTTGG AAAAGGTGTT ATTTACGATT
1131 PC         TAAATTGTCT GATGTTTCTG CTGAAGACGC CTATCAACAT TTGACTACCC CTGTTTTTGG AAAAGGTGTT ATTTTCGATT
233             TAAATTGTCT GATGTTTCTG CTGAAGACGC CTATCAACAT TTGACTACCC CTGTTTTTGG AAAAGGTGTT ATTTACGATT
69155           TAAATTGTCT GATGTTTCTG CTGAAGACGC CTATCAACAT TTGACTACCC CTGTTTTTGG AAAAGGTGTT ATTTACGATT

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        410        420        430        440        450        460        470        480
ATCC 22019      GTCCGAATGC AAGACTTATG GAGCAAAAGA AGTTCGCAAA GACCGCATTG ACTACCGATT CTTTTAGAAG ATACGTGCCA
58 H            GTCCGAATGC AAGACTTATG GAGCAAAAGA AGTTCGCAAA GACCGCATTG ACTACCGATT CTTTTAGAAG ATACGTGCCA
87 H            GTCCGAATGC AAGACTTATG GAGCAAAAGA AGTTCGCAAA GACCGCATTG ACTACCGATT CTTTTAGAAG ATACGTGCCA
137 H           GTCCGAATGC AAGACTTATG GAGCAAAAGA AGTTCGCAAA GACCGCATTG ACTACCGATT CTTTTAGAAG ATACGTGCCA
88 H            GTCCGAATGC AAGACTTATG GAGCAAAAGA AGTTCGCAAA GACCGCATTG ACTACCGATT CTTTTAGAAG ATACGTGCCA
542 AMO         GTCCGAATGC AAGACTTATG GAGCAAAAGA AGTTCGCAAA GACCGCATTG ACTACCGATT CTTTTAGAAG ATACGTGCCA
16 PC           GTCCGAATGC AAGACTTATG GAGCAAAAGA AGTTCGCAAA GACCGCATTG ACTACCGATT CTTTTAGAAG ATACGTGCCA
340 PC          GTCCGAATGC AAGACTTATG GAGCAAAAGA AGTTCGCAAA GACCGCATTG ACTACCGATT CTTTTAGAAG ATACGTGCCA
422 PC          GTCCGAATGC AAGACTTATG GAGCAAAAGA AGTTCGCAAA GACCGCATTG ACTACCGATT CTTTTAGAAG ATACGTGCCA
29 H            GTCCGAATGC AAGACTTATG GAGCAAAAGA AGTTCGCAAA GACCGCATTG ACTACCGATT CTTTTAGAAG ATACGTGCCA
1131 PC         GTCCGAATGC AAGACTTATG GAGCAAAAGA AGTTCGCAAA GACCGCATTG ACTACCGATT CTTTTAGAAG ATACGTGCCA
233             GTCCGAATGC AAGACTTATG GAGCAAAAGA AGTTCGCAAA GACCGCATTG ACTACCGATT CTTTTAGAAG ATACGTGCCA
69155           GTCCGAATGC AAGACTTATG GAGCAAAAGA AGTTCGCAAA GACCGCATTG ACTACCGATT CTTTTAGAAG ATACGTGCCA

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        490        500        510        520        530        540        550        560
ATCC 22019      TTGATTAGAG GGGAAATTTT GGATTATTTT ACCAAATCTA AGGTGTTCAA TATGAAGAAA CAGAAAAGTG GCGTTGTTGA
58 H            TTGATTAGAG GGGAAATTTT GGATTATTTT ACCAAATCTA AGGTGTTCAA TATGAAGAAA CAGAAAAGTG GCGTTGTTGA
87 H            TTGATTAGAG GGGAAATTTT GGATTATTTT ACCAAATCTA AGGTGTTCAA TATGAAGAAA CAGAAAAGTG GCGTTGTTGA
137 H           TTGATTAGAG GGGAAATTTT GGATTATTTT ACCAAATCTA AGGTGTTCAA TATGAAGAAA CAGAAAAGTG GCGTTGTTGA
88 H            TTGATTAGAG GGGAAATTTT GGATTATTTT ACCAAATCTA AGGTGTTCAA TATGAAGAAA CAGAAAAGTG GCGTTGTTGA
542 AMO         TTGATTAGAG GGGAAATTTT GGATTATTTT ACCAAATCTA AGGTGTTCAA TATGAAGAAA CAGAAAAGTG GCGTTGTTGA
16 PC           TTGATTAGAG GGGAAATTTT GGATTATTTT ACCAAATCTA AGGTGTTCAA TATGAAGAAA CAGAAAAGTG GCGTTGTTGA
340 PC          TTGATTAGAG GGGAAATTTT GGATTATTTT ACCAAATCTA AGGTGTTCAA TATGAAGAAA CAGAAAAGTG GCGTTGTTGA
422 PC          TTGATTAGAG GGGAAATTTT GGATTATTTT ACCAAATCTA AGGTGTTCAA TATGAAGAAA CAGAAAAGTG GCGTTGTTGA
29 H            TTGATTAGAG GGGAAATTTT GGATTATTTT ACCAAATCTA AGGTGTTCAA TATGAAGAAA CAGAAAAGTG GCGTTGTTGA
1131 PC         TTGATTAGAG GGGAAATTTT GGATTATTTT ACCAAATCTA AGGTGTTCAA TATGAAGAAA CAGAAAAGTG GCGTTGTTGA
233             TTGATTAGAG GGGAAATTTT GGATTATTTT ACCAAATCTA AGGTGTTCAA TATGAAGAAA CAGAAAAGTG GCGTTGTTGA
69155           TTGATTAGAG GGGAAATTTT GGATTATTTT ACCAAATCTA AGGTGTTCAA TATGAAGAAA CAGAAAAGTG GCGTTGTTGA

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        570        580        590        600        610        620        630        640
ATCC 22019      TGTATTGCAA TCACAACCAG AAATAACCAT TTTCACTGCA TCTAGATCCT TATTAGGAGA AGCAATGAGG AAAAGATTTG
58 H            TGTATTGCAA TCACAACCAG AAATAACCAT CTTCACTGCA TCTAGATCCT TATTAGGAGA AGCAATGAGG AAAAGATTTG
87 H            TGTATTGCAA TCACAACCAG AAATAACCAT CTTCACTGCA TCTAGATCCT TATTAGGAGA AGCAATGAGG AAAAGATTTG
137 H           TGTATTGCAA TCACAACCAG AAATAACCAT CTTCACTGCA TCTAGATCCT TATTAGGAGA AGCAATGAGG AAAAGATTTG
88 H            TGTATTGCAA TCACAACCAG AAATAACCAT CTTCACTGCA TCTAGATCCT TATTAGGAGA AGCAATGAGG AAAAGATTTG
542 AMO         TGTATTGCAA TCACAACCAG AAATAACCAT CTTCACTGCA TCTAGATCCT TATTAGGAGA AGCAATGAGG AAAAGATTTG
16 PC           TGTATTGCAA TCACAACCAG AAATAACCAT CTTCACTGCA TCTAGATCCT TATTAGGAGA AGCAATGAGG AAAAGATTTG
340 PC          TGTATTGCAA TCACAACCAG AAATAACCAT CTTCACTGCA TCTAGATCCT TATTAGGAGA AGCAATGAGG AAAAGATTTG
422 PC          TGTATTGCAA TCACAACCAG AAATAACCAT CTTCACTGCA TCTAGATCCT TATTAGGAGA AGCAATGAGG AAAAGATTTG
29 H            TGTATTGCAA TCACAACCAG AAATAACCAT CTTCACTGCA TCTAGATCCT TATTAGGAGA AGCAATGAGG AAAAGATTTG
1131 PC         TGTATTGCAA TCACAACCAG AAATAACCAT CTTCACTGCA TCTAGATCCT TATTAGGAGA AGCAATGAGG AAAAGATTTG
233             TGTATTGCAA TCACAACCAG AAATAACCAT CTTCACTGCA TCTAGATCCT TATTAGGAGA AGCAATGAGG AAAAGATTTG
69155           TGTATTGCAA TCACAACCAG AAATAACCAT CTTCACTGCA TCTAGATCCT TATTAGGAGA AGCAATGAGG AAAAGATTTG
```

continua

Anexo C - Alinhamento das sequências do gene *ERG11* (1.569 pb) dos isolados de *Candida parapsilosis* não suscetíveis aos azólicos com a sequência da cepa ATCC 22019. As mutações pontuais (T591C, A395T, G1193T) estão realçadas no texto (continuação)

```
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                         650        660        670        680        690        700        710        720
ATCC 22019       ATGCTTCATT TGCTCAATTG TATGCTGATT TAGATAAAGG ATTCACCCCA ATCAATTTTG TTTTCCCACA CTTGCCATTA
58 H             ATGCTTCATT TGCTCAATTG TATGCTGATT TAGATAAAGG ATTCACCCCA ATCAATTTTG TTTTCCCACA CTTGCCATTA
87 H             ATGCTTCATT TGCTCAATTG TATGCTGATT TAGATAAAGG ATTCACCCCA ATCAATTTTG TTTTCCCACA CTTGCCATTA
137 H            ATGCTTCATT TGCTCAATTG TATGCTGATT TAGATAAAGG ATTCACCCCA ATCAATTTTG TTTTCCCACA CTTGCCATTA
88 H             ATGCTTCATT TGCTCAATTG TATGCTGATT TAGATAAAGG ATTCACCCCA ATCAATTTTG TTTTCCCACA CTTGCCATTA
542 AMO          ATGCTTCATT TGCTCAATTG TATGCTGATT TAGATAAAGG ATTCACCCCA ATCAATTTTG TTTTCCCACA CTTGCCATTA
16 PC            ATGCTTCATT TGCTCAATTG TATGCTGATT TAGATAAAGG ATTCACCCCA ATCAATTTTG TTTTCCCACA CTTGCCATTA
340 PC           ATGCTTCATT TGCTCAATTG TATGCTGATT TAGATAAAGG ATTCACCCCA ATCAATTTTG TTTTCCCACA CTTGCCATTA
422 PC           ATGCTTCATT TGCTCAATTG TATGCTGATT TAGATAAAGG ATTCACCCCA ATCAATTTTG TTTTCCCACA CTTGCCATTA
29 H             ATGCTTCATT TGCTCAATTG TATGCTGATT TAGATAAAGG ATTCACCCCA ATCAATTTTG TTTTCCCACA CTTGCCATTA
1131 PC          ATGCTTCATT TGCTCAATTG TATGCTGATT TAGATAAAGG ATTCACCCCA ATCAATTTTG TTTTCCCACA CTTGCCATTA
233              ATGCTTCATT TGCTCAATTG TATGCTGATT TAGATAAAGG ATTCACCCCA ATCAATTTTG TTTTCCCACA CTTGCCATTA
69155            ATGCTTCATT TGCTCAATTG TATGCTGATT TAGATAAAGG ATTCACCCCA ATCAATTTTG TTTTCCCACA CTTGCCATTA

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                         730        740        750        760        770        780        790        800
ATCC 22019       CCTCATTATT GGAAACGTGA TGCTGCGCAA CAAAAGATTT CTGAAACGTA TATGACAGAG ATTGCTAGAA GAAGAGAGAC
58 H             CCTCATTATT GGAAACGTGA TGCTGCGCAA CAAAAGATTT CTGAAACGTA TATGACAGAG ATTGCTAGAA GAAGAGAGAC
87 H             CCTCATTATT GGAAACGTGA TGCTGCGCAA CAAAAGATTT CTGAAACGTA TATGACAGAG ATTGCTAGAA GAAGAGAGAC
137 H            CCTCATTATT GGAAACGTGA TGCTGCGCAA CAAAAGATTT CTGAAACGTA TATGACAGAG ATTGCTAGAA GAAGAGAGAC
88 H             CCTCATTATT GGAAACGTGA TGCTGCGCAA CAAAAGATTT CTGAAACGTA TATGACAGAG ATTGCTAGAA GAAGAGAGAC
542 AMO          CCTCATTATT GGAAACGTGA TGCTGCGCAA CAAAAGATTT CTGAAACGTA TATGACAGAG ATTGCTAGAA GAAGAGAGAC
16 PC            CCTCATTATT GGAAACGTGA TGCTGCGCAA CAAAAGATTT CTGAAACGTA TATGACAGAG ATTGCTAGAA GAAGAGAGAC
340 PC           CCTCATTATT GGAAACGTGA TGCTGCGCAA CAAAAGATTT CTGAAACGTA TATGACAGAG ATTGCTAGAA GAAGAGAGAC
422 PC           CCTCATTATT GGAAACGTGA TGCTGCGCAA CAAAAGATTT CTGAAACGTA TATGACAGAG ATTGCTAGAA GAAGAGAGAC
29 H             CCTCATTATT GGAAACGTGA TGCTGCGCAA CAAAAGATTT CTGAAACGTA TATGACAGAG ATTGCTAGAA GAAGAGAGAC
1131 PC          CCTCATTATT GGAAACGTGA TGCTGCGCAA CAAAAGATTT CTGAAACGTA TATGACAGAG ATTGCTAGAA GAAGAGAGAC
233              CCTCATTATT GGAAACGTGA TGCTGCGCAA CAAAAGATTT CTGAAACGTA TATGACAGAG ATTGCTAGAA GAAGAGAGAC
69155            CCTCATTATT GGAAACGTGA TGCTGCGCAA CAAAAGATTT CTGAAACGTA TATGACAGAG ATTGCTAGAA GAAGAGAGAC

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                         810        820        830        840        850        860        870        880
ATCC 22019       GGGTGACATT GATGAAAATC GTGATTTAAT CGATTCTTTA TTGGTAAACT CTACATACAA AGATGGTGTT AAAATGACTG
58 H             GGGTGACATT GATGAAAATC GTGATTTAAT CGATTCTTTA TTGGTAAACT CTACATACAA AGATGGTGTT AAAATGACTG
87 H             GGGTGACATT GATGAAAATC GTGATTTAAT CGATTCTTTA TTGGTAAACT CTACATACAA AGATGGTGTT AAAATGACTG
137 H            GGGTGACATT GATGAAAATC GTGATTTAAT CGATTCTTTA TTGGTAAACT CTACATACAA AGATGGTGTT AAAATGACTG
88 H             GGGTGACATT GATGAAAATC GTGATTTAAT CGATTCTTTA TTGGTAAACT CTACATACAA AGATGGTGTT AAAATGACTG
542 AMO          GGGTGACATT GATGAAAATC GTGATTTAAT CGATTCTTTA TTGGTAAACT CTACATACAA AGATGGTGTT AAAATGACTG
16 PC            GGGTGACATT GATGAAAATC GTGATTTAAT CGATTCTTTA TTGGTAAACT CTACATACAA AGATGGTGTT AAAATGACTG
340 PC           GGGTGACATT GATGAAAATC GTGATTTAAT CGATTCTTTA TTGGTAAACT CTACATACAA AGATGGTGTT AAAATGACTG
422 PC           GGGTGACATT GATGAAAATC GTGATTTAAT CGATTCTTTA TTGGTAAACT CTACATACAA AGATGGTGTT AAAATGACTG
29 H             GGGTGACATT GATGAAAATC GTGATTTAAT CGATTCTTTA TTGGTAAACT CTACATACAA AGATGGTGTT AAAATGACTG
1131 PC          GGGTGACATT GATGAAAATC GTGATTTAAT CGATTCTTTA TTGGTAAACT CTACATACAA AGATGGTGTT AAAATGACTG
233              GGGTGACATT GATGAAAATC GTGATTTAAT CGATTCTTTA TTGGTAAACT CTACATACAA AGATGGTGTT AAAATGACTG
69155            GGGTGACATT GATGAAAATC GTGATTTAAT CGATTCTTTA TTGGTAAACT CTACATACAA AGATGGTGTT AAAATGACTG

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                         890        900        910        920        930        940        950        960
ATCC 22019       ATCAGGAAAT TGCTAACTTG TTGATTGGTG TTTTGATGGG AGGACAGCAT ACTAGTGCCA CTACATCTGC TTGGTTTTTG
58 H             ATCAGGAAAT TGCTAACTTG TTGATTGGTG TTTTGATGGG AGGACAGCAT ACTAGTGCCA CTACATCTGC TTGGTTTTTG
87 H             ATCAGGAAAT TGCTAACTTG TTGATTGGTG TTTTGATGGG AGGACAGCAT ACTAGTGCCA CTACATCTGC TTGGTTTTTG
137 H            ATCAGGAAAT TGCTAACTTG TTGATTGGTG TTTTGATGGG AGGACAGCAT ACTAGTGCCA CTACATCTGC TTGGTTTTTG
88 H             ATCAGGAAAT TGCTAACTTG TTGATTGGTG TTTTGATGGG AGGACAGCAT ACTAGTGCCA CTACATCTGC TTGGTTTTTG
542 AMO          ATCAGGAAAT TGCTAACTTG TTGATTGGTG TTTTGATGGG AGGACAGCAT ACTAGTGCCA CTACATCTGC TTGGTTTTTG
16 PC            ATCAGGAAAT TGCTAACTTG TTGATTGGTG TTTTGATGGG AGGACAGCAT ACTAGTGCCA CTACATCTGC TTGGTTTTTG
340 PC           ATCAGGAAAT TGCTAACTTG TTGATTGGTG TTTTGATGGG AGGACAGCAT ACTAGTGCCA CTACATCTGC TTGGTTTTTG
422 PC           ATCAGGAAAT TGCTAACTTG TTGATTGGTG TTTTGATGGG AGGACAGCAT ACTAGTGCCA CTACATCTGC TTGGTTTTTG
29 H             ATCAGGAAAT TGCTAACTTG TTGATTGGTG TTTTGATGGG AGGACAGCAT ACTAGTGCCA CTACATCTGC TTGGTTTTTG
1131 PC          ATCAGGAAAT TGCTAACTTG TTGATTGGTG TTTTGATGGG AGGACAGCAT ACTAGTGCCA CTACATCTGC TTGGTTTTTG
233              ATCAGGAAAT TGCTAACTTG TTGATTGGTG TTTTGATGGG AGGACAGCAT ACTAGTGCCA CTACATCTGC TTGGTTTTTG
69155            ATCAGGAAAT TGCTAACTTG TTGATTGGTG TTTTGATGGG AGGACAGCAT ACTAGTGCCA CTACATCTGC TTGGTTTTTG
```

continua

Anexo C - Alinhamento das sequências do gene *ERG11* (1.569 pb) dos isolados de *Candida parapsilosis* não suscetíveis aos azólicos com a sequência da cepa ATCC 22019. As mutações pontuais (T591C, A395T, G1193T) estão realçadas no texto (continuação)

```
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        970        980        990       1000       1010       1020       1030       1040
ATCC 22019      TTGCATTTGG CTGAGAAGCC ACAATTACAA GATGAATTGT ATCAAGAGGT TCTTAATGCC TTATCTGGTA AAGGTGGCAA
58 H            TTGCATTTGG CTGAGAAGCC ACAATTACAA GATGAATTGT ATCAAGAGGT TCTTAATGCC TTATCTGGTA AAGGTGGCAA
87 H            TTGCATTTGG CTGAGAAGCC ACAATTACAA GATGAATTGT ATCAAGAGGT TCTTAATGCC TTATCTGGTA AAGGTGGCAA
137 H           TTGCATTTGG CTGAGAAGCC ACAATTACAA GATGAATTGT ATCAAGAGGT TCTTAATGCC TTATCTGGTA AAGGTGGCAA
88 H            TTGCATTTGG CTGAGAAGCC ACAATTACAA GATGAATTGT ATCAAGAGGT TCTTAATGCC TTATCTGGTA AAGGTGGCAA
542 AMO         TTGCATTTGG CTGAGAAGCC ACAATTACAA GATGAATTGT ATCAAGAGGT TCTTAATGCC TTATCTGGTA AAGGTGGCAA
16 PC           TTGCATTTGG CTGAGAAGCC ACAATTACAA GATGAATTGT ATCAAGAGGT TCTTAATGCC TTATCTGGTA AAGGTGGCAA
340 PC          TTGCATTTGG CTGAGAAGCC ACAATTACAA GATGAATTGT ATCAAGAGGT TCTTAATGCC TTATCTGGTA AAGGTGGCAA
422 PC          TTGCATTTGG CTGAGAAGCC ACAATTACAA GATGAATTGT ATCAAGAGGT TCTTAATGCC TTATCTGGTA AAGGTGGCAA
29 H            TTGCATTTGG CTGAGAAGCC ACAATTACAA GATGAATTGT ATCAAGAGGT TCTTAATGCC TTATCTGGTA AAGGTGGCAA
1131 PC         TTGCATTTGG CTGAGAAGCC ACAATTACAA GATGAATTGT ATCAAGAGGT TCTTAATGCC TTATCTGGTA AAGGTGGCAA
233             TTGCATTTGG CTGAGAAGCC ACAATTACAA GATGAATTGT ATCAAGAGGT TCTTAATGCC TTATCTGGTA AAGGTGGCAA
69155           TTGCATTTGG CTGAGAAGCC ACAATTACAA GATGAATTGT ATCAAGAGGT TCTTAATGCC TTATCTGGTA AAGGTGGCAA

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                       1050       1060       1070       1080       1090       1100       1110       1120
ATCC 22019      CTTGGATGAT TTATCGTATG AGGATTTGCA ACAAATGCCA TTGGTTAACA ACACCATCAA GGAAACCCTC AGATTACACA
58 H            CTTGGATGAT TTATCGTATG AGGATTTGCA ACAAATGCCA TTGGTTAACA ACACCATCAA GGAAACCCTC AGATTACACA
87 H            CTTGGATGAT TTATCGTATG AGGATTTGCA ACAAATGCCA TTGGTTAACA ACACCATCAA GGAAACCCTC AGATTACACA
137 H           CTTGGATGAT TTATCGTATG AGGATTTGCA ACAAATGCCA TTGGTTAACA ACACCATCAA GGAAACCCTC AGATTACACA
88 H            CTTGGATGAT TTATCGTATG AGGATTTGCA ACAAATGCCA TTGGTTAACA ACACCATCAA GGAAACCCTC AGATTACACA
542 AMO         CTTGGATGAT TTATCGTATG AGGATTTGCA ACAAATGCCA TTGGTTAACA ACACCATCAA GGAAACCCTC AGATTACACA
16 PC           CTTGGATGAT TTATCGTATG AGGATTTGCA ACAAATGCCA TTGGTTAACA ACACCATCAA GGAAACCCTC AGATTACACA
340 PC          CTTGGATGAT TTATCGTATG AGGATTTGCA ACAAATGCCA TTGGTTAACA ACACCATCAA GGAAACCCTC AGATTACACA
422 PC          CTTGGATGAT TTATCGTATG AGGATTTGCA ACAAATGCCA TTGGTTAACA ACACCATCAA GGAAACCCTC AGATTACACA
29 H            CTTGGATGAT TTATCGTATG AGGATTTGCA ACAAATGCCA TTGGTTAACA ACACCATCAA GGAAACCCTC AGATTACACA
1131 PC         CTTGGATGAT TTATCGTATG AGGATTTGCA ACAAATGCCA TTGGTTAACA ACACCATCAA GGAAACCCTC AGATTACACA
233             CTTGGATGAT TTATCGTATG AGGATTTGCA ACAAATGCCA TTGGTTAACA ACACCATCAA GGAAACCCTC AGATTACACA
69155           CTTGGATGAT TTATCGTATG AGGATTTGCA ACAAATGCCA TTGGTTAACA ACACCATCAA GGAAACCCTC AGATTACACA

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                       1130       1140       1150       1160       1170       1180       1190       1200
ATCC 22019      TGCCATTACA TTCCATATTC AGAAAAGTTG TTTCTCCCTT GGTTGTGCCA AACACAAAGT ATATTGTCCC TAGAGGACAC
58 H            TGCCATTACA TTCCATATTC AGAAAAGTTG TTTCTCCCTT GGTTGTGCCA AACACAAAGT ATATTGTCCC TAGAGGACAC
87 H            TGCCATTACA TTCCATATTC AGAAAAGTTG TTTCTCCCTT GGTTGTGCCA AACACAAAGT ATATTGTCCC TAGAGGACAC
137 H           TGCCATTACA TTCCATATTC AGAAAAGTTG TTTCTCCCTT GGTTGTGCCA AACACAAAGT ATATTGTCCC TAGAGGACAC
88 H            TGCCATTACA TTCCATATTC AGAAAAGTTG TTTCTCCCTT GGTTGTGCCA AACACAAAGT ATATTGTCCC TAGAGGACAC
542 AMO         TGCCATTACA TTCCATATTC AGAAAAGTTG TTTCTCCCTT GGTTGTGCCA AACACAAAGT ATATTGTCCC TAGAGGACAC
16 PC           TGCCATTACA TTCCATATTC AGAAAAGTTG TTTCTCCCTT GGTTGTGCCA AACACAAAGT ATATTGTCCC TAGAGGACAC
340 PC          TGCCATTACA TTCCATATTC AGAAAAGTTG TTTCTCCCTT GGTTGTGCCA AACACAAAGT ATATTGTCCC TAGAGGACAC
422 PC          TGCCATTACA TTCCATATTC AGAAAAGTTG TTTCTCCCTT GGTTGTGCCA AACACAAAGT ATATTGTCCC TAGAGGACAC
29 H            TGCCATTACA TTCCATATTC AGAAAAGTTG TTTCTCCCTT GGTTGTGCCA AACACAAAGT ATATTGTCCC TAGAGGACAC
1131 PC         TGCCATTACA TTCCATATTC AGAAAAGTTG TTTCTCCCTT GGTTGTGCCA AACACAAAGT ATATTGTCCC TAGAGGACAC
233             TGCCATTACA TTCCATATTC AGAAAAGTTG TTTCTCCCTT GGTTGTGCCA AACACAAAGT ATATTGTCCC TAGAGGACAC
69155           TGCCATTACA TTCCATATTC AGAAAAGTTG TTTCTCCCTT GGTTGTGCCA AACACAAAGT ATATTGTCCC TATAGGACAC

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                       1210       1220       1230       1240       1250       1260       1270       1280
ATCC 22019      CACGTATTGG TGTCACCAGG TTATGCTCAT ACAAACGAAA GATTTTACAA GGACGCATCT GATTTCAACC CTCACAGATG
58 H            CACGTATTGG TGTCACCAGG TTATGCTCAT ACAAACGAAA GATTTTACAA GGACGCATCT GATTTCAACC CTCACAGATG
87 H            CACGTATTGG TGTCACCAGG TTATGCTCAT ACAAACGAAA GATTTTACAA GGACGCATCT GATTTCAACC CTCACAGATG
137 H           CACGTATTGG TGTCACCAGG TTATGCTCAT ACAAACGAAA GATTTTACAA GGACGCATCT GATTTCAACC CTCACAGATG
88 H            CACGTATTGG TGTCACCAGG TTATGCTCAT ACAAACGAAA GATTTTACAA GGACGCATCT GATTTCAACC CTCACAGATG
542 AMO         CACGTATTGG TGTCACCAGG TTATGCTCAT ACAAACGAAA GATTTTACAA GGACGCATCT GATTTCAACC CTCACAGATG
16 PC           CACGTATTGG TGTCACCAGG TTATGCTCAT ACAAACGAAA GATTTTACAA GGACGCATCT GATTTCAACC CTCACAGATG
340 PC          CACGTATTGG TGTCACCAGG TTATGCTCAT ACAAACGAAA GATTTTACAA GGACGCATCT GATTTCAACC CTCACAGATG
422 PC          CACGTATTGG TGTCACCAGG TTATGCTCAT ACAAACGAAA GATTTTACAA GGACGCATCT GATTTCAACC CTCACAGATG
29 H            CACGTATTGG TGTCACCAGG TTATGCTCAT ACAAACGAAA GATTTTACAA GGACGCATCT GATTTCAACC CTCACAGATG
1131 PC         CACGTATTGG TGTCACCAGG TTATGCTCAT ACAAACGAAA GATTTTACAA GGACGCATCT GATTTCAACC CTCACAGATG
233             CACGTATTGG TGTCACCAGG TTATGCTCAT ACAAACGAAA GATTTTACAA GGACGCATCT GATTTCAACC CTCACAGATG
69155           CACGTATTGG TGTCACCAGG TTATGCTCAT ACAAACGAAA GATTTTACAA GGACGCATCT GATTTCAACC CTCACAGATG
```

continua

Anexo C - Alinhamento das sequências do gene *ERG11* (1.569 pb) dos isolados de *Candida parapsilosis* não suscetíveis aos azólicos com a sequência da cepa ATCC 22019. As mutações pontuais (T591C, A395T, G1193T) estão realçadas no texto (conclusão)

```
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        1290       1300       1310       1320       1330       1340       1350       1360
ATCC 22019      GGATGAATCA GCATCCACCA ATGACGCAGG TGAAGTTGAT TATGGATTTG GTAAAGTTTC CAAAGGTGTT AGCTCTTCGT
58 H            GGATGAATCA GCATCCACCA ATGACGCAGG TGAAGTTGAT TATGGATTTG GTAAAGTTTC CAAAGGTGTT AGCTCTTCGT
87 H            GGATGAATCA GCATCCACCA ATGACGCAGG TGAAGTTGAT TATGGATTTG GTAAAGTTTC CAAAGGTGTT AGCTCTTCGT
137 H           GGATGAATCA GCATCCACCA ATGACGCAGG TGAAGTTGAT TATGGATTTG GTAAAGTTTC CAAAGGTGTT AGCTCTTCGT
88 H            GGATGAATCA GCATCCACCA ATGACGCAGG TGAAGTTGAT TATGGATTTG GTAAAGTTTC CAAAGGTGTT AGCTCTTCGT
542 AMO         GGATGAATCA GCATCCACCA ATGACGCAGG TGAAGTTGAT TATGGATTTG GTAAAGTTTC CAAAGGTGTT AGCTCTTCGT
16 PC           GGATGAATCA GCATCCACCA ATGACGCAGG TGAAGTTGAT TATGGATTTG GTAAAGTTTC CAAAGGTGTT AGCTCTTCGT
340 PC          GGATGAATCA GCATCCACCA ATGACGCAGG TGAAGTTGAT TATGGATTTG GTAAAGTTTC CAAAGGTGTT AGCTCTTCGT
422 PC          GGATGAATCA GCATCCACCA ATGACGCAGG TGAAGTTGAT TATGGATTTG GTAAAGTTTC CAAAGGTGTT AGCTCTTCGT
29 H            GGATGAATCA GCATCCACCA ATGACGCAGG TGAAGTTGAT TATGGATTTG GTAAAGTTTC CAAAGGTGTT AGCTCTTCGT
1131 PC         GGATGAATCA GCATCCACCA ATGACGCAGG TGAAGTTGAT TATGGATTTG GTAAAGTTTC CAAAGGTGTT AGCTCTTCGT
233             GGATGAATCA GCATCCACCA ATGACGCAGG TGAAGTTGAT TATGGATTTG GTAAAGTTTC CAAAGGTGTT AGCTCTTCGT
69155           GGATGAATCA GCATCCACCA ATGACGCAGG TGAAGTTGAT TATGGATTTG GTAAAGTTTC CAAAGGTGTT AGCTCTTCGT

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        1370       1380       1390       1400       1410       1420       1430       1440
ATCC 22019      ATTTGCCATT TGGTGGTGGA AGACATAGAT GTATTGGTGA ACAGTTTGCC TATGTCCAAT TGGGAACAAT CTTGACCACA
58 H            ATTTGCCATT TGGTGGTGGA AGACATAGAT GTATTGGTGA ACAGTTTGCC TATGTCCAAT TGGGAACAAT CTTGACCACA
87 H            ATTTGCCATT TGGTGGTGGA AGACATAGAT GTATTGGTGA ACAGTTTGCC TATGTCCAAT TGGGAACAAT CTTGACCACA
137 H           ATTTGCCATT TGGTGGTGGA AGACATAGAT GTATTGGTGA ACAGTTTGCC TATGTCCAAT TGGGAACAAT CTTGACCACA
88 H            ATTTGCCATT TGGTGGTGGA AGACATAGAT GTATTGGTGA ACAGTTTGCC TATGTCCAAT TGGGAACAAT CTTGACCACA
542 AMO         ATTTGCCATT TGGTGGTGGA AGACATAGAT GTATTGGTGA ACAGTTTGCC TATGTCCAAT TGGGAACAAT CTTGACCACA
16 PC           ATTTGCCATT TGGTGGTGGA AGACATAGAT GTATTGGTGA ACAGTTTGCC TATGTCCAAT TGGGAACAAT CTTGACCACA
340 PC          ATTTGCCATT TGGTGGTGGA AGACATAGAT GTATTGGTGA ACAGTTTGCC TATGTCCAAT TGGGAACAAT CTTGACCACA
422 PC          ATTTGCCATT TGGTGGTGGA AGACATAGAT GTATTGGTGA ACAGTTTGCC TATGTCCAAT TGGGAACAAT CTTGACCACA
29 H            ATTTGCCATT TGGTGGTGGA AGACATAGAT GTATTGGTGA ACAGTTTGCC TATGTCCAAT TGGGAACAAT CTTGACCACA
1131 PC         ATTTGCCATT TGGTGGTGGA AGACATAGAT GTATTGGTGA ACAGTTTGCC TATGTCCAAT TGGGAACAAT CTTGACCACA
233             ATTTGCCATT TGGTGGTGGA AGACATAGAT GTATTGGTGA ACAGTTTGCC TATGTCCAAT TGGGAACAAT CTTGACCACA
69155           ATTTGCCATT TGGTGGTGGA AGACATAGAT GTATTGGTGA ACAGTTTGCC TATGTCCAAT TGGGAACAAT CTTGACCACA

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        1450       1460       1470       1480       1490       1500       1510       1520
ATCC 22019      TTTGTTTATA ATCTTAAATG GAAATTGGCA AATGGTAAAG TGCCTGATGT TGATTATACT TCAATGGTTA CGTTACCTCA
58 H            TTTGTTTATA ATCTTAAATG GAAATTGGCA AATGGTAAAG TGCCTGATGT TGATTATACT TCAATGGTTA CGTTACCTCA
87 H            TTTGTTTATA ATCTTAAATG GAAATTGGCA AATGGTAAAG TGCCTGATGT TGATTATACT TCAATGGTTA CGTTACCTCA
137 H           TTTGTTTATA ATCTTAAATG GAAATTGGCA AATGGTAAAG TGCCTGATGT TGATTATACT TCAATGGTTA CGTTACCTCA
88 H            TTTGTTTATA ATCTTAAATG GAAATTGGCA AATGGTAAAG TGCCTGATGT TGATTATACT TCAATGGTTA CGTTACCTCA
542 AMO         TTTGTTTATA ATCTTAAATG GAAATTGGCA AATGGTAAAG TGCCTGATGT TGATTATACT TCAATGGTTA CGTTACCTCA
16 PC           TTTGTTTATA ATCTTAAATG GAAATTGGCA AATGGTAAAG TGCCTGATGT TGATTATACT TCAATGGTTA CGTTACCTCA
340 PC          TTTGTTTATA ATCTTAAATG GAAATTGGCA AATGGTAAAG TGCCTGATGT TGATTATACT TCAATGGTTA CGTTACCTCA
422 PC          TTTGTTTATA ATCTTAAATG GAAATTGGCA AATGGTAAAG TGCCTGATGT TGATTATACT TCAATGGTTA CGTTACCTCA
29 H            TTTGTTTATA ATCTTAAATG GAAATTGGCA AATGGTAAAG TGCCTGATGT TGATTATACT TCAATGGTTA CGTTACCTCA
1131 PC         TTTGTTTATA ATCTTAAATG GAAATTGGCA AATGGTAAAG TGCCTGATGT TGATTATACT TCAATGGTTA CGTTACCTCA
233             TTTGTTTATA ATCTTAAATG GAAATTGGCA AATGGTAAAG TGCCTGATGT TGATTATACT TCAATGGTTA CGTTACCTCA
69155           TTTGTTTATA ATCTTAAATG GAAATTGGCA AATGGTAAAG TGCCTGATGT TGATTATACT TCAATGGTTA CGTTACCTCA

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....
                        1530       1540       1550       1560
ATCC 22019      ACACCCAGCA GAAATTGTTT GGGAAAAAAG AGATACATGT GTAATCTGA
58 H            ACACCCAGCA GAAATTGTTT GGGAAAAAAG AGATACATGT GTAATCTGA
87 H            ACACCCAGCA GAAATTGTTT GGGAAAAAAG AGATACATGT GTAATCTGA
137 H           ACACCCAGCA GAAATTGTTT GGGAAAAAAG AGATACATGT GTAATCTGA
88 H            ACACCCAGCA GAAATTGTTT GGGAAAAAAG AGATACATGT GTAATCTGA
542 AMO         ACACCCAGCA GAAATTGTTT GGGAAAAAAG AGATACATGT GTAATCTGA
16 PC           ACACCCAGCA GAAATTGTTT GGGAAAAAAG AGATACATGT GTAATCTGA
340 PC          ACACCCAGCA GAAATTGTTT GGGAAAAAAG AGATACATGT GTAATCTGA
422 PC          ACACCCAGCA GAAATTGTTT GGGAAAAAAG AGATACATGT GTAATCTGA
29 H            ACACCCAGCA GAAATTGTTT GGGAAAAAAG AGATACATGT GTAATCTGA
1131 PC         ACACCCAGCA GAAATTGTTT GGGAAAAAAG AGATACATGT GTAATCTGA
233             ACACCCAGCA GAAATTGTTT GGGAAAAAAG AGATACATGT GTAATCTGA
69155           ACACCCAGCA GAAATTGTTT GGGAAAAAAG AGATACATGT GTAATCTGA
```

8 REFERÊNCIAS

(CDC), C. F. D. C. A. P. Exophiala infection from contaminated injectable steroids prepared by a compounding pharmacy--United States, July-November 2002. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep,** v. 51, n. 49, p. 1109-12, Dec 2002. ISSN 0149-2195. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12530707 >.

ALANIO, A. et al. Investigating Clinical Issues by Genotyping of Medically Important Fungi: Why and How? **Clin Microbiol Rev,** v. 30, n. 3, p. 671-707, Jul 2017. ISSN 1098-6618. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28490578 >.

ALENCAR, D. S. O. et al. Candidaemia due to Candida parapsilosis species complex at a hospital in Brazil: Clinical characteristics and antifungal susceptibility profile. **Rev Iberoam Micol,** v. 34, n. 2, p. 106-108, 2017 Apr - Jun 2017. ISSN 2173-9188. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28214273 >.

ALMIRANTE, B. et al. [Candidemia and invasive candidiasis approach in critically ill patients: role of the echinocandins]. **Rev Esp Quimioter,** v. 30, n. 5, p. 355-367, Oct 2017. ISSN 1988-9518. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28945064 >.

ANTINORI, S. et al. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. **Eur J Intern Med,** v. 34, p. 21-28, Oct 2016. ISSN 1879-0828. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27394927 >.

ARENDRUP, M. C. Candida and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. **Dan Med J,** v. 60, n. 11, p. B4698, Nov 2013. ISSN 2245-1919. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24192246 >.

_____. Update on antifungal resistance in Aspergillus and Candida. **Clin Microbiol Infect,** v. 20 Suppl 6, p. 42-8, Jun 2014. ISSN 1469-0691. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24372701 >.

ARENDRUP, M. C. et al. **EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 7.3.1: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts**: Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)**:** 21 p. 2017.

ARNOLD, H. M. et al. Hospital resource utilization and costs of inappropriate treatment of candidemia. **Pharmacotherapy,** v. 30, n. 4, p. 361-8, Apr 2010. ISSN 1875-9114. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20334456 >.

ASADZADEH, M. et al. Epidemiology and Molecular Basis of Resistance to Fluconazole Among Clinical Candida parapsilosis Isolates in Kuwait. **Microb Drug Resist,** v. 23, n. 8, p. 966-972, Dec 2017. ISSN 1931-8448. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28353392 >.

AWAD, A. et al. Proteomic analysis of a *Candida albicans pga1* Null Strain. **EuPA Open Proteom,** v. 18, p. 1-6, Jun 2018. ISSN 2212-9685. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29928583 >.

AZEREDO, J. et al. Critical review on biofilm methods. **Crit Rev Microbiol,** v. 43, n. 3, p. 313-351, May 2017. ISSN 1549-7828. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27868469 >.

BARCHIESI, F. et al. Outbreak of fungemia due to Candida parapsilosis in a pediatric oncology unit. **Diagn Microbiol Infect Dis,** v. 49, n. 4, p. 269-71, Aug 2004. ISSN 0732-8893. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15313532 >.

_____. Factors related to outcome of bloodstream infections due to Candida parapsilosis complex. **BMC Infect Dis,** v. 16, p. 387, Aug 2016. ISSN 1471-2334. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27507170 >.

BASSETTI, M. et al. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain. **J Clin Microbiol,** v. 51, n. 12, p. 4167-72, Dec 2013. ISSN 1098-660X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24108614 >.

BASSETTI, M.; PEGHIN, M.; TIMSIT, J. F. The current treatment landscape: candidiasis. **J Antimicrob Chemother,** v. 71, n. suppl 2, p. ii13-ii22, Nov 2016. ISSN 1460-2091. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27880665 >.

BEN-AMI, R. Treatment of Invasive Candidiasis: A Narrative Review. **J Fungi (Basel),** v. 4, n. 3, Aug 2018. ISSN 2309-608X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30115843 >.

BENEDICT, K. et al. Emerging issues, challenges, and changing epidemiology of fungal disease outbreaks. **Lancet Infect Dis,** v. 17, n. 12, p. e403-e411, Dec 2017. ISSN 1474-4457. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28774697 >.

BERKOW, E. L. et al. Multidrug Transporters and Alterations in Sterol Biosynthesis Contribute to Azole Antifungal Resistance in Candida parapsilosis. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 59, n. 10, p. 5942-50, Oct 2015. ISSN 1098-6596. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26169412 >.

BONFIETTI, L. X. et al. Prevalence, distribution and antifungal susceptibility profiles of Candida parapsilosis, Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis bloodstream isolates. **J Med Microbiol,** v. 61, n. Pt 7, p. 1003-8, Jul 2012. ISSN 1473-5644. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22493277 >.

BONGOMIN, F. et al. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. **J Fungi (Basel),** v. 3, n. 4, Oct 2017. ISSN 2309-608X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29371573 >.

BOUZA, E.; GUINEA, J.; GUEMBE, M. The Role of Antifungals against Candida Biofilm in Catheter-Related Candidemia. **Antibiotics (Basel),** v. 4, n. 1, p. 1-17, 2014. ISSN 2079-6382. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27025612 >.

BRILHANTE, R. S. N. et al. Antifungal susceptibility and virulence of Candida parapsilosis species complex: an overview of their pathogenic potential. **J Med Microbiol,** v. 67, n. 7, p. 903-914, Jul 2018. ISSN 1473-5644. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29846153 >.

CABEZÓN, V. et al. Analysis of Candida albicans plasma membrane proteome. **Proteomics,** v. 9, n. 20, p. 4770-86, Oct 2009. ISSN 1615-9861. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19824013 >.

CAGGIANO, G. et al. Candidemia in the Neonatal Intensive Care Unit: A Retrospective, Observational Survey and Analysis of Literature Data. **Biomed Res Int,** v. 2017, p. 7901763, 2017. ISSN 2314-6141. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28884129 >.

CANDEL, F. J. et al. Update in Infectious Diseases 2018. **Rev Esp Quimioter,** v. 31 Suppl 1, p. 1-8, Sep 2018. ISSN 1988-9518. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30209913 >.

CANTÓN, E. et al. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of Candida parapsilosis, Candida orthopsilosis, and Candida metapsilosis isolated from patients with candidemia. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 55, n. 12, p. 5590-6, Dec 2011. ISSN 1098-6596. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21930869 >.

CASTANHEIRA, M. et al. Monitoring Antifungal Resistance in a Global Collection of Invasive Yeasts and Molds: Application of CLSI Epidemiological Cutoff Values and Whole-Genome Sequencing Analysis for Detection of Azole Resistance in Candida albicans. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 61, n. 10, Oct 2017. ISSN 1098-6596. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28784671 >.

_____. Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates: results of the SENTRY Antifungal Surveillance Program (2013). **Diagn Microbiol Infect Dis,** v. 85, n. 2, p. 200-4, Jun 2016. ISSN 1879-0070. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27061369 >.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. **Front Med (Lausanne),** v. 5, p. 28, 2018. ISSN 2296-858X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29487851 >.

CERIKCIOGLU, N. et al. Simple and reliable detection of slime production of Candida spp. directly from blood culture bottles: comparison of visual tube method and transmission electron microscopy. **Mycopathologia,** v. 158, n. 3, p. 279-84, Oct 2004. ISSN 0301-486X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15645168 >.

CHAFFIN, W. L. Candida albicans cell wall proteins. **Microbiol Mol Biol Rev,** v. 72, n. 3, p. 495-544, Sep 2008. ISSN 1098-5557. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18772287 >.

CHAN, S. et al. Candida species bloodstream infections in hospitalised children: A 10-year experience. **J Paediatr Child Health,** v. 51, n. 9, p. 857-60; quiz 861, Sep 2015. ISSN 1440-1754. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25941056 >.

CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K. Candida Biofilms: Development, Architecture, and Resistance. **Microbiol Spectr,** v. 3, n. 4, Aug 2015. ISSN 2165-0497. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26350306 >.

CHAO, Q. T. et al. Comparison of the accuracy of two conventional phenotypic methods and two MALDI-TOF MS systems with that of DNA sequencing analysis for correctly identifying clinically encountered yeasts. **PLoS One,** v. 9, n. 10, p. e109376, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25330370 >.

CHEN, K. W. et al. Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of Candida albicans clinical isolates in Taiwan. **J Med Microbiol,** v. 54, n. Pt 3, p. 249-58, Mar 2005. ISSN 0022-2615. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15713608 >.

CHEN, Y. C. et al. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of Candida parapsilosis sensu stricto, Candida orthopsilosis, and Candida metapsilosis in Taiwan. **Diagn Microbiol Infect Dis,** v. 68, n. 3, p. 284-92, Nov 2010. ISSN 1879-0070. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20851551 >.

CHOI, Y. J. et al. Fluconazole-Resistant Candida parapsilosis Bloodstream Isolates with Y132F Mutation in ERG11 Gene, South Korea. **Emerg Infect Dis,** v. 24, n. 9, p. 1768-1770, Sep 2018. ISSN 1080-6059. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30124412 >.

CHOW, B. D.; LINDEN, J. R.; BLISS, J. M. Candida parapsilosis and the neonate: epidemiology, virulence and host defense in a unique patient setting. **Expert Rev Anti Infect Ther,** v. 10, n. 8, p. 935-46, Aug 2012. ISSN 1744-8336. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23030332 >.

CIOK-PATER, E. et al. [The evaluation of relationship between the origin of Candida sp. and the ability of biofilm formation on surface of different biomaterials]. **Med Dosw Mikrobiol,** v. 61, n. 3, p. 273-80, 2009. ISSN 0025-8601. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20120931 >.

CLANCY, C. J.; NGUYEN, M. H. Diagnosing Invasive Candidiasis. **J Clin Microbiol,** v. 56, n. 5, May 2018. ISSN 1098-660X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29444828 >.

CLEVELAND, A. A. et al. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008-2011. **Clin Infect Dis,** v. 55, n. 10, p. 1352-61, Nov 2012. ISSN 1537-6591. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22893576 >.

COCUAUD, C. et al. Anti-metabolic activity of caspofungin against Candida albicans and Candida parapsilosis biofilms. **J Antimicrob Chemother,** v. 56, n. 3, p. 507-12, Sep 2005. ISSN 0305-7453. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16040622 >.

CORDEIRO, R. A. et al. Candida parapsilosis complex in veterinary practice: A historical overview, biology, virulence attributes and antifungal susceptibility traits. **Vet Microbiol,** v. 212, p. 22-30, Dec 2017. ISSN 1873-2542. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29173584 >.

CORDEIRO, R. E. A. et al. The calcineurin inhibitor cyclosporin A exhibits synergism with antifungals against Candida parapsilosis species complex. **J Med Microbiol,** v. 63, n. Pt 7, p. 936-44, Jul 2014. ISSN 1473-5644. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24722799 >.

CRISEO, G.; SCORDINO, F.; ROMEO, O. Current methods for identifying clinically important cryptic Candida species. **J Microbiol Methods,** v. 111, p. 50-6, Apr 2015. ISSN 1872-8359. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25659326 >.

CUÉLLAR-CRUZ, M. et al. Candida species: new insights into biofilm formation. **Future Microbiol,** v. 7, n. 6, p. 755-71, Jun 2012. ISSN 1746-0921. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22702528 >.

_____. The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by Candida species: a review. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis,** v. 31, n. 10, p. 2513-27, Oct 2012. ISSN 1435-4373. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22581304 >.

DA COSTA, V. G. et al. Nosocomial bloodstream Candida infections in a tertiary-care hospital in South Brazil: a 4-year survey. **Mycopathologia,** v. 178, n. 3-4, p. 243-50, Oct 2014. ISSN 1573-0832. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25103140 >.

DA MATTA, D. A.; SOUZA, A. C. R.; COLOMBO, A. L. Revisiting Species Distribution and Antifungal Susceptibility of Candida Bloodstream Isolates from Latin American Medical Centers. **J Fungi (Basel),** v. 3, n. 2, May 2017. ISSN 2309-608X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29371542 >.

DE ALMEIDA, J. N. et al. Evaluating and Improving Vitek MS for Identification of Clinically Relevant Species of Trichosporon and the Closely Related Genera Cutaneotrichosporon and Apiotrichum. **J Clin Microbiol,** v. 55, n. 8, p. 2439-2444, 08 2017. ISSN 1098-660X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28539340 >.

DE OLIVEIRA SANTOS, G. C. et al. Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. **Front Microbiol,** v. 9, p. 1351, 2018. ISSN 1664-302X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30018595 >.

DE ROSA, F. G. et al. Anidulafungin versus fluconazole: clinical focus on IDSA and ESCMID guidelines. **Infez Med,** v. 22, n. 2, p. 107-11, Jun 2014. ISSN 1124-9390. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24955796 >.

DEL POZO, J. L. Biofilm-related disease. **Expert Rev Anti Infect Ther,** v. 16, n. 1, p. 51-65, Jan 2018. ISSN 1744-8336. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29235402 >.

DOI, A. M. et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PLoS One,** v. 11, n. 1, p. e0146909, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26808778 >.

EL KHOURY, P. et al. Proteomic analysis of a Candida albicans pir32 null strain reveals proteins involved in adhesion, filamentation and virulence. **PLoS One,** v. 13, n. 3, p. e0194403, 2018. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29554112 >.

ENOCH, D. A. et al. The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. **Methods Mol Biol,** v. 1508, p. 17-65, 2017. ISSN 1940-6029. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27837497 >.

EPELBAUM, O.; CHASAN, R. Candidemia in the Intensive Care Unit. **Clin Chest Med,** v. 38, n. 3, p. 493-509, Sep 2017. ISSN 1557-8216. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28797491 >.

ESTIVILL, D. et al. Biofilm formation by five species of Candida on three clinical materials. **J Microbiol Methods,** v. 86, n. 2, p. 238-42, Aug 2011. ISSN 1872-8359. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21664387 >.

EUCAST. **Antifungal Agents Breakpoint tables for interpretation of MICs**. ANTIFUNGAL_BREAKPOINTS_V_9.0_180212: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2018.

FIORI, B. et al. In vitro activities of anidulafungin and other antifungal agents against biofilms formed by clinical isolates of different Candida and Aspergillus species. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 55, n. 6, p. 3031-5, Jun 2011. ISSN 1098-6596. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21422210 >.

FLORIO, W. et al. Recent Advances and Ongoing Challenges in the Diagnosis of Microbial Infections by MALDI-TOF Mass Spectrometry. **Front Microbiol,** v. 9, p. 1097, 2018. ISSN 1664-302X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29896172 >.

GALLARDO-MORENO, A. M. et al. The measurement temperature: an important factor relating physicochemical and adhesive properties of yeast cells to biomaterials. **J Colloid Interface Sci,** v. 271, n. 2, p. 351-8, Mar 2004. ISSN 0021-9797. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14972612 >.

GAMALETSOU, M. N.; WALSH, T. J.; SIPSAS, N. V. Invasive Fungal Infections in Patients with Hematological Malignancies: Emergence of Resistant Pathogens and New Antifungal Therapies. **Turk J Haematol,** v. 35, n. 1, p. 1-11, Mar 2018. ISSN 1308-5263. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29391334 >.

GARCIA-EFFRON, G. et al. A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in Candida parapsilosis, Candida orthopsilosis, and Candida metapsilosis accounts for reduced echinocandin susceptibility. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 52, n. 7, p. 2305-12, Jul 2008. ISSN 1098-6596. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18443110 >.

GIACOBINO, J. et al. Fungal peritonitis in patients undergoing peritoneal dialysis (PD) in Brazil: molecular identification, biofilm production and antifungal susceptibility of the agents. **Med Mycol,** v. 54, n. 7, p. 725-732, Oct 2016. ISSN 1460-2709. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27143636 >.

GIACOMAZZI, J. et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses,** v. 59, n. 3, p. 145-50, Mar 2016. ISSN 1439-0507. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26691607 >.

GIRI, S.; KINDO, A. J. A review of Candida species causing blood stream infection. **Indian J Med Microbiol,** v. 30, n. 3, p. 270-8, 2012 Jul-Sep 2012. ISSN 1998-3646. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22885191 >.

GOMEZ-LOPEZ, A. et al. Prevalence and susceptibility profile of Candida metapsilosis and Candida orthopsilosis: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 52, n. 4, p. 1506-9, Apr 2008. ISSN 0066-4804. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18285486 >.

GONÇALVES, S. S. et al. Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in Candida and Aspergillus. **Mycoses,** v. 59, n. 4, p. 198-219, Apr 2016. ISSN 1439-0507. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26810669 >.

GOVENDER, N. P. et al. Emergence of azole-resistant Candida parapsilosis causing bloodstream infection: results from laboratory-based sentinel surveillance in South Africa. **J Antimicrob Chemother,** v. 71, n. 7, p. 1994-2004, 07 2016. ISSN 1460-2091. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27125552 >.

GRECO, V. et al. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical proteomics. **Expert Rev Proteomics,** v. 15, n. 8, p. 683-696, Aug 2018. ISSN 1744-8387. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30058389 >.

GROSSMAN, N. T. et al. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in Candida parapsilosis isolates from a U.S. surveillance system. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 59, n. 2, p. 1030-7, Feb 2015. ISSN 1098-6596. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25451046 >.

GUEMBE, M. et al. Micafungin at physiological serum concentrations shows antifungal activity against Candida albicans and Candida parapsilosis biofilms. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 58, n. 9, p. 5581-4, Sep 2014. ISSN 1098-6596. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24957821 >.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of Candida species causing candidemia. **Clin Microbiol Infect,** v. 20 Suppl 6, p. 5-10, Jun 2014. ISSN 1469-0691. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24506442 >.

GUO, W. et al. An outbreak of Candida parapsilosis fungemia among preterm infants. **Genet Mol Res,** v. 14, n. 4, p. 18259-67, Dec 2015. ISSN 1676-5680. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26782473 >.

GÓRALSKA, K.; BLASZKOWSKA, J.; DZIKOWIEC, M. Neuroinfections caused by fungi. **Infection,** v. 46, n. 4, p. 443-459, Aug 2018. ISSN 1439-0973. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29785613 >.

HALL, T. A. BioEdit : a user - friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98 / NT. **Nucleic Acids Symposium Series,** v. 41, p. 95—98, 1999.

HENDRICKX, M. et al. Screening of strains of the Candida parapsilosis group of the BCCM/IHEM collection by MALDI-TOF MS. **Diagn Microbiol Infect Dis,** v. 70, n. 4, p. 544-8, Aug 2011. ISSN 1879-0070. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21767712 >.

HERNÁNDEZ-CASTRO, R. et al. Outbreak of Candida parapsilosis in a neonatal intensive care unit: a health care workers source. **Eur J Pediatr,** v. 169, n. 7, p. 783-7, Jul 2010. ISSN 1432-1076. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19957192 >.

HUANG, Y. C. et al. Outbreak of Candida parapsilosis fungemia in neonatal intensive care units: clinical implications and genotyping analysis. **Infection,** v. 27, n. 2, p. 97-102, 1999 Mar-Apr 1999. ISSN 0300-8126. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10219638 >.

IÑIGO, M.; DEL POZO, J. L. Fungal biofilms: From bench to bedside. **Rev Esp Quimioter,** v. 31 Suppl 1, p. 35-38, Sep 2018. ISSN 1988-9518. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30209921 >.

IÑIGO, M.; PEMÁN, J.; DEL POZO, J. L. Antifungal activity against Candida biofilms. **Int J Artif Organs,** v. 35, n. 10, p. 780-91, Oct 2012. ISSN 1724-6040. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23138707 >.

JAMAL, W. Y. et al. Comparative evaluation of two matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of clinically significant yeasts. **Int J Infect Dis,** v. 26, p. 167-70, Sep 2014. ISSN 1878-3511. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25080355 >.

JANUM, S.; AFSHARI, A. Central venous catheter (CVC) removal for patients of all ages with candidaemia. **Cochrane Database Syst Rev,** v. 7, p. CD011195, Jul 2016. ISSN 1469-493X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27398809 >.

JOACHIM, H.; POLAYES, S. Subacute endocarditis and systemicmycosis (monilia). **JAMA,** v. 115, n. 3, p. 205–208, July 20, 1940 1940.

KATRAGKOU, A. et al. Differential activities of newer antifungal agents against Candida albicans and Candida parapsilosis biofilms. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 52, n. 1, p. 357-60, Jan 2008. ISSN 0066-4804. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17938192 >.

_____. Diagnostic Imaging and Invasive Fungal Diseases in Children. **J Pediatric Infect Dis Soc,** v. 6, n. suppl_1, p. S22-S31, Sep 2017. ISSN 2048-7207. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28927203 >.

KATRAGKOU, A.; ROILIDES, E.; WALSH, T. J. Role of Echinocandins in Fungal Biofilm-Related Disease: Vascular Catheter-Related Infections, Immunomodulation, and Mucosal Surfaces. **Clin Infect Dis,** v. 61 Suppl 6, p. S622-9, Dec 2015. ISSN 1537-6591. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26567280 >.

KAUFFMAN, C. A.; MALANI, A. N. Fungal Infections Associated with Contaminated Steroid Injections. **Microbiol Spectr,** v. 4, n. 2, 04 2016. ISSN 2165-0497. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27227303 >.

KEAN, R. et al. Gaining Insights from Candida Biofilm Heterogeneity: One Size Does Not Fit All. **J Fungi (Basel),** v. 4, n. 1, Jan 2018. ISSN 2309-608X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29371505 >.

KOVÁCS, R. et al. Effect of caspofungin and micafungin in combination with farnesol against Candida parapsilosis biofilms. **Int J Antimicrob Agents,** v. 47, n. 4, p. 304-10, Apr 2016. ISSN 1872-7913. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26968084 >.

_____. Activity of exogenous tyrosol in combination with caspofungin and micafungin against Candida parapsilosis sessile cells. **J Appl Microbiol,** v. 122, n. 6, p. 1529-1536, Jun 2017. ISSN 1365-2672. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28321957 >.

KUBESOVÁ, A. et al. Candida "psilosis"--electromigration techniques and MALDI-TOF mass spectrometry for phenotypical discrimination. **Analyst,** v. 137, n. 8, p. 1937-43, Apr 2012. ISSN 1364-5528. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22396948 >.

KUHN, D. M. et al. Antifungal susceptibility of Candida biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 46, n. 6, p. 1773-80, Jun 2002. ISSN 0066-4804. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12019089 >.

_____. Candida parapsilosis characterization in an outbreak setting. **Emerg Infect Dis,** v. 10, n. 6, p. 1074-81, Jun 2004. ISSN 1080-6040. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15207060 >.

KÖHLER, J. R. et al. Fungi that Infect Humans. **Microbiol Spectr,** v. 5, n. 3, 06 2017. ISSN 2165-0497. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28597822 >.

LAMOTH, F. et al. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. **J Antimicrob Chemother,** v. 73, n. suppl_1, p. i4-i13, Jan 2018. ISSN 1460-2091. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29304207 >.

LARKIN, E. L.; DHARMAIAH, S.; GHANNOUM, M. A. Biofilms and beyond: expanding echinocandin utility. **J Antimicrob Chemother,** v. 73, n. suppl_1, p. i73-i81, Jan 2018. ISSN 1460-2091. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29304214 >.

LATTIF, A. A. et al. Characterization of biofilms formed by Candida parapsilosis, C. metapsilosis, and C. orthopsilosis. **Int J Med Microbiol,** v. 300, n. 4, p. 265-70, Apr 2010. ISSN 1618-0607. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19932053 >.

LAZZELL, A. L. et al. Treatment and prevention of Candida albicans biofilms with caspofungin in a novel central venous catheter murine model of candidiasis. **J Antimicrob Chemother,** v. 64, n. 3, p. 567-70, Sep 2009. ISSN 1460-2091. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19584104 >.

LIN, D. et al. Three distinct genotypes within Candida parapsilosis from clinical sources. **J Clin Microbiol,** v. 33, n. 7, p. 1815-21, Jul 1995. ISSN 0095-1137. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7665651 >.

LOHSE, M. B. et al. Development and regulation of single- and multi-species Candida albicans biofilms. **Nat Rev Microbiol,** v. 16, n. 1, p. 19-31, Jan 2018. ISSN 1740-1534. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29062072 >.

LOVERO, G. et al. Molecular Identification and Echinocandin Susceptibility of Candida parapsilosis Complex Bloodstream Isolates in Italy, 2007-2014. **PLoS One,** v. 11, n. 2, p. e0150218, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26919294 >.

MAGOBO, R. E. et al. Detection of neonatal unit clusters of Candida parapsilosis fungaemia by microsatellite genotyping: Results from laboratory-based sentinel surveillance, South Africa, 2009-2010. **Mycoses,** v. 60, n. 5, p. 320-327, May 2017. ISSN 1439-0507. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28101934 >.

MAIOLO, E. M. et al. Antifungal activity against planktonic and biofilm Candida albicans in an experimental model of foreign-body infection. **J Infect,** v. 72, n. 3, p. 386-92, Mar 2016. ISSN 1532-2742. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26723911 >.

MANTADAKIS, E.; PANA, Z. D.; ZAOUTIS, T. Candidemia in children: Epidemiology, prevention and management. **Mycoses**, May 2018. ISSN 1439-0507. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29762868 >.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J. et al. Production of biofilm by Candida and non-Candida spp. isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. **Int J Med Microbiol,** v. 304, n. 8, p. 1192-8, Nov 2014. ISSN 1618-0607. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25224357 >.

_____. Susceptibility of Candida albicans biofilms to caspofungin and anidulafungin is not affected by metabolic activity or biomass production. **Med Mycol,** v. 54, n. 2, p. 155-61, Feb 2016. ISSN 1460-2709. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26543157 >.

_____. Micafungin is more active against Candida albicans biofilms with high metabolic activity. **J Antimicrob Chemother,** v. 69, n. 11, p. 2984-7, Nov 2014. ISSN 1460-2091. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24942468 >.

_____. Antifungal resistance to fluconazole and echinocandins is not emerging in yeast isolates causing fungemia in a Spanish tertiary care center. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 58, n. 8, p. 4565-72, Aug 2014. ISSN 1098-6596. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24867979 >.

MARIA, S. et al. Species distribution and antifungal susceptibility among clinical isolates of Candida parapsilosis complex from India. **Rev Iberoam Micol**, Jul 2018. ISSN 2173-9188. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29997030 >.

MARTÍNEZ-GOMARIZ, M. et al. Proteomic analysis of cytoplasmic and surface proteins from yeast cells, hyphae, and biofilms of Candida albicans. **Proteomics,** v. 9, n. 8, p. 2230-52, Apr 2009. ISSN 1615-9861. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19322777 >.

MELEADY, P. Two-Dimensional Gel Electrophoresis and 2D-DIGE. **Methods Mol Biol,** v. 1664, p. 3-14, 2018. ISSN 1940-6029. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29019120 >.

MELLINGHOFF, S. C.; CORNELY, O. A.; JUNG, N. Essentials in Candida bloodstream infection. **Infection**, Sep 2018. ISSN 1439-0973. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30218311 >.

MELO, A. S. et al. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical Candida spp. isolates, including strains of the Candida parapsilosis complex. **Med Mycol,** v. 49, n. 3, p. 253-62, Apr 2011. ISSN 1460-2709. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21039308 >.

MLYNÁRIKOVÁ, K. et al. Evaluation of capacity to detect ability to form biofilm in Candida parapsilosis sensu stricto strains by MALDI-TOF MS. **Folia Microbiol (Praha)**, Apr 2016. ISSN 1874-9356. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27068413 >.

MORENO, X. et al. [Molecular identification and in vitro antifungal susceptibility of blood isolates of the Candida parapsilosis species complex in Venezuela]. **Rev Iberoam Micol,** v. 34, n. 3, p. 165-170, 2017 Jul - Sep 2017. ISSN 2173-9188. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28457646 >.

MUKHERJEE, P. K. et al. Candida biofilm: a well-designed protected environment. **Med Mycol,** v. 43, n. 3, p. 191-208, May 2005. ISSN 1369-3786. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16010846 >.

NEJI, S. et al. Virulence factors, antifungal susceptibility and molecular mechanisms of azole resistance among Candida parapsilosis complex isolates recovered from clinical specimens. **J Biomed Sci,** v. 24, n. 1, p. 67, Sep 2017. ISSN 1423-0127. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28870262 >.

_____. Molecular study of the Candida parapsilosis complex in Sfax, Tunisia. **Med Mycol,** v. 55, n. 2, p. 137-144, Feb 2017. ISSN 1460-2709. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27555560 >.

NOBILE, C. J.; JOHNSON, A. D. Candida albicans Biofilms and Human Disease. **Annu Rev Microbiol,** v. 69, p. 71-92, 2015. ISSN 1545-3251. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26488273 >.

NOBREGA DE ALMEIDA JÚNIOR, J. et al. Evaluation of the MALDI-TOF VITEK MS™ system for the identification of Candida parapsilosis, C. orthopsilosis and C. metapsilosis from bloodstream infections. **J Microbiol Methods,** v. 105, p. 105-8, Oct 2014. ISSN 1872-8359. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25072839 >.

NOSEK, J. et al. Biology and genetics of the pathogenic yeast Candida parapsilosis. **Curr Genet,** v. 55, n. 5, p. 497-509, Oct 2009. ISSN 1432-0983. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19662416 >.

NUCCI, M. et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. **PLoS One,** v. 8, n. 3, p. e59373, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23527176 >.

_____. Recommendations for the management of candidemia in adults in Latin America. Latin America Invasive Mycosis Network. **Rev Iberoam Micol,** v. 30, n. 3, p. 179-88, 2013 Jul-Sep 2013. ISSN 2173-9188. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23764552 >.

NÚÑEZ-BELTRÁN, A.; LÓPEZ-ROMERO, E.; CUÉLLAR-CRUZ, M. Identification of proteins involved in the adhesionof Candida species to different medical devices. **Microb Pathog,** v. 107, p. 293-303, Jun 2017. ISSN 1096-1208. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28396240 >.

O'LEARY, R. A. et al. Management of invasive candidiasis and candidaemia in critically ill adults: expert opinion of the European Society of Anaesthesia Intensive Care Scientific Subcommittee. **J Hosp Infect,** v. 98, n. 4, p. 382-390, Apr 2018. ISSN 1532-2939. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29222034 >.

OLEARY, R. A. et al. Management of Invasive Candidiasis and Candidemia in critically ill adults - Expert opinion of the European Society of Anaesthesia (ESA) Intensive Care scientific subcommittee. **J Hosp Infect**, Dec 2017. ISSN 1532-2939. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29222034 >.

OUD, L. Secular Trends in Utilization of Critical Care Services Among Candidemia-Associated Hospitalizations: A Population-Based Cohort Study. **J Clin Med Res,** v. 8, n. 1, p. 40-3, Jan 2016. ISSN 1918-3003. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26668681 >.

PAMMI, M. et al. Candida parapsilosis is a significant neonatal pathogen: a systematic review and meta-analysis. **Pediatr Infect Dis J,** v. 32, n. 5, p. e206-16, May 2013. ISSN 1532-0987. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23340551 >.

PAPPAS, P. G. et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis,** v. 62, n. 4, p. e1-50, Feb 2016. ISSN 1537-6591. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26679628 >.

_____. Invasive candidiasis. **Nat Rev Dis Primers,** v. 4, p. 18026, May 2018. ISSN 2056-676X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29749387 >.

PAULA-MATTIELLO, S.; OLIVEIRA, S. D.; MEDINA-SILVA, R. In vitro evaluation of hydrolytic enzyme activity and biofilm formation of Candida parapsilosis species complex from a nosocomial environment. **Rev Soc Bras Med Trop,** v. 50, n. 4, p. 558-561, 2017 Jul-Aug 2017. ISSN 1678-9849. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28954082 >.

PEMÁN, J.; QUINDÓS, G. [Current aspects of invasive diseases caused by Candida and other yeast fungi]. **Rev Iberoam Micol,** v. 33, n. 3, p. 133-9, 2016 Jul-Sep 2016. ISSN 2173-9188. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27067876 >.

PEREIRA, F. D. et al. Use of MALDI-TOF mass spectrometry to analyze the molecular profile of Pseudomonas aeruginosa biofilms grown on glass and plastic surfaces. **Microb Pathog,** v. 86, p. 32-7, Sep 2015. ISSN 1096-1208. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26162295 >.

PERLIN, D. S.; SHOR, E.; ZHAO, Y. Update on Antifungal Drug Resistance. **Curr Clin Microbiol Rep,** v. 2, n. 2, p. 84-95, Jun 2015. ISSN 2196-5471. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26120512 >.

PFALLER, M. et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004-2008. **Diagn Microbiol Infect Dis,** v. 74, n. 4, p. 323-31, Dec 2012. ISSN 1879-0070. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23102556 >.

PFALLER, M. A. et al. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of Candida in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004-2008. **PLoS One,** v. 9, n. 7, p. e101510, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24991967 >.

PFALLER, M. A.; CASTANHEIRA, M. Nosocomial Candidiasis: Antifungal Stewardship and the Importance of Rapid Diagnosis. **Med Mycol,** v. 54, n. 1, p. 1-22, Jan 2016. ISSN 1460-2709. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26385381 >.

PFALLER, M. A. et al. 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 as determined by CLSI standardized disk diffusion. **J Clin Microbiol,** v. 48, n. 4, p. 1366-77, Apr 2010. ISSN 1098-660X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20164282 >.

_____. Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of Candida parapsilosis: a global assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. **J Clin Microbiol,** v. 46, n. 3, p. 842-9, Mar 2008. ISSN 1098-660X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18199791 >.

_____. Antifungal susceptibilities of Candida, Cryptococcus neoformans and Aspergillus fumigatus from the Asia and Western Pacific region: data from the SENTRY antifungal surveillance program (2010-2012). **J Antibiot (Tokyo),** v. 68, n. 9, p. 556-61, Sep 2015. ISSN 0021-8820. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25899126 >.

_____. Candida bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 55, n. 2, p. 561-6, Feb 2011. ISSN 1098-6596. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21115790 >.

PHOOMPOUNG, P.; CHAYAKULKEEREE, M. Recent Progress in the Diagnosis of Pathogenic Candida Species in Blood Culture. **Mycopathologia,** v. 181, n. 5-6, p. 363-9, Jun 2016. ISSN 1573-0832. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27003437 >.

PIERCE, C. G. et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nat Protoc,** v. 3, n. 9, p. 1494-500, 2008. ISSN 1750-2799. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18772877 >.

_____. The Candida albicans Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function. **J Fungi (Basel),** v. 3, n. 1, Mar 2017. ISSN 2309-608X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28516088 >.

PINHATI, H. M. et al. Outbreak of candidemia caused by fluconazole resistant Candida parapsilosis strains in an intensive care unit. **BMC Infect Dis,** v. 16, n. 1, p. 433, Aug 2016. ISSN 1471-2334. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27544427 >.

PIRES, R. H. et al. Candida parapsilosis complex water isolates from a haemodialysis unit: biofilm production and in vitro evaluation of the use of clinical antifungals. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 106, n. 6, p. 646-54, Sep 2011. ISSN 1678-8060. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22012217 >.

POLKE, M.; HUBE, B.; JACOBSEN, I. D. Candida survival strategies. **Adv Appl Microbiol,** v. 91, p. 139-235, 2015. ISSN 0065-2164. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25911234 >.

PRAŻYŃSKA, M.; BOGIEL, T.; GOSPODAREK-KOMKOWSKA, E. In vitro activity of micafungin against biofilms of Candida albicans, Candida glabrata, and Candida parapsilosis at different stages of maturation. **Folia Microbiol (Praha),** v. 63, n. 2, p. 209-216, Mar 2018. ISSN 1874-9356. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28983822 >.

PRAŻYŃSKA, M.; GOSPODAREK, E. In vitro effect of amphotericin B on Candida albicans, Candida glabrata and Candida parapsilosis biofilm formation. **Mycopathologia,** v. 177, n. 1-2, p. 19-27, Feb 2014. ISSN 1573-0832. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24436013 >.

PULCRANO, G. et al. MALDI-TOF mass spectrometry and microsatellite markers to evaluate Candida parapsilosis transmission in neonatal intensive care units. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis,** v. 31, n. 11, p. 2919-28, Nov 2012. ISSN 1435-4373. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22644055 >.

PUTIGNANI, L. et al. MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi. **Mol Biosyst,** v. 7, n. 3, p. 620-9, Mar 2011. ISSN 1742-2051. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20967323 >.

QI, L. et al. Nosocomial Outbreak of Candida parapsilosis sensu stricto Fungemia in a Neonatal Intensive Care Unit in China. **J Hosp Infect**, Jun 2018. ISSN 1532-2939. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29928941 >.

QIAN, J. et al. MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. **Anal Bioanal Chem,** v. 392, n. 3, p. 439-49, Oct 2008. ISSN 1618-2650. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18690424 >.

RAGHURAM, A. et al. Invasive fungal infections following liver transplantation: incidence, risk factors, survival, and impact of fluconazole-resistant Candida parapsilosis (2003-2007). **Liver Transpl,** v. 18, n. 9, p. 1100-9, Sep 2012. ISSN 1527-6473. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22577087 >.

RAJENDRAN, R. et al. Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with Candida albicans bloodstream infection-Scotland, 2012-2013. **Clin Microbiol Infect,** v. 22, n. 1, p. 87-93, Jan 2016. ISSN 1469-0691. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26432192 >.

RAJKOWSKA, K.; KUNICKA-STYCZYŃSKA, A. Typing and virulence factors of food-borne Candida spp. isolates. **Int J Food Microbiol,** v. 279, p. 57-63, Aug 2018. ISSN 1879-3460. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29734032 >.

REVIE, N. M. et al. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Curr Opin Microbiol,** v. 45, p. 70-76, Mar 2018. ISSN 1879-0364. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29547801 >.

RICHARDSON, J. P.; HO, J.; NAGLIK, J. R. Candida-Epithelial Interactions. **J Fungi (Basel),** v. 4, n. 1, Feb 2018. ISSN 2309-608X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29419738 >.

RIEDERER, K.; FOZO, P.; KHATIB, R. Typing of Candida albicans and Candida parapsilosis: species-related limitations of electrophoretic karyotyping and restriction endonuclease analysis of genomic DNA. **Mycoses,** v. 41, n. 9-10, p. 397-402, Nov 1998. ISSN 0933-7407. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9916463 >.

RODRIGUES, C. F.; HENRIQUES, M. Liposomal and Deoxycholate Amphotericin B Formulations: Effectiveness against Biofilm Infections of Candida spp. **Pathogens,** v. 6, n. 4, Dec 2017. ISSN 2076-0817. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29194382 >.

ROSATO, A. et al. In vitro effectiveness of anidulafungin against Candida sp. biofilms. **J Antibiot (Tokyo),** v. 66, n. 12, p. 701-4, Dec 2013. ISSN 0021-8820. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24022607 >.

ROY, B.; MEYER, S. A. Confirmation of the distinct genotype groups within the form species Candida parapsilosis. **J Clin Microbiol,** v. 36, n. 1, p. 216-8, Jan 1998. ISSN 0095-1137. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9431950 >.

SABINO, R. et al. New polymorphic microsatellite markers able to distinguish among Candida parapsilosis sensu stricto isolates. **J Clin Microbiol,** v. 48, n. 5, p. 1677-82, May 2010. ISSN 1098-660X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20220157 >.

SAMPAIO, P. et al. New microsatellite multiplex PCR for Candida albicans strain typing reveals microevolutionary changes. **J Clin Microbiol,** v. 43, n. 8, p. 3869-76, Aug 2005. ISSN 0095-1137. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16081924 >.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 74, n. 12, p. 5463-7, Dec 1977. ISSN 0027-8424. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/271968 >.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B. Diagnostic of Fungal Infections Related to Biofilms. **Adv Exp Med Biol,** v. 931, p. 63-82, 2016 2016. ISSN 0065-2598. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27300347 >.

SARDI, J. E. C. et al. Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Rev Iberoam Micol,** v. 31, n. 1, p. 22-9, 2014 Jan-Mar 2014. ISSN 2173-9188. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24252828 >.

SENEVIRATNE, C. J. et al. Proteomics of drug resistance in Candida glabrata biofilms. **Proteomics,** v. 10, n. 7, p. 1444-54, Apr 2010. ISSN 1615-9861. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20127690 >.

SERRANO-FUJARTE, I.; LÓPEZ-ROMERO, E.; CUÉLLAR-CRUZ, M. Moonlight-like proteins of the cell wall protect sessile cells of Candida from oxidative stress. **Microb Pathog,** v. 90, p. 22-33, Jan 2016. ISSN 1096-1208. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26550764 >.

SHIRAZI, F.; KONTOYIANNIS, D. P. Micafungin triggers caspase-dependent apoptosis in Candida albicans and Candida parapsilosis biofilms, including caspofungin non-susceptible isolates. **Virulence,** v. 6, n. 4, p. 385-94, 2015. ISSN 2150-5608. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26065323 >.

SILVA, A. P. et al. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of Candida parapsilosis, C. orthopsilosis, and C. metapsilosis in a tertiary care hospital. **J Clin Microbiol,** v. 47, n. 8, p. 2392-7, Aug 2009. ISSN 1098-660X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19494078 >.

SILVA, S. et al. Biofilms of non-Candida albicans Candida species: quantification, structure and matrix composition. **Med Mycol,** v. 47, n. 7, p. 681-9, Nov 2009. ISSN 1460-2709. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19888800 >.

_____. Adherence and biofilm formation of non-Candida albicans Candida species. **Trends Microbiol,** v. 19, n. 5, p. 241-7, May 2011. ISSN 1878-4380. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21411325 >.

_____. Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiol Rev,** v. 36, n. 2, p. 288-305, Mar 2012. ISSN 1574-6976. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21569057 >.

_____. Candida Species Biofilms' Antifungal Resistance. **J Fungi (Basel),** v. 3, n. 1, Feb 2017. ISSN 2309-608X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29371527 >.

SIMITSOPOULOU, M. et al. Species-specific and drug-specific differences in susceptibility of Candida biofilms to echinocandins: characterization of less common bloodstream isolates. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 57, n. 6, p. 2562-70, Jun 2013. ISSN 1098-6596. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23529739 >.

SINGARAVELU, K.; GÁCSER, A.; NOSANCHUK, J. D. Genetic determinants of virulence - Candida parapsilosis. **Rev Iberoam Micol,** v. 31, n. 1, p. 16-21, 2014 Jan-Mar 2014. ISSN 2173-9188. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24257473 >.

SOLDINI, S. et al. Microbiologic and clinical characteristics of biofilm-forming Candida parapsilosis isolates associated with fungaemia and their impact on mortality. **Clin Microbiol Infect,** v. 24, n. 7, p. 771-777, Jul 2018. ISSN 1469-0691. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29133157 >.

SOUZA, A. C. et al. Candida parapsilosis Resistance to Fluconazole: Molecular Mechanisms and In Vivo Impact in Infected Galleria mellonella Larvae. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 59, n. 10, p. 6581-7, Oct 2015. ISSN 1098-6596. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26259795 >.

STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nat Rev Microbiol,** v. 6, n. 3, p. 199-210, Mar 2008. ISSN 1740-1534. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18264116 >.

SWAMINATHAN, S.; KAMAT, S.; PINTO, N. A. Echinocandins: Their role in the management of Candida biofilms. **Indian J Med Microbiol,** v. 36, n. 1, p. 87-92, 2018 Jan-Mar 2018. ISSN 1998-3646. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29735833 >.

TAFF, H. T. et al. Mechanisms of Candida biofilm drug resistance. **Future Microbiol,** v. 8, n. 10, p. 1325-37, Oct 2013. ISSN 1746-0921. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24059922 >.

TAVANTI, A. et al. Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis spp. nov. to replace Candida parapsilosis groups II and III. **J Clin Microbiol,** v. 43, n. 1, p. 284-92, Jan 2005. ISSN 0095-1137. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15634984 >.

THOMAZ, D. Y. et al. Does the Capsule Interfere with Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii? **J Clin Microbiol,** v. 54, n. 2, p. 474-7, Feb 2016. ISSN 1098-660X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26659203 >.

TONIN, F. S. et al. Efficacy and safety of amphotericin B formulations: a network meta-analysis and a multicriteria decision analysis. **J Pharm Pharmacol,** v. 69, n. 12, p. 1672-1683, Dec 2017. ISSN 2042-7158. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28815602 >.

TRABASSO, P. et al. Isolation and drug susceptibility of Candida parapsilosis sensu lato and other species of C. parapsilosis complex from patients with blood stream infections and proposal of a novel LAMP identification method for the species. **Mycopathologia,** v. 179, n. 1-2, p. 53-62, Feb 2015. ISSN 1573-0832. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25481844 >.

TREVIÑO-RANGEL, R. E. J. et al. Biofilm formation and genetic variability of BCR1 gene in the Candida parapsilosis complex. **Rev Iberoam Micol,** v. 32, n. 3, p. 180-4, 2015 Jul-Sep 2015. ISSN 2173-9188. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25843001 >.

TROFA, D.; GÁCSER, A.; NOSANCHUK, J. D. Candida parapsilosis, an emerging fungal pathogen. **Clin Microbiol Rev,** v. 21, n. 4, p. 606-25, Oct 2008. ISSN 1098-6618. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18854483 >.

TROUVÉ, C. et al. Epidemiology and reporting of candidaemia in Belgium: a multi-centre study. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis,** v. 36, n. 4, p. 649-655, Apr 2017. ISSN 1435-4373. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27858242 >.

TUMBARELLO, M. et al. Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. **PLoS One,** v. 7, n. 3, p. e33705, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22479431 >.

TURNER, S. A.; BUTLER, G. The Candida pathogenic species complex. **Cold Spring Harb Perspect Med,** v. 4, n. 9, p. a019778, Sep 2014. ISSN 2157-1422. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25183855 >.

UPPULURI, P. et al. Dispersion as an important step in the Candida albicans biofilm developmental cycle. **PLoS Pathog,** v. 6, n. 3, p. e1000828, Mar 2010. ISSN 1553-7374. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20360962 >.

VALENTÍN, A. et al. In vitro activity of anidulafungin in combination with amphotericin B or voriconazole against biofilms of five Candida species. **J Antimicrob Chemother,** v. 71, n. 12, p. 3449-3452, 12 2016. ISSN 1460-2091. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27543657 >.

VAN ASBECK, E. C.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. Candida parapsilosis: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. **Crit Rev Microbiol,** v. 35, n. 4, p. 283-309, 2009. ISSN 1549-7828. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19821642 >.

VAN ASBECK, E. C. et al. Candida parapsilosis fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. **Mycopathologia,** v. 164, n. 6, p. 287-93, Dec 2007. ISSN 0301-486X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17874281 >.

VAN BURIK, J. A. et al. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. **J Clin Microbiol,** v. 36, n. 5, p. 1169-75, May 1998. ISSN 0095-1137. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9574670 >.

VIALÁS, V. et al. Cell surface shaving of Candida albicans biofilms, hyphae, and yeast form cells. **Proteomics,** v. 12, n. 14, p. 2331-9, Aug 2012. ISSN 1615-9861. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22685022 >.

WANG, H.; XU, Y. C.; HSUEH, P. R. Epidemiology of candidemia and antifungal susceptibility in invasive Candida species in the Asia-Pacific region. **Future Microbiol,** v. 11, p. 1461-1477, 10 2016. ISSN 1746-0921. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27750452 >.

WANG, H. et al. Investigation of an unrecognized large-scale outbreak of Candida parapsilosis sensu stricto fungaemia in a tertiary-care hospital in China. **Sci Rep,** v. 6, p. 27099, Jun 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27251023 >.

WELSH, R. M. et al. Survival, Persistence, and Isolation of the Emerging Multidrug-Resistant Pathogenic Yeast Candida auris on a Plastic Health Care Surface. **J Clin Microbiol,** v. 55, n. 10, p. 2996-3005, Oct 2017. ISSN 1098-660X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28747370 >.

WHALEY, S. G. et al. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans Candida* Species. **Front Microbiol,** v. 7, p. 2173, 2016. ISSN 1664-302X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28127295 >.

WIEDERHOLD, N. P. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. **Infect Drug Resist,** v. 10, p. 249-259, 2017. ISSN 1178-6973. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28919789 >.

WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clin Infect Dis,** v. 39, n. 3, p. 309-17, Aug 2004. ISSN 1537-6591. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15306996 >.

XIAO, M. et al. Antifungal susceptibilities of Candida glabrata species complex, Candida krusei, Candida parapsilosis species complex and Candida tropicalis causing invasive candidiasis in China: 3 year national surveillance. **J Antimicrob Chemother,** v. 70, n. 3, p. 802-10, Mar 2015. ISSN 1460-2091. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25473027 >.

ZHAO, Y. et al. Yeast identification by sequencing, biochemical kits, MALDI-TOF MS and rep-PCR DNA fingerprinting. **Med Mycol**, Dec 2017. ISSN 1460-2709. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29228397 >.

ZICCARDI, M. et al. Candida parapsilosis (sensu lato) isolated from hospitals located in the Southeast of Brazil: Species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes. **Int J Med Microbiol,** v. 305, n. 8, p. 848-59, Dec 2015. ISSN 1618-0607. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26319940 >.

ZOHBI, R.; WEX, B.; KHALAF, R. A. Comparative proteomic analysis of a Candida albicans DSE1 mutant under filamentous and non-filamentous conditions. **Yeast,** v. 31, n. 11, p. 441-8, Nov 2014. ISSN 1097-0061. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25231799 >.

APÊNDICE – Artigos científicos publicados

frontiers in Microbiology

ORIGINAL RESEARCH
published: 05 December 2018
doi: 10.3389/fmicb.2018.02997

An Azole-Resistant *Candida parapsilosis* Outbreak: Clonal Persistence in the Intensive Care Unit of a Brazilian Teaching Hospital

*Danilo Yamamoto Thomaz[1], João Nobrega de Almeida Jr.[1,2], Glaucia Moreira Espindola Lima[3], Maína de Oliveira Nunes[3], Carlos Henrique Camargo[4], Rafaella de Carvalho Grenfell[5], Gil Benard[1] and Gilda M. B. Del Negro[1]**

[1] Laboratory of Medical Mycology—LIM-53, Clinical Dermatology Division, Hospital das Clínicas FMUSP and Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, [2] Central Laboratory Division—LIM-03, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, [3] Laboratory of Clinical Analyzes, Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil, [4] Bacteriology Center, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil, [5] Department of Biophysics, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:
John W. A. Rossen, University Medical Center Groningen, Netherlands

Reviewed by:
Anuradha Chowdhary, Vallabhbhai Patel Chest Institute (VPCI), India
Jean-ralph Zahar, Hôpital Avicenne, France

***Correspondence:**
Gilda M. B. Del Negro
gildadelnegro@gmail.com

Specialty section:
This article was submitted to Infectious Diseases, a section of the journal Frontiers in Microbiology

Received: *07 August 2018*
Accepted: *20 November 2018*
Published: *05 December 2018*

Citation:
Thomaz DY, de Almeida JN Jr, Lima GME, Nunes MO, Camargo CH, Grenfell RC, Benard G and Del Negro GMB (2018) An Azole-Resistant Candida parapsilosis Outbreak: Clonal Persistence in the Intensive Care Unit of a Brazilian Teaching Hospital. Front. Microbiol. 9:2997. doi: 10.3389/fmicb.2018.02997

The incidence of candidemia by the *Candida parapsilosis* complex has increased considerably in recent decades, frequently related to use of indwelling intravascular catheters. The ability of this pathogen to colonize healthcare workers (HCW)' hands, and to form biofilm on medical devices has been associated with the occurrence of nosocomial outbreaks and high mortality rates. Fluconazole has been the leading antifungal drug for the treatment of invasive candidiasis in developing countries. However, azole-resistant *C. parapsilosis* isolates are emerging worldwide, including in Brazil. Few studies have correlated outbreak infections due to *C. parapsilosis* with virulence factors, such as biofilm production. We thus conducted a microbiological investigation of *C. parapsilosis* complex isolates from a Brazilian teaching hospital. Additionally, we identified a previously unrecognized outbreak caused by a persistent azole-resistant *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) clone in the intensive care unit (ICU), correlating it with the main clinical data from the patients with invasive candidiasis. The molecular identification of the isolates was carried out by PCR-RFLP assay; antifungal susceptibility and biofilm formation were also evaluated. The genotyping of all *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) was performed by microsatellite analysis and the presence of *ERG11* mutations was assessed in the azole non-susceptible isolates. Fourteen *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) isolates were recovered from patients with invasive candidiasis, eight being fluconazole and voriconazole-resistant, and two intermediate only to fluconazole (FLC). All non-susceptible isolates showed a similar pattern of biofilm formation with low biomass and metabolic activity. The A395T mutation in *ERG11* was detected exclusively among the azole-resistant isolates. According to the microsatellite analysis, all azole non-susceptible isolates from the adult ICU were clustered together indicating the occurrence of an outbreak. Regarding clinical data, all patients infected by the clonal non-susceptible isolates and none of the patients infected by the susceptible isolates had been previously exposed to corticosteroids (p=0.001), while the remaining characteristics showed no

Received: 24 January 2018 | Revised: 28 February 2018 | Accepted: 24 March 2018
DOI: 10.1111/tid.12908

CASE REPORT

WILEY

Lomentospora prolificans fungemia in hematopoietic stem cell transplant patients: First report in South America and literature review

Fernando D. Penteado[1] | Nadia Litvinov[1] | Jaques Sztajnbok[1] | Danilo Y. Thomaz[2] | Antonio M. dos Santos[2] | Dewton M. Vasconcelos[3] | Adriana L. Motta[4] | Flávia Rossi[4] | Juliana F. Fernandes[1] | Heloisa Helena S. Marques[1] | Gil Benard[2,3] | João N. de Almeida Jr[4]

[1]Children's Institute, Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

[2]Laboratory of Medical Mycology - LIM-53, Clinical Dermatology Division, Hospital das Clínicas da FMUSP and Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

[3]Laboratory of Medical Investigation in Dermatology and Immunodeficiencies - LIM-56, Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

[4]Central Laboratory Division-LIM03, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Correspondence
João Nobrega de Almeida Jr, Laboratorio de Microbiologia, DLC, PAMB, Instituto Central, São Paulo, Brazil.
Email: jnaj99@gmail.com

Abstract

Lomentospora prolificans is a filamentous fungus and an emerging pathogen in immunocompromised patients. It is encountered most commonly in Australia, Spain, and USA. We described the first case of *Lomentospora prolificans* fungemia in South America. The patient was a hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) recipient who developed the infection 37 days after stem cells infusion. In addition, we performed a literature review of invasive lomentosporiosis in HSCT patients.

KEYWORDS

Brazil, Fungemia, *Lomentospora prolificans*, stem cell transplantation

1 | INTRODUCTION

Lomentospora prolificans (formerly *Scedosporium prolificans*, *Scedosporium inflatum*) is a ubiquitous melanized mold first described in 1974 and found most in the soil, potted plants, sewage, and polluted water.[1] First recognized as a human pathogen in 1984, many infectious syndromes have been related to *L. prolificans*, depending on the host susceptibility and route of acquisition.[2] In immunocompetent hosts, localized infections (skin, eye, ear, and osteoarticular) have been described, generally following surgery or trauma.[3] *L. prolificans* can also colonize the respiratory tract of cystic fibrosis patients and may negatively influence the outcome of lung transplantation.[4] In immunocompromised individuals, *L. prolificans* is considered the most common agent of disseminated phaeohyphomycosis, which is associated with high mortality despite antifungal therapy.[2,5,6] Although *L. prolificans* is considered an emerging pathogen, it seems to be restricted to some countries in Europe (Spain, France, and Germany), Australia, and some Southern states of United States of America.[1,5-8] In South America, only a few cases of localized infections have been reported.[9-11] We report a *L. prolificans* disseminated infection in a patient from Brazil that underwent hematopoietic stem cell transplantation and conducted a literature review.

2 | CASE REPORT AND METHODS

A 17-year-old boy with X-linked chronic granulomatous disease received an allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

© 2018 John Wiley & Sons A/S.
Published by John Wiley & Sons Ltd

Nobrega de AlmeidaJr *et al. Emerging Microbes & Infections* (2018)7:24
DOI 10.1038/s41426-017-0015-8

Emerging Microbes & Infections

CORRESPONDENCE Open Access

Candida blankii: an emergent opportunistic yeast with reduced susceptibility to antifungals

João Nobrega de Almeida, Jr[1,2], Silvia V. Campos[3], Danilo Y. Thomaz[1], Luciana Thomaz[4], Renato K. G. de Almeida[1], Gilda M. B. Del Negro[1], Viviane F. Gimenes[2], Rafaella C. Grenfell[5], Adriana L. Motta[1], Flávia Rossi[1] and Gil Benard[2]

In 1968, Buckley and van Uden described the non-fermenting yeast *Candida blankii* (*C. blankii*) found in the organs of a mink[1]. Until recently, this microorganism had only been the subject of biotechnological research[2,3]. However, in 2015, Zaragoza et al. reported a 14-year-old male patient with cystic fibrosis (CF), who had pulmonary exacerbations with repeated isolation of *C. blankii* from respiratory samples[4]. This finding raised the hypothesis that this yeast could be a relevant pathogen for CF patients[4].This paper corroborates this initial observation by describing a bloodstream infection by *C. blankii* in a CF patient who underwent lung transplantation.

A 16-year-old female with CF was referred to our lung transplant center in March 2016. Her recent medical history was notable for severe pulmonary exacerbations, which required prolonged hospitalization and mechanical ventilation. Her most recent preadmission sputum cultures collected by the referring hospital showed positive for *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia cepacia, Aspergillus sp.*, including positive samples for *Candida* sp. (negative germ tube, isolates not available) collected after itraconazole therapy (200 mg/day) used to treat the pulmonary exacerbations. In June 2016, she underwent bilateral lung transplantation at the Hospital das Clínicas, University of São Paulo, Brazil, under antimicrobial prophylaxis consisting of teicoplanin, meropenem, cotrimoxazole and liposomal amphotericin B (L-AMB, 200 mg/day). However, during the infusion of L-AMB, the patient presented hypotension, leading to the discontinuation of the antifungal treatment. On the first postoperative day (POD), the patient developed sepsis, and so blood cultures were collected (Bactec aerobic and anaerobic/Plus, BD). Peripheral and central venous catheter blood cultures became positive for yeasts after 41 (anaerobic bottle) and 72 (aerobic bottles) hours of incubation, respectively. On the third POD, due to the provisional report of yeasts on blood cultures, micafungin (100 mg/day) was prescribed. Blood cultures collected 72 h after the introduction of micafungin became negative; transthoracic echocardiography and fundoscopic eye exam did not show any significant results. The yeast isolate showing pale pink colonies on chromogenic medium (BBL CHROMagar, BD, Sparks, USA) were not identified by MALDI-TOF mass spectrometry (Vitek MS™, IVD library, bioMérieux, Marcy-L´Etoile, France). Because clinical improvement was observed, micafungin was maintained for 14 days. The patient was discharged on the 39th POD.

The clinical isolate (HCFMUSP01) was later identified as *C. blankii* after sequence analysis of the internal transcribed spacer 1 (ITS1, GenBank accession no. MF573785) and D1D2 region from the 26S subunit (D1D2, GenBank accession no. MF940140) of the rRNA[5,6]. Since little is known about this microorganism as an opportunistic pathogen, we further characterized this species in terms of genetic and proteomic diversity, antifungal susceptibility, biofilm production, and in vivo virulence by analyzing the clinical isolate and the strains (IIC1M.1, BX90C, BX81A) from the yeast collection at the Federal University of Minas Gerais, Brazil.

Correspondence: João N. de Almeida (jnaj99@gmail.com)
[1]Central Laboratory Division– LIM-03, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo 05403-010, Brazil
[2]Laboratory of Medical Mycology - LIM-53, Hospital das Clínicas FMUSP and Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo 05403-000, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s) 2018
Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

JOURNAL OF THE SÃO PAULO INSTITUTE OF TROPICAL MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

http://dx.doi.org/10.1590/S1678-9946201759075

Identification and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from the urine of patients in a university hospital in Brazil

Gláucia Moreira Espíndola Lima[1], Maína de Oliveira Nunes[1], Marilene Rodrigues Chang[2], Rosianne Assis de Sousa Tsujisaki[2], Joslaine de Oliveira Nunes[2], Cleison Ledesma Taira[3], Danilo Yamamoto Thomaz[3], Gilda Maria Bárbaro Del Negro[3], Rinaldo Pôncio Mendes[4], Anamaria Mello Miranda Paniago[5]

ABSTRACT

The aim of this study was to identify *Candida* spp. isolated from candiduria episodes at a tertiary hospital in the Midwest region of Brazil, and to determine their susceptibility profiles to antifungal compounds. From May 2011 to April 2012, *Candida* spp. isolated from 106 adult patients with candiduria admitted to the University Hospital of the Federal University of Mato Grosso do Sul were evaluated. Both, species identification and susceptibility testing with fluconazole-FLC, voriconazole-VRC, and amphotericin B-AmB were carried out using the Vitek 2. To discriminate species of the *C. parapsilosis* complex, a RAPD-PCR technique using the RPO2 primer was performed. From the total of 106 isolates, 42 (39.6%) *C. albicans* and 64 (60.4%) *Candida* non-*albicans* (CNA) - 33 *C. tropicalis*, 18 *C. glabrata*, 5 *C. krusei*, 4 *C. parapsilosis* sensu stricto, 2 *C. kefyr*, 1 *C. lusitaniae*, and 1 *C. guilliermondii* were identified. All isolates were susceptible to AmB and VRC, whereas all *C. glabrata* isolates presented either resistance (5.6%) or dose-dependent susceptibility (94.4%) to FLC. The study of *Candida* spp. and their resistance profiles may help in tailoring more efficient therapeutic strategies for candiduria.

KEYWORDS: Urine infections. Antifungal agents. Nosocomial candiduria. Candida species. Antifungal susceptibility

[1]Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian, Laboratório de Análises Clínicas, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

[2]Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

[3]Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Laboratório de Micologia Médica (LIM-53), São Paulo, São Paulo, Brazil

[4]Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina, Botucatu, São Paulo, Brazil

[5]Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

Correspondence to: Anamaria Mello Miranda Paniago
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina, Av. Senador -Fillinto, Muller, 355, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brazil
Tel: +55 67 3345-7804

E-mails: anamaria.paniago@ufms.br; anapaniago@yahoo.com.br

Received: 21 April 2017

Accepted: 22 August 2017

INTRODUCTION

The isolation of *Candida* spp. from urine cultures may indicate colonization or urinary tract infection (candiduria), but it may also be a sign of severe systemic candidiasis or candidemia[1-3]. *Candida* spp. can reach the urinary tract via the ascending route, from the urethra to the bladder, or by hematogenous spread, as *Candida* spp. is filtered by the kidneys and excreted in the urine.

The ability to form biofilm and the production of hydrolytic enzymes, which disrupt cell membranes, facilitate the spread of yeasts in the host, causing infection[4-6]. Lesions in the renal pelvis, tubules, and ureters, and formation of a "fungus ball", which blocks and causes injury to the urinary system, are the main complications associated with candiduria, while development of candidemia is unusual[1,4,7].

The source of candidiasis in humans is mostly endogenous, as *Candida* spp. are commensals in the digestive tract of a vast range of healthy people. Some conditions allow these commensal yeasts to become opportunistic, resulting in candidiasis in

Two cases of *M. arupense* infection have been reported in immunosuppressed persons, both in HIV/AIDS patients (manifesting as pulmonary infection in 1 patient and disseminated disease in the other) (*6*). In our study, the immunocompromised patient with *M. arupense* tenosynovitis received canakinumab, a relatively new biologic agent with a prolonged selective IL-1 β-blockade. Even though the contribution of canakinumab in this case is confounded by concomitant immune deficiencies (natural killer cell deficiency, high-dose corticosteroids), the temporal association between initiation of canakinumab and the onset of symptoms raises concern of a possible association. Animal studies have shown that IL-1 plays a key role in host resistance to mycobacterial infections by regulating Th1/Th2 immune responses and inducing granuloma formation (*9*). Clinical trials and systematic reviews assessing the safety of IL-1 inhibitors, including anakinra, rilonacept, and canakinumab, have not shown that these drugs lead to an increased risk of tuberculosis or other mycobacterial infections (*10*). Nonetheless, our report provides increased evidence that *M. arupense* is an emerging cause of tenosynovitis and that it is potentially associated with immunosuppression.

References

1. Cloud JL, Meyer JJ, Pounder JI, Jost KC Jr, Sweeney A, Carroll KC, et al. *Mycobacterium arupense* sp. nov., a non-chromogenic bacterium isolated from clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiol. 2006;56:1413–8. http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.64194-0
2. Tsai TF, Lai CC, Tsai IC, Chang CH, Hsiao CH, Hsueh PR. Tenosynovitis caused by *Mycobacterium arupense* in a patient with diabetes mellitus. Clin Infect Dis. 2008;47:861–3. http://dx.doi.org/10.1086/591281
3. Neonakis IK, Gitti Z, Kontos F, Baritaki S, Petinaki E, Baritaki M, et al. Mycobacterium arupense pulmonary infection: antibiotic resistance and restriction fragment length polymorphism analysis. Indian J Med Microbiol. 2010;28:173–6. http://dx.doi.org/10.4103/0255-0857.62502
4. Senda H, Muro H, Terada S. Flexor tenosynovitis caused by *Mycobacterium arupense*. J Hand Surg Eur Vol. 2011;36:72–3. http://dx.doi.org/10.1177/1753193410381825
5. Legout L, Ettahar N, Massongo M, Veziris N, Ajana F, Beltrand E, et al. Osteomyelitis of the wrist caused by *Mycobacterium arupense* in an immunocompetent patient: a unique case. Int J Infect Dis. 2012;16:e761–2. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2012.05.007
6. Heidarieh P, Hashemi-Shahraki A, Khosravi AD, Zaker-Boustanabad S, Shojaei H, Feizabadi MM. *Mycobacterium arupense* infection in HIV-infected patients from Iran. Int J STD AIDS. 2013;24:485–7. http://dx.doi.org/10.1177/0956462412472818
7. Lee SJ, Hong SK, Park SS, Kim EC. First Korean case of *Mycobacterium arupense* tenosynovitis. Ann Lab Med. 2014;34:321–4. http://dx.doi.org/10.3343/alm.2014.34.4.321
8. Beam E, Vasoo S, Simner PJ, Rizzo M, Mason EL, Walker RC, et al. *Mycobacterium arupense* flexor tenosynovitis: case report and review of antimicrobial susceptibility profiles for 40 clinical isolates. J Clin Microbiol. 2014;52:2706–8. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00277-14
9. Mayer-Barber KD, Barber DL, Shenderov K, White SD, Wilson MS, Cheever A, et al. Caspase-1 independent IL-1 beta production is critical for host resistance to *Mycobacterium tuberculosis* and does not require TLR signaling in vivo. J Immunol. 2010;184:3326–30. http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0904189
10. Cantarini L, Lopalco G, Caso F, Costa L, Iannone F, Lapadula G, et al. Effectiveness and tuberculosis-related safety profile of interleukin-1 blocking agents in the management of Behçet's disease. Autoimmun Rev. 2015;14:1–9. http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2014.08.008

Address for correspondence: Fiorella Krapp Lopez, Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Northwestern University, 645 N Michigan Ave, Ste 900, Chicago, IL 60611, USA; email: fiorella.krapp@northwestern.edu

Candida haemulonii Complex Species, Brazil, January 2010–March 2015

João Nobrega de Almeida, Jr., João Guilherme Pontes Lima Assy, Anna S. Levin, Gilda M.B. Del Negro, Mauro C. Giudice, Marcela Pullice Tringoni, Danilo Yamamoto Thomaz, Adriana Lopes Motta, Edson Abdala, Ligia Camara Pierroti, Tania Strabelli, Ana Lucia Munhoz, Flávia Rossi, Gil Benard

Author affiliation: Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

DOI: http://dx.doi.org/10.3201/eid2203.151610

To the Editor: The epidemiology of yeast infections is evolving, and species in the *Candida haemulonii* complex have been identified as a cause of candidiasis (*1*). In 2012, *C. haemulonii* complex was reclassified as 2 species and 1 variety: *C. haemulonii* (former group I), *C. duobushaemulonii* (former group II) and *C. haemulonii* var. *vulnera* (*1*).

Despite the growing knowledge about the biology and clinical relevance of these pathogens, species-specific data comparing clinical and microbiological aspects are lacking. We describe the clinical and microbiological characteristics of patients from 5 hospitals in São Paulo, Brazil, whose cultures were positive for the *C. haemulonii* complex species.

During January 2010–March 2015, samples from case-patients in 5 hospitals affiliated with the University of São Paulo were cultured; samples positive for *C. haemulonii* were further analyzed. Clinical and epidemiologic data were retrospectively collected. Species identification of the first isolate from each patient was made by sequencing the internal transcribed spacer region of the rRNA gene (*2*). Sequence similarity searches were done by using BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Antifungal susceptibility testing was performed by using the Clinical

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY | Journal of Clinical Microbiology

Does the Capsule Interfere with Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*?

Danilo Y. Thomaz,[a] Rafaella C. Grenfell,[b] Monica S. M. Vidal,[a] Mauro C. Giudice,[a] Gilda M. B. Del Negro,[a] Luiz Juliano,[b] Gil Benard,[a] João N. de Almeida Júnior[a,c]

Laboratory of Medical Mycology, LIM-53, Hospital das Clínicas FMUSP and Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil[a]; Department of Biophysics, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil[b]; Central Laboratory Division, LIM-03, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil[c]

We described the impact of the capsule size for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* identification at the species level by Bruker matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). After experimental capsule size modulation, we observed that reducing the capsule size resulted in improved identification by Bruker MALDI-TOF MS across all of the reference strains analyzed.

Cryptococcus neoformans and *Cryptococcus gattii* are relevant species among the pathogenic basidiomycetous yeasts responsible for infection in humans (1). These organisms usually produce a polysaccharide capsule that acts as an important virulence factor against the host's defenses (2). Besides its epidemiological importance, species differentiation in this genus has major clinical relevance since patients with central nervous system (CNS) infection by *C. gattii* have a higher risk of neurological complications, need a more prolonged course of induction antifungal therapy, and have poorer prognoses than those with *C. neoformans* infections (3, 4).

Recently, matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has been shown to be a precise technology for *Cryptococcus* species identification (ID), replacing conventional and time-consuming phenotypic methods and providing an alternative to expensive and labor-intensive molecular techniques (5, 6). However, during routine practice in our clinical microbiology laboratory, we observed that some *Cryptococcus* isolates with prominent capsule sizes had low discriminatory ID when using Bruker MALDI-TOF MS analysis. These isolates required the application of old phenotypic methods, which delayed the release of the final result. This led us to investigate the impact of cryptococcal capsule size in correct species ID by Bruker MALDI-TOF MS analysis.

For this purpose, reference strains of the eight genotypes of *C. neoformans* and *C. gattii*, WM148 (serotype A, VNI), WM626 (serotype A, VNII), WM 628 (serotype AD, VNIII), WM629 (serotype D, VNIV), WM179 (serotype B, VGI), WM178 (serotype B, VGII), WM161 (serotype B, VGIII), and WM779 (serotype C, VGIV), were subjected to capsule size modulation according to previously described methods (7, 8). Briefly, 2 ml of capsule growth-inducing medium (CGIM) (Sabouraud dextrose broth [BD, Franklin Lakes, NJ, USA] diluted 10 times with sterile water, pH 7.3) containing 2×10^6 yeast cells was incubated at 37°C with shaking. In an attempt to increase the variability in capsule size, all strains were subjected to a prolonged incubation in CGIM (up to 28 days) and were evaluated simultaneously on days 2, 3, 7, 14, 21, and 28, giving a total of 48 capsule size measurements (six replicates for each strain of the two *Cryptococcus* species). Next, yeast cells collected from the CGIM were submitted to a progressive capsule reduction protocol with four consecutive initial seedings in Sabouraud dextrose agar (SDA; BD) and two more seedings in the capsule-reducing medium (CRM) (SDA plus 2.9% NaCl). During this reduction assay, strains were incubated at 30°C, and each seeding had its capsule size analysis after 48 h of incubation, giving a total of 48 capsule size measurements (six replicates for each strain of the two *Cryptococcus* species, with four from the SDA medium and two from the CRM). For the capsule size measurements, yeast cell suspensions were stained with India ink and examined in an optical microscope equipped with an AxioCam MRc digital camera and AxioVision release 4.8 software (Zeiss, Oberkochen, Germany). Different slide fields were randomly chosen, and 40 to 50 cells were measured to determine the mean value of the capsule sizes. Finally, the same yeast cell suspensions were analyzed by Bruker MALDI-TOF MS. For protein extraction, the suspension was washed twice with sterile water and was centrifuged at 13,000 rpm for 10 min; the pellet was resuspended in sterile water and mixed thoroughly. Subsequently, chemical extraction with ethanol and formic acid was carried out according to the manufacturer's instructions. After the extraction protocol, 1.2 μl of the supernatant was spotted on each well of the steel target plate and was air dried and overlaid with 1.2 μl of matrix solution (saturated solution of α-cyano-4-hydroxy cinnamic acid in organic solvent [50% acetonitrile and 2.5% trifluoroacetic acid]; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Mass spectra were generated with the microflex MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) and were compared to the main spec-

Received 30 September 2015 **Returned for modification** 9 October 2015 **Accepted** 17 November 2015

Accepted manuscript posted online 9 December 2015

Citation Thomaz DY, Grenfell RC, Vidal MSM, Giudice MC, Del Negro GMB, Juliano L, Benard G, de Almeida Júnior JN. 2016. Does the capsule interfere with performance of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*? J Clin Microbiol 54:474–477. doi:10.1128/JCM.02635-15.

Editor: D. J. Diekema

Address correspondence to Danilo Y. Thomaz, dan.yamamoto.thz@hotmail.com.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

JCM
Journals.ASM.org

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Differentiation of the Dimorphic Fungal Species *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*

João Nobrega de Almeida, Jr.,[a,b] Gilda M. B. Del Negro,[b] Rafaella C. Grenfell,[c] Monica S. M. Vidal,[b] Danilo Y. Thomaz,[b] Dulce S. Y. de Figueiredo,[b] Eduardo Bagagli,[d] Luiz Juliano,[c] Gil Benard[b]

Central Laboratory Division–LIM03, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil[a]; Laboratory of Medical Mycology–LIM53, Hospital das Clínicas FMUSP, Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil[b]; Department of Biophysics, Escola Paulista Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil[c]; Department of Microbiology and Immunology, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, Brazil[d]

Isolates of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*, previously characterized by molecular techniques, were identified for the first time by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). All isolates were correctly identified, with log score values of >2.0. Thus, MALDI-TOF MS is a new tool for differentiating species of the genus *Paracoccidioides*.

Two species of the genus *Paracoccidioides* are now considered the causal agents of paracoccidioidomycosis (PCM) (1), the most important systemic mycosis in nonimmunocompromised hosts in Latin America (2, 3). Epidemiological surveys in areas where the parasite is endemic suggest that >10 million people are infected by these fungi (3). *Paracoccidioides* spp. have been recovered from human clinical samples, soil, and tissues from certain armadillo species, such as *Dasypus novemcinctus* (4).

Early observations from our group (5, 6) and others (C. J. Fontes and A. P. Vicentini, unpublished data) have reported a lack of reactivity to *Paracoccidioides brasiliensis* antigens in routine serological assays by sera from PCM patients living in areas of Brazil outside the southern and southeastern regions endemic for the parasite. These observations suggest that fungi from different regions endemic for the parasite might present significant antigenic differences, and these differences have only recently been elucidated. Multilocus phylogenetic analysis showed that *P. brasiliensis*, which was previously considered the single causal agent of PCM, in fact comprises a complex of cryptic species (7, 8), one of which was separated into a very divergent phylogenetic branch and is currently being proposed as a new species, *Paracoccidioides lutzii* sp. nov. (9). This new species appears to occur in the central, southwestern, and northwestern regions of Brazil, but the ecology, boundaries, and specific clinical aspects of infections related to *P. lutzii* remain unclear (9). For example, a recent report identified a *P. lutzii*-like isolate in a PCM patient who lived only in the southern and southeastern areas endemic for the parasite, and the identification of this isolate required the utilization of molecular techniques (10). Although molecular techniques are able to accurately identify the two *Paracoccidioides* species, these methods are time-consuming and labor-intensive.

Thus, only technically accessible routine species differentiation can provide the proper tools to epidemiologists and clinicians to address the unresolved issues of PCM. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) has been successfully applied in clinical laboratories worldwide and has also provided a rapid and accurate alternative methodology for fungal identification (11–13). The aim of this

TABLE 1 *Paracoccidioides* strains and their identification by MALDI-TOF mass spectrometry according to the newly created MSP library

Strain name	Origin	Best match log score for main spectra of:	
		P. brasiliensis Pb18	*P. lutzii* Pb01
P. brasiliensis			
D03	Southeast Brazil	2.283	0.805
T15LN1	Southeast Brazil	2.502	0.949
Pb113	North Brazil	2.163	0.946
Pb339	Brazil	2.247	1.297
Pbdog	South Brazil	2.483	1.512
Pb262	Southeast Brazil	2.368	1.953
Pb927	Uruguay	2.537	1.643
Pb03	Southeast Brazil	2.287	1.685
BACR	Colombia	2.455	1.187
BAT	Southeast Brazil	2.470	1.722
CNH	Colombia	2.381	1.736
SMA	Southeast Brazil	2.382	1.487
CA	Colombia	2.114	0.718
DM	Southeast Brazil	2.353	1.637
192	Southeast Brazil	2.362	1.327
P. lutzii			
Pb8334	Central-West Brazil	1.452	2.107
1578	Central-West Brazil	1.936	2.641
Pb66	Central-West Brazil	1.556	2.590
EE1	Central-West Brazil	1.663	2.022
ED01	Central-West Brazil	1.722	2.419

Received 3 October 2014 **Returned for modification** 17 October 2014 **Accepted** 21 January 2015

Accepted manuscript posted online 28 January 2015

Citation Nobrega de Almeida J, Jr, Del Negro GMB, Grenfell RC, Vidal MSM, Thomaz DY, de Figueiredo DSY, Bagagli E, Juliano L, Benard G. 2015. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for differentiation of the dimorphic fungal species *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. J Clin Microbiol 53:1383–1386. doi:10.1128/JCM.02847-14.

Editor: D. W. Warnock

Address correspondence to João Nobrega de Almeida, Jr., jnaj99@gmail.com.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.02847-14

Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo
56(6):517-524, November-December, 2014
doi: 10.1590/S0036-46652014000600011

HIV AND HCV COINFECTION: PREVALENCE, ASSOCIATED FACTORS AND GENOTYPE CHARACTERIZATION IN THE MIDWEST REGION OF BRAZIL

Solange Zacalusni FREITAS(1), Sheila Araújo TELES(2) Paulo Cesar LORENZO(1), Marco Antonio Moreira PUGA(1), Tayana Serpa Ortiz TANAKA(1), Danilo Yamamoto THOMAZ(1), Regina Maria Bringel MARTINS(2), Angelita Fernandes DRUZIAN(1), Andréa Siqueira Campos LINDENBERG(1), Marina Sawada TORRES(3), Sérgio A. PEREIRA(4), Livia Melo VILLAR(4), Elisabete LAMPE(4) & Ana Rita Coimbra MOTTA-CASTRO(1,5)

SUMMARY

A cross-sectional study on prevalence, associated factors and genotype distribution of HCV infection was conducted among 848 HIV-infected patients recruited at reference centers in the Midwest Region of Brazil. The prevalence rate of HIV-HCV coinfection was 6.9% (95% CI: 5.2 to 8.6). In multivariable analysis, increasing age, use of illicit drugs (injection and non-injection), a history of blood transfusion before 1994, and the absence of a steady partnership were significant independent associated factors for HIV-HCV coinfection. The phylogenetic analysis based on the NS5B region revealed the presence of two major circulating genotypes of HCV: genotypes 1 (58.3%) and 3 (41.7%). The prevalence of HIV-HCV coinfection was lower than those reported in studies conducted with HIV-infected patients in different regions of Brazil, due to the fact that illicit drug use is not a frequent mode of HIV transmission in this region of Brazil. Serologic screening of HIV-patients for HCV before initiating antiretroviral treatment, a comprehensive identification of associated factors, and the implementation of effective harm reduction programs are highly recommended to provide useful information for treatment and to prevent HCV coinfection in these patients.

KEYWORDS: Coinfection; HCV; HIV; Prevalence.

INTRODUCTION

Chronic coinfection with the hepatitis C virus (HCV) is common in the HIV-infected population. An estimated 34 million people are currently infected with Human Immunodeficiency Virus (HIV) worldwide, and approximately 20-30% of HIV-positive individuals are coinfected with HCV due to the similarity in the transmission routes[49].

However, rates of HIV-HCV coinfection vary widely in different population groups depending on the geographical region, risk factors, age of infection, modes of transmission and types of exposure. In the studies conducted in Brazil, the prevalence of HIV-HCV coinfection ranged from 3.3% to 82.4% with an average of 20.3%[19].

The survival of HIV infected patients has markedly improved since the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) and deaths from AIDS-related causes have declined. However, several studies have shown that the liver disease caused by chronic hepatitis B and hepatitis C coinfections has emerged as one of the leading causes of mortality[47]. Several studies have shown that HIV-HCV coinfected patients are at increased risk of more rapid progress to cirrhosis, end-stage liver disease and hepatocellular carcinoma[40,43,48]. Universal hepatitis C screening in HIV-infected patients (prior to starting HAART) is highly recommended to suit the selection of candidates for therapy and proper use of HCV therapy and novel treatment options in HIV-infected patients with chronic hepatitis C.

HCV is classified into seven main genotypes (1-7) and multiple subtypes based on sequence data[36]. The prevalence of different HCV genotypes and subtypes varies according to specific geographic areas and/or the route of transmission[1,20,28]. The genotype of HCV is a major predictive factor for natural and in HCV infection treatment evolution. In Brazil, little is known about viral interactions in multiple hepatitis coinfections, and the association between genotypes of HCV and different transmission risk factors, especially in areas with low HIV and HCV prevalence.

This is the first study reporting the epidemiological and molecular characterization of HIV-HCV coinfection in Midwestern Brazil. This study was conducted to investigate the prevalence of HIV-HCV coinfection, associated factors and also to gain insight into the molecular epidemiology for HCV infection in the HIV-infected patients in Midwestern Brazil.

(1) Federal University of Mato Grosso do Sul, Av. Senator Filinto Mueller, Vila Ipiranga, Campo Grande, MS, Brazil.
(2) Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil.
(3) Hematology and Hemotherapy Center of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil.
(4) Laboratory of Viral Hepatitis, IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
(5) FIOCRUZ, Campo Grande, MS, Brazil.
Correspondence to: Solange Zacalusni Freitas, Av. Senador Filinto Mueller, s/n, CCBS, Cidade Universitária, 79070-900 Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Phone: +55 67 3345-3166. E-mail: zacalusni@yahoo.com.br