UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Perfil fenotípico e genotípico de isolados de *Candida* spp. em episódios de candidemia no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP-USP

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Heliara Maria Spina Canela

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Eliana da Silva Ferreira

Ribeirão Preto
2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Canela, Heliara Maria Spina

Perfil fenotípico e genotípico de isolados de *Candida* spp. em episódios de candidemia no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP-USP. Ribeirão Preto, 2017.

117 p.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP – USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Ferreira, Márcia Eliana da Silva

1. *Candida* spp. 2. Fatores de virulência. 3. Suscetibilidade aos antifúngicos. 4. Candidemia. 5. Genotipagem. 6. Epidemiologia

FOLHA DE APROVAÇÃO

Heliara Maria Spina Canela

Perfil fenotípico e genotípico de isolados de *Candida* spp. em episódios de candidemia no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP-USP

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Eliana da Silva Ferreira

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico

Aos meus pais, por todo amor, confiança e apoio.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Márcia Eliana da Silva Ferreira, por apoiar e incentivar minhas ideias e por tornar possível a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto Martinez, pela colaboração, cessão dos isolados clínicos e auxílio em vários pontos desse trabalho.

À farmacêutica Lúcia Helena Vitali, pelo auxílio na cessão dos isolados clínicos.

Ao Prof. Dr. Harnoldo Coelho, pelo auxílio na análise dos dados epidemiológicos.

Ao técnico Luciano Akira Takami, pela ajuda inestimável em várias etapas desse trabalho.

À minha amiga, Miliane Rodrigues Frazão, por toda a ajuda com esse trabalho, principalmente com as técnicas de tipagem molecular.

À minha companheira de projetos com *Candida* spp., Bárbara Cardoso, por toda a ajuda com as técnicas desse trabalho.

Ao amigo Sandro Hurtado, pela tradução do Resumen.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – pela bolsa (Processo 2013/23485-0) e auxílio financeiro (2014/10628-0) concedidos.

À Profa. Dra. Juliana Pfrimer Falcão, pela disponibilização de seu laboratório.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e todos os seus professores e funcionários.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – pelos primeiros meses de bolsa concedidos.

À CRMVS - Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária – Fundação Oswaldo Cruz, pela doação das linhagens de referência *C. metapsilosis* INCQS 40329 (ATCC 96143) e *C. dubliniensis* INCQS 40172 (ATCC MYA-646).

À amiga do laboratório, Thaysa Ciofi, pela amizade.

Aos meus pais, pelo apoio, amor e confiança.

Ao meu noivo, Leopoldo, pelo apoio, paciência e amor.

Ao meu irmão, Renan, e minha família, pelos bons momentos.

A Deus, por orientar meu caminho nas horas de dificuldade.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

"Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante"
(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

CANELA, H.M.S. **Perfil fenotípico e genotípico de isolados de *Candida* spp. em episódios de candidemia no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP-USP**. 2017. 117 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

As leveduras do gênero *Candida* são responsáveis por 80% das infecções fúngicas sistêmicas. Nas Unidades de Terapia Intensiva, essas leveduras estão envolvidas em aproximadamente 17% das infecções. Essas doenças aumentam o tempo de hospitalização, resultando em aumento de gastos; além disso, as infecções sistêmicas causadas por *Candida* spp. apresentam elevada taxa de mortalidade. A candidemia representa grande parte das candidíases invasivas e sua epidemiologia pode variar de acordo com o local de estudo, práticas hospitalares e país estudado. Assim, o objetivo do presente estudo foi caracterizar 79 isolados de candidemia de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto de junho de 2014 a novembro de 2015. Para isso, os isolados foram submetidos a testes de microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima dos antifúngicos anfotericina B, caspofungina, fluconazol e voriconazol; testes para avaliar a produção de fatores de virulência: hemolisina, fosfolipase e proteinase; e genotipagem por *Pulsed-field Gel Electrophoresis*, *Microsatellite Length Polymorphism* e *Multilocus Sequence Typing*. Como esperado, *C. albicans* foi a espécie predominante (44%), seguida por *C. glabrata* (19%), *C. tropicalis* (19%), *C. parapsilosis* (14%) e *C. orthopsilosis* (4%). Os isolados, em geral, não apresentaram resistência aos antifúngicos testados. Entretanto, todos os isolados de *C. glabrata* e um isolado de *C. parapsilosis* apresentaram-se suscetíveis dose-dependentes ao fluconazol, três isolados de *C. glabrata* foram suscetíveis dose-dependentes à caspofungina, um isolado de *C. albicans* foi suscetível dose-dependente ao voriconazol e um isolado de *C. albicans* apresentou-se resistente ao fluconazol e voriconazol. Os isolados da espécie *C. albicans* foram os principais produtores de fatores de virulência. Os resultados dos testes de genotipagem indicaram a espécie *C. glabrata* apresentou menor variabilidade genética. A incidência de candidemia no período estudado foi de

1,52/1000 admissões e a taxa de mortalidade foi de 52%. O principal fator de risco foi antibioticoterapia (86%), seguido de sonda vesical (68%), acesso venoso central (60%), cirurgias (54%), nutrição parenteral (42%) e neutropenia (14%). Das doenças de base, o câncer sólido estava presente em 28% dos pacientes, seguido por diabetes (23%), doenças gastrointestinais (20%) e doenças hepáticas (15%). Finalmente, os resultados obtidos são úteis para o melhor entendimento do perfil da candidemia no hospital estudado e podem auxiliar na escolha da terapia empírica para essa doença.

Palavras-chave: *Candida* spp.. Fatores de virulência. Suscetibilidade aos antifúngicos. Candidemia. Genotipagem. Epidemiologia.

ABSTRACT

CANELA, H.M.S. **Phenotypic and genotypic profile of *Candida* spp. strains in candidemia episodes of Hospital das Clínicas of Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP-USP.** 2017. 117 p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Candida spp. are responsible for 80% of all systemic fungal infections. In the Intensive Care Units, these yeasts are present in 17% of all infections. These diseases result in extended hospitalization, leading to increased hospital costs; besides, the systemic infections caused by *Candida* spp. are related to high mortality rates. Candidemia is the main invasive candidiasis and its epidemiology may vary among study location, local healthcare practices and studied countries. Therefore, the aim of this study was to characterize 79 bloodstream isolates from patients of the Hospital das Clínicas of Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, from June 2014 to November 2015. The Minimal Inhibitory Concentration of amphotericin B, caspofungin, fluconazole and voriconazole was determined using broth microdilution; virulence factor production was analyzed; and the strains were typed by Pulsed-field Gel Electrophoresis, Microsatellite Length Polymorphism and Multilocus Sequence Typing. As expected, *C. albicans* was the most predominant species (44%), followed by *C. glabrata* (19%), *C. tropicalis* (19%), *C. parapsilosis* (14%) and *C. orthopsilosis* (4%). In general, the strains did not show resistance to the tested antifungals. However, all *C. glabrata* and one *C. parapsilosis* isolates exhibited dose-dependent susceptibility to fluconazole, three *C. glabrata* isolates exhibited dose-dependent susceptibility to caspofungin, one *C. albicans* isolate was susceptible dose-dependent to voriconazole and one *C. albicans* isolate was resistant to fluconazole and voriconazole. *Candida albicans* strains were the main virulence attributes producer. *C. glabrata* isolates showed less genetic variability than the others studied species. The candidemia incidence was 1.52 per 1,000 admissions, and the mortality rate was 52%. The main risk factors were antibiotic therapy (86%), followed by urinary catheterization (68%), central venous access (60%), surgical procedures (54%), parenteral nutrition (42%) and neutropenia (14%). The most common underlying diseases were solid cancer (28%), diabetes (23%), gastrointestinal

disease (20%) and liver disease (15%). Finally, the results are useful to bring a better comprehension of candidemia in the studied hospital and can help in the identification of efficient empirical treatment strategies.

Keywords: *Candida* spp.. Virulence factors. Antifungal susceptibility. Candidemia. Genotyping. Epidemiology.

RESUMEN

CANELA, H.M.S. **Perfil fenotípico y genotípico de los aislados de *Candida* spp. en episodios de candidemia en el Hospital de la Facultad de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP-USP**. 2017. 117 f. Tese (Doctorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Las levaduras del género *Candida* son responsables por 80% de las infecciones fúngicas sistémicas. En las Unidades de Terapia Intensiva, estas levaduras están involucradas en aproximadamente 17% de las infecciones. Esas enfermedades aumentan el tiempo de hospitalización, resultando en aumento de gastos; además, las infecciones sistémicas causadas por *Candida* spp. presentan elevada tasa de mortalidad. La candidemia representa gran parte de las candidiasis invasivas y su epidemiología puede variar de acuerdo al local de estudio, prácticas hospitalares y países estudiados. Así, el objetivo del presente estudio fue caracterizar 79 aislados de candidemia de pacientes internados en el Hospital de Clínicas de la Facultad de Medicina de Ribeirão Preto, de junio de 2014 a noviembre de 2015. Para esto, los aislados fueron sometidos a pruebas de microdilución en caldo para la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima de los antifúngicos anfotericina B, caspofungina, fluconazol y voriconazol; pruebas para evaluar la producción de factores de virulencia: hemolisina, fosfolipase y proteinase; y genotipage por *Pulsed-field Gel Electrophoresis*, *Microsatellite Length Polymorphism* y *Multilocus Sequence Typing*. Como esperado, *C. albicans* fue la especie predominante (44%), seguida por *C. glabrata* (19%), *C. tropicalis* (19%), *C. parapsilosis* (14%) y *C. orthopsilosis* (4%). Los aislados, en general, no presentaron resistencia a los antifúngicos probados. Entretanto, todos los aislados de *C. glabrata* y un aislado de *C. parapsilosis* fueron susceptibles dosis-dependientes al fluconazol, tres aislados de *C. glabrata* fueron susceptibles dosis-dependientes a caspofungina, un aislado de *C. albicans* fue susceptible dose-dependiente al voriconazol y un aislado de *C. albicans* se presentó resistente al fluconazol y voriconazol. Los aislados de la especie *C. albicans* fueron los principales productores de factores de virulencia. La especie *C. glabrata* presentó menor variabilidad genética. La incidencia de candidemia en el periodo estudiado fue de 1,52/1000 admisiones y la tasa de mortalidad fue de 52%. El principal factor de

riesgo fue antibioticoterapia (86%), seguido de sonda vesical (68%), acceso venoso central (60%), cirugías (54%), nutrición parenteral (42%) y neutropenia (14%). De las enfermedades de base, el cáncer sólido estuvo presente en 28% de los pacientes, seguido por diabetes (23%), enfermedades gastrointestinales (20%) y enfermedades hepáticas (15%). Finalmente, los resultados obtenidos son útiles para el mejor comprensión del perfil de la candidemia en el hospital estudiado y pueden auxiliar en la selección de la terapia empírica para esta enfermedad.

Palabras clave: *Candida* spp. Factores de virulencia. Susceptibilidad a los antifúngicos. Candidemia. Genotipage. Epidemiología.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Prevalência de <i>Candida</i> spp. obtida em diferentes estudos...	29
Figura 2 -	Eletroforese em gel de agarose demonstrando o tamanho dos fragmentos resultantes da amplificação, por PCR, utilizando-se <i>primers</i> específicos para cada espécie.....	41
Figura 3 -	Distribuição das espécies isoladas de 79 episódios de candidemia de pacientes internados no Hospital das Clínicas da FMRP-USP.....	55
Figura 4 -	Perfil de suscetibilidade dos 79 isolados de <i>Candida</i> spp. obtidos de pacientes internados no Hospital das Clínicas da FMRP – USP.....	57
Figura 5 -	Produção de fatores de virulência pelos 79 isolados de <i>Candida</i> spp. obtidos de pacientes internados no Hospital das Clínicas da FMRP – USP.....	60
Figura 6 -	Dendrograma de similaridade genética gerado a partir do perfil de bandas, obtido pela técnica de PFGE, para os 79 isolados de <i>Candida</i> spp. estudados.....	61
Figura 7 -	Dendrograma de similaridade genética, gerado a partir do polimorfismo de microssatélites, para os 35 isolados de <i>C. albicans</i> estudados.....	64
Figura 8 -	Dendrograma de similaridade genética, gerado a partir do polimorfismo de microssatélites, para os 15 isolados de <i>C. glabrata</i> estudados.....	65
Figura 9 -	Dendrograma de similaridade genética, gerado a partir do polimorfismo de microssatélites, para os 11 isolados de <i>C. parapsilosis</i> estudados.....	66
Figura 10 -	Dendrograma de similaridade genética, gerado a partir do polimorfismo de microssatélites, para os 15 isolados de <i>C. tropicalis</i> estudados.....	67
Figura 11 -	Diagrama de similaridade genética das 14 linhagens de <i>C. albicans</i> selecionadas e das linhagens depositadas no banco de dados de MLST.....	70

Figura 12 -	Dendrograma de similaridade genética, gerado por MLST, para as 14 linhagens de <i>C. albicans</i> selecionadas.....	71
Figura 13 -	Diagrama de similaridade genética das 10 linhagens de <i>C. glabrata</i> selecionadas e das linhagens depositadas no banco de dados de MLST.....	73
Figura 14 -	Dendrograma de similaridade genética, gerado por MLST, para as 10 linhagens de <i>C. glabrata</i> selecionadas.....	74
Figura 15 -	Diagrama de similaridade genética das 10 linhagens de <i>C. tropicalis</i> selecionadas e das linhagens depositadas no banco de dados de MLST.....	75
Figura 16 -	Dendrograma de similaridade genética, gerado por MLST, para as 10 linhagens de <i>C. tropicalis</i> selecionadas.....	76
Figura 17 -	Média de idade dos pacientes internados no Hospital das Clínicas da FMRP – USP, acometidos por candidemia, no período de junho de 2014 a novembro de 2015.....	77
Figura 18 -	Sexo dos pacientes internados no Hospital das Clínicas da FMRP – USP, acometidos por candidemia, no período de junho de 2014 a novembro de 2015.....	78
Figura 19 -	Alas de internação dos pacientes do Hospital das Clínicas da FMRP – USP, acometidos por candidemia, no período de junho de 2014 a novembro de 2015.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Incidência anual mundial e taxa de mortalidade das principais infecções fúngicas invasivas.....	24
Tabela 2 -	Incidência de candidemia em diferentes países e anos de estudo.....	28
Tabela 3 -	<i>Primers</i> utilizados para a confirmação, por PCR, da identificação dos isolados.....	40
Tabela 4 -	Condições dos ciclos para as reações utilizadas na identificação de <i>Candida</i> spp.....	40
Tabela 5 -	Pontos de corte utilizados nos testes de microdiluição em caldo.....	42
Tabela 6 -	Interpretação dos resultados dos testes para determinação da atividade de proteinase, fosfolipase e hemolisina.....	43
Tabela 7 -	<i>Primers</i> utilizados para a amplificação dos marcadores de microssatélite de <i>Candida</i> spp.....	47
Tabela 8 -	Condições dos ciclos para as reações de amplificação dos marcadores de microssatélite de <i>Candida</i> spp.....	48
Tabela 9 -	<i>Primers</i> utilizados para as reações de amplificação dos genes <i>housekeeping</i> de <i>Candida</i> spp., na técnica de MLST..	49
Tabela 10 -	Condições dos ciclos para as reações de amplificação dos genes <i>housekeeping</i> de <i>Candida</i> spp., utilizados na técnica de MLST.....	51
Tabela 11 -	Média e intervalo das CIMs de 79 isolados de <i>Candida</i> spp. obtidos de pacientes internados no Hospital das Clínicas da FMRP – USP.....	56
Tabela 12 -	Média e intervalo da atividade das enzimas hidrolíticas dos 79 isolados de <i>Candida</i> spp. obtidos de pacientes internados no Hospital das Clínicas da FMRP – USP.....	58
Tabela 13 -	Número dos alelos e <i>Diploid Sequence Type</i> obtidos, por MLST, para as 14 linhagens de <i>C. albicans</i> selecionadas.....	67
Tabela 14 -	Número dos alelos e <i>Sequence Type</i> obtidos, por MLST, para as 10 linhagens de <i>C. glabrata</i> selecionadas.....	71

Tabela 15 -	Número dos alelos e <i>Diploid Sequence Type</i> obtidos, por MLST, para as 10 linhagens de <i>C. tropicalis</i> selecionadas....	74
Tabela 16 -	Doenças de base e fatores de risco apresentados por pacientes acometidos por candidemia no Hospital das Clínicas da FMRP, de junho de 2014 a novembro de 2015...	79
Tabela 17 -	Relação entre características clínicas e desfecho em pacientes com candidemia internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, de junho de 2014 a novembro de 2015.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DLV	<i>Double Locus Variant</i>
DST	<i>Diploid Sequence Type</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
HC-FMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>
MLP	<i>Microsatellite Length Polymorphism</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MOPS	Ácido 3-(n-morfolino) propanosulfônico
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed-field Gel Electrophoresis</i>
q.s.p	Quantidade suficiente para
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SLV	<i>Single Locus Variant</i>
ST	<i>Sequence Type</i>
UE-HCFMRP	Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Doenças fúngicas.....	22
1.2 <i>Candida</i> spp. e candidemia.....	22
1.3 Fatores de virulência.....	27
1.4 Incidência das candidemias e prevalência das espécies de <i>Candida</i> ..	28
1.5 Diagnóstico das candidemias.....	30
1.6 Tratamento das candidemias.....	30
1.7 Testes de suscetibilidade aos antifúngicos.....	33
1.8 Técnicas de genotipagem.....	34
1.9 Justificativa do trabalho.....	35
2. OBJETIVOS.....	36
2.1 Objetivo geral.....	37
2.2 Objetivos específicos.....	37
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1 Hospital envolvido no estudo.....	39
3.2 Isolados.....	39
3.3 Confirmação da identificação das espécies.....	39
3.4 Testes de sensibilidade aos antifúngicos.....	41
3.5 Pesquisa de proteinase.....	43
3.6 Pesquisa de fosfolipase.....	44
3.7 Pesquisa de hemolisina.....	44
3.8 Extração de DNA genômico.....	44
3.9 <i>Pulsed-field Gel Electrophoresis</i> (PFGE).....	45
3.10 <i>Microsatellite Length Polymorphism</i> (MLP).....	46
3.11 <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST).....	49
3.12 Cálculo do índice de discriminação.....	52
3.13 Análise dos prontuários.....	52
3.14 Análise estatística.....	53
3.14 Ética.....	53
4. RESULTADOS.....	54
4.1 Prevalência das espécies de <i>Candida</i>	55

4.2 Sensibilidade aos antifúngicos.....	55
4.3 Produção de enzimas hidrolíticas extracelulares.....	58
4.4 <i>Pulsed-field Gel Electrophoresis</i> (PFGE).....	61
4.5 <i>Microsatellite Length Polymorphism</i> (MLP).....	63
4.6 <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST).....	67
4.7 Análise dos prontuários.....	77
5. DISCUSSÃO.....	82
6. CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
APÊNDICES.....	104
ANEXOS.....	113

1.1 Doenças fúngicas

Os avanços na área médica possibilitaram o aumento da sobrevivência de pacientes com diversas enfermidades, tais como aqueles acometidos por neoplasias ou que necessitam de transplante de órgãos. Entretanto, esses avanços vieram acompanhados por um aumento da população suscetível às doenças fúngicas oportunistas e, conseqüentemente, aumento da incidência dessas doenças (PEMÁN; QUINDÓS, 2016; VALLABHANENI et al., 2016). Pacientes que apresentam o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) ou neoplasias, que receberam transplante de órgãos, que fazem uso de imunomoduladores ou que apresentam idades extremas (prematturos ou idosos) são suscetíveis às doenças fúngicas invasivas (PEMÁN; QUINDÓS, 2016; VALLABHANENI et al., 2016).

As doenças fúngicas são relativamente pouco estudadas, quando comparadas às doenças causadas por outros agentes infecciosos, e, apesar da incidência dessas doenças ser menor que das causadas por vírus e bactérias, a taxa de mortalidade relacionada às doenças fúngicas é maior. Não existem vacinas contra nenhum tipo de doença fúngica e as opções de tratamento são escassas e limitadas a poucas classes de drogas (SARDI et al., 2013; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; WHIBLEY; GAFFEN, 2015).

1.2 *Candida* spp. e candidemia

Existem mais de 150 espécies do gênero *Candida* conhecidas e algumas delas são componentes da microbiota humana, sendo facilmente encontradas em mucosas e superfícies cutâneas; nos tratos respiratório, gastrointestinal e genito-urinário (YAPAR, 2014; WHIBLEY; GAFFEN, 2015). Mais de 17 espécies desse gênero já foram relacionadas a doenças em seres humanos: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida metapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida dubliniensis*, *Candida pelliculosa*, *Candida kefyr*, *Candida lipolytica*, *Candida famata*, *Candida inconspicua*, *Candida rugosa*, *Candida norvegensis*, entre outras (CHEN et al., 2010; RODRIGUES; HENRIQUES, 2013; YAPAR, 2014). As doenças causadas por essas espécies podem ser de menor ou maior gravidade e variam de superficiais a sistêmicas (WHIBLEY; GAFFEN, 2015).

Candidemia é a infecção do sistema circulatório causada por *Candida* spp. e é uma das principais infecções nosocomiais desse sistema, principalmente entre pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), nos quais é responsável por aproximadamente 17% das infecções. Nos Estados Unidos, estima-se que as espécies de *Candida* são responsáveis por 8 a 10% das infecções nosocomiais do sistema circulatório (YAPAR, 2014; GONG et al., 2016; MCCARTY; PAPPAS, 2016). Essas doenças aumentam o tempo de hospitalização, o que resulta em aumento de gastos, além de apresentarem elevada taxa de mortalidade (SARDI et al., 2013).

Os fatores de risco que propiciam o desenvolvimento de candidemia incluem transplante de órgãos e células-tronco; granulocitopenia (principalmente neutropenia); quimioterapia; antibioticoterapia; sondas; hemodiálise; cateter venoso central; nutrição parenteral; cirurgias (principalmente no trato gastrointestinal); rompimento de barreiras anatômicas, tais como perfuração no trato gastrointestinal ou queimaduras extensas; colonização por *Candida* spp.; diabetes; internação em UTI; malformações congênitas e infecção por HIV (SARDI et al., 2013; MCCARTY; PAPPAS, 2016; PEMÁN; QUINDÓS, 2016). A candidemia pode ter origem endógena, propiciada pela própria microbiota, ou exógena, propiciada por materiais contaminados ou pelos próprios agentes de saúde (PEMÁN; QUINDÓS, 2016).

O uso de catéteres é muito comum no ambiente hospitalar. Os catéteres venosos centrais são utilizados para a administração de fluidos, medicação e suporte nutricional; entretanto, esses dispositivos invasivos podem ser fontes de infecção e estão sujeitos à formação de biofilmes microbianos, que são de difícil eliminação e fonte de infecções recorrentes (SARDI et al., 2013; CANTEY; MILSTONE, 2015). Já os catéteres urinários aumentam as chances de desenvolvimento de candidúria (SARDI et al., 2013). A quimioterapia provoca lesões em tecidos de alta replicação, comprometendo, assim, a integridade da parede dos intestinos e outros órgãos, o que favorece a disseminação de *Candida* spp. pelo organismo. Esse fato, aliado ao uso de antibióticos de amplo espectro, que alteram a microbiota e favorecem o aumento de *Candida* spp., aumentam os riscos do paciente adquirir candidemia (SARDI et al., 2013).

As espécies de *Candida* são a causa mais frequente de infecções fúngicas invasivas (Tabela 1) (PEMÁN; QUINDÓS, 2016).

Tabela 1 - Incidência anual mundial e taxa de mortalidade das principais infecções fúngicas invasivas.

Infecção fúngica invasiva	Incidência anual por milhão de habitantes	Mortalidade atribuída (%)
Candidíase	20 – 200	30 - 50
Criptococose	20 – 60	10 - 20
Aspergilose	10 – 30	30 - 100
Mucormicose	1 – 2	40 - 100
Escudosporíases	1 – 2	40 - 100
Feohifomicoses	0,5 – 1	40 - 100

Fonte: Pemán; Quindós (2016).

Apesar de várias espécies estarem relacionadas à candidemia, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* são as espécies mais frequentes (MCCARTY; PAPPAS, 2016). Essas espécies apresentam diferenças na morfologia, tamanho celular, composição na parede celular, assimilação de nutrientes, produção de fatores de virulência e sensibilidade aos antifúngicos (WHIBLEY; GAFFEN, 2015; ALBATAINEH et al., 2016).

Candida albicans é a espécie mais frequente no mundo todo e pode ser responsável por mais de 50% dos casos, dependendo do local estudado (YAPAR, 2014). Essa espécie apresenta células que variam de 4 a 6 μm e é polimórfica, podendo se desenvolver na forma de blastoconídeos, hifas e pseudo-hifas, o que auxilia na invasão de tecidos, disseminação no organismo do hospedeiro e evasão do sistema imune. Ainda, apresenta capacidade de modificação de fenótipo, conhecidos como fase opaca e branca, sendo que a última é mais virulenta (MODRZEWSKA; KURNATOWSKI, 2013; RODRIGUES; HENRIQUES, 2013). Isolados de *C. albicans* geralmente apresentam intensa produção de fatores de virulência, quando comparados a isolados de outras espécies do mesmo gênero. Além disso, isolados de hemocultura tendem a apresentar maior produção desses fatores que isolados de outros sítios anatômicos (DE LUCA et al., 2012; TELLAPRAGADA et al., 2014). Muitos isolados também apresentam capacidade de formação de biofilmes (SARDI et al., 2013). Essa espécie não apresenta resistência intrínseca aos antifúngicos utilizados no tratamento de candidemias; entretanto, alguns isolados podem apresentar sensibilidade diminuída ou até resistência,

adquiridas após o contato com os agentes antifúngicos, principalmente os azólicos (SARDI et al., 2013; MCCARTY; PAPPAS, 2016; NETT; ANDES, 2016).

A frequência da espécie *C. glabrata* varia de acordo com a região e, em determinados locais, essa espécie é a maior causa de candidemia entre as espécies não-*albicans* (MCCARTY; PAPPAS, 2016). *C. glabrata*, ao contrário de *C. albicans*, não é capaz de formar hifas e pseudo-hifas e apresenta as células de menor tamanho entre as espécies de *Candida* mais comuns: 1 a 4 µm (RODRIGUES; HENRIQUES, 2013). Ainda, é capaz de se desenvolver no interior de macrófagos (WHIBLEY; GAFFEN, 2015). Essa espécie é capaz de produzir fatores de virulência e biofilmes, porém, com menor frequência que *C. albicans*. *C. glabrata* é intrinsecamente menos suscetível aos antifúngicos azólicos, tais como o fluconazol, que é amplamente utilizado no tratamento de doenças fúngicas. Além disso, isolados resistente às equinocandinas também já foram detectados (RODRIGUES; HENRIQUES, 2013; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013). As candidemias causadas por essa espécie são relacionadas a maiores taxas de mortalidade (COLOMBO et al., 2007; GUPTA, GUPTA, VARMA, 2015). Duas espécies são muito semelhantes a *C. glabrata*: *Candida nivariensis* e *Candida bracarensis*, que podem ser erroneamente identificadas como *C. glabrata* quando testes fenotípicos são utilizados (ALCOBA-FLÓREZ et al., 2005; CORREIA et al., 2006; ROMEO et al., 2009).

Candida parapsilosis pertence a um complexo composto por três espécies, que são indistinguíveis fenotipicamente: *C. parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis*, que apresentam diferenças quanto à sensibilidade aos antifúngicos, prevalência em sítios anatômicos e virulência, sendo que a primeira espécie é a mais prevalente (CHEN et al., 2010; ZICCARDI et al., 2015). *Candida parapsilosis* pode ocupar o segundo lugar entre as espécies causadoras de candidemia e sua frequência é bastante variável de acordo com o país e, até mesmo, entre hospitais (CHEN et al., 2010; GONG et al., 2016). *C. parapsilosis* é frequente colonizador da pele e candidemias causadas por essa espécie são, frequentemente, de origem exógena e com menor mortalidade (PEMÁN; QUINDÓS, 2016). As células dessa espécie apresentam de 2,5 a 4 µm de diâmetro e são capazes de se desenvolver na forma de blastoconídeos e pseudo-hifas (RODRIGUES; HENRIQUES, 2013; ZICCARDI et al., 2015). Isolados dessa espécie são capazes de produzir fatores de virulência e formar biofilmes (ZICCARDI et al.,

2015). Além disso, geralmente apresentam elevados valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente às equinocandinas devido a uma alteração natural do gene que codifica a proteína alvo desses antifúngicos; entretanto, estudos indicam que esse fato é clinicamente irrelevante (ARENDRUP, 2013; MCCARTY; PAPPAS, 2016).

Candida orthopsilosis, embora menos frequente, já foi relacionada como a quinta maior causa de candidemia em um estudo espanhol e, frequentemente, é relacionada à candidemia em neonatos (BLANCO-BLANCO et al., 2014; PEMÁN; QUINDÓS, 2016). Essa espécie pode se desenvolver na forma de blastoconídeos e pseudo-hifas e produzir fatores de virulência e biofilmes (ZICCARDI et al., 2015). Como essa espécie foi recentemente descrita e é fenotipicamente idêntica a *C. parapsilosis*, os dados sobre a produção de fatores de virulência, incidência e suscetibilidade aos antifúngicos ainda são escassos. Entretanto, enquanto alguns estudos não encontraram nenhum isolado resistente aos antifúngicos, outros relataram resistência ao voriconazol (BLANCO-BLANCO et al., 2014). *Candida metapsilosis* é raramente isolada em episódios de candidemia, o que indica que essa espécie apresenta menor virulência (BLANCO-BLANCO et al., 2014; ZICCARDI et al., 2015). Porém, existem estudos que recuperaram essa espécie do sangue de pacientes acometidos por candidemia (CHEN et al., 2010).

Candidemias provocadas por *C. tropicalis* são frequentes e podem até superar aquelas causadas por *C. albicans* em determinadas regiões (COSTA et al., 2014; VALLABHANENI et al., 2016). O tamanho celular de *C. tropicalis* varia de 4 a 8 µm e suas células são capazes de se desenvolver na forma de blastoconídeos, hifas e pseudo-hifas, embora em menor frequência que *C. albicans*. Além disso, essa espécie apresenta capacidade de formação de biofilmes (MODRZEWSKA; KURNATOWSKI, 2013; RODRIGUES; HENRIQUES, 2013). Doenças causadas por essa espécie tem grande potencial de disseminação, o que indica produção de fatores de virulência (NEGRI et al., 2012). Geralmente os isolados de *C. tropicalis* são suscetíveis aos antifúngicos utilizados na terapia das candidemias; entretanto, já foram descritos isolados menos suscetíveis ao fluconazol e resistentes às equinocandinas (NEGRI et al., 2012; MODRZEWSKA; KURNATOWSKI, 2013; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

Estudos utilizando modelo animal indicam que *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentam maior potencial patogênico, seguidas de *C. glabrata*, com

patogenicidade intermediária, e, finalmente, *C. parapsilosis*, com menor potencial patogênico (NEGRI et al., 2012).

O desfecho da candidemia é influenciado por uma série de fatores que incluem o estado do paciente, tais como a funcionalidade do sistema imunológico e severidade da doença de base; características do micro-organismo, incluindo produção de fatores de virulência, patogenicidade e suscetibilidade aos antifúngicos; e a terapia utilizada, com sua farmacocinética e interação com outras drogas que o paciente utiliza (ARENDRUP, 2013; ALBATAINEH et al., 2016).

1.3 Fatores de virulência

Como exposto anteriormente, a produção de fatores de virulência por *Candida* spp. é um dos fatores que influencia no desfecho da candidemia. Esses fatores incluem a produção de adesinas, formação de biofilmes e produção de enzimas hidrolíticas extracelulares (ZICCARDI et al., 2015).

A aderência a tecidos e células do hospedeiro, assim como a superfícies inertes, é essencial no desenvolvimento da candidemia. A aderência aos tecidos do hospedeiro é o primeiro passo para a invasão e disseminação do micro-organismo; já a aderência a superfícies inertes é o início da formação de biofilmes (KARKOWSKA-KULETA; RAPALA-KOZIK; KOZIK, 2009).

Os biofilmes são comunidades microbianas envoltas por uma matriz polissacarídica extracelular e aderidas a uma superfície, que pode ser inerte ou não (CHANDRA; MUKHERJEE, 2015). Essas comunidades podem ser compostas por mais de uma espécie de micro-organismo, além de moléculas do hospedeiro (fibrinogênio ou células mortas), quando são formados *in vivo* (MODRZEWSKA; KURNATOWSKI, 2013; CHANDRA; MUKHERJEE, 2015). Os biofilmes são mais resistentes ao sistema imune do hospedeiro, aos agentes de desinfecção e aos antifúngicos e, portanto, são de difícil eliminação, o que os torna fontes de infecções recorrentes (ZICCARDI et al., 2015).

As enzimas hidrolíticas extracelulares estão envolvidas na aquisição de nutrientes durante o estabelecimento da infecção, penetração e destruição dos tecidos do hospedeiro (ZICCARDI et al., 2015). As fosfolipases, que catalisam a hidrólise dos fosfolipídeos de membrana, promovem dano celular ao hospedeiro e auxiliam na exposição de receptores que contribuem para aderência das leveduras

aos tecidos (RODRIGUES; HENRIQUES, 2013). Já as proteinases degradam proteínas do hospedeiro, tais como colágeno, fibronectina, imunoglobulinas e citocinas, contribuindo para a destruição de tecidos e evasão do sistema imune (KARKOWSKA-KULETA; RAPALA-KOZIK; KOZIK, 2009). Ainda, as hemolisinas catalisam a degradação da hemoglobina do hospedeiro, facilitando a aquisição de ferro, que é essencial para a sobrevivência do micro-organismo no interior do hospedeiro (NEGRI et al., 2012).

A produção desses fatores de virulência, como dito anteriormente, varia entre as espécies e entre isolados de uma mesma espécie, sendo que isolados de sangue são relacionados com uma produção mais intensa desses em comparação com isolados de outros sítios anatômicos (DE LUCA et al., 2012; TELLAPRAGADA et al., 2014).

1.4 Incidência das candidemias e prevalência das espécies de *Candida*

A candidemia é uma importante infecção nosocomial no mundo todo; entretanto, sua incidência varia de acordo com o país, região, hospital e época, o que ressalta a importância da constante realização de estudos locais (QUINDÓS, 2014). Enquanto alguns estudos relatam incidências menores, de 0,31/1000 admissões, outros relatam incidências maiores, de 1,98/1000 admissões (COLOMBO et al., 2007; CAGGIANO et al., 2015). A Tabela 2, que traz valores de incidência relatados em diferentes estudos, permite a observação das diferenças entre locais.

Tabela 2 - Incidência de candidemia em diferentes países e anos de estudo.

Local	Incidência (por 1000 admissões)	Ano	Referência
Brasil	1,87	2006	Motta et al. (2010)
Brasil	1,20	1994 - 2004	Wille et al. (2013)
Brasil	1,66	2002 - 2003	Colombo et al. (2007)
Brasil	1,80	2006 - 2011	Hoffmann-Santos et al. (2013)
China	0,38	2010 - 2011	Tan et al. (2015)
Hong Kong	0,25	2010 - 2011	Tan et al. (2015)

continua

conclusão

Local	Incidência (por 1000 admissões)	Ano	Referência
Índia	1,94	2010 - 2011	Tan et al. (2015)
Itália	0,31	1998 - 2013	Caggiano et al. (2015)
Itália	0,79	2009 - 2014	Bassetti et al. (2015)
Itália	1,80	2004 - 2012	De Rosa et al. (2015)
Tailândia	1,31	2010 - 2011	Tan et al. (2015)
Taiwan	2,93	2010 - 2011	Tan et al. (2015)
Turquia	2,9	2013 - 2014	Sutcu et al. (2016)

Além da incidência, a prevalência das espécies causadoras de candidemia também é variável. Apesar de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* serem as principais espécies envolvidas nessa doença, sua prevalência varia de acordo com o local e, embora *C. albicans* geralmente seja a espécie predominante no mundo todo, sua incidência vem diminuindo, enquanto a incidência das espécies não-*albicans* vem aumentando (CHEN et al., 2010; GUINEA et al., 2014; QUINDÓS, 2014; GONG et al., 2016; MCCARTY; PAPPAS, 2016). Essas diferenças podem ser observadas na Figura 1.

Figura 1. Prevalência de *Candida* spp. obtida em diferentes estudos.

[1] Motta et al. (2010); [2] Wille et al. (2013); [3] Colombo et al. (2007); [4] Hoffmann-Santos et al. (2013); [5] Caggiano et al. (2015); [6] Bassetti et al. (2015); [7] De Rosa et al. (2015); [8] Sutcu et al. (2016).

1.5 Diagnóstico das candidemias

O diagnóstico das candidemias é realizado através de hemocultura e, após o isolamento, a levedura é identificada utilizando-se, geralmente, testes bioquímicos, que podem ser realizados manualmente ou através de aparelhos automatizados (ALBATAINEH et al., 2016; KOEHLER; CORNELLY, 2016). A identificação da espécie é essencial para o tratamento do paciente, visto que a sensibilidade aos antifúngicos varia de acordo com a espécie. Portanto, a identificação precisa e rápida influencia diretamente no desfecho da candidemia (ALBATAINEH et al., 2016; CALANDRA et al., 2016). Apesar da cultura e identificação bioquímica ainda serem o padrão de diagnóstico, muitos fatores podem influenciar no resultado, prolongando o tempo de identificação ou gerando identificações errôneas. Ainda, a hemocultura pode apresentar um resultado falso-negativo. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de novas técnicas de identificação (ALBATAINEH et al., 2016; CALANDRA et al., 2016).

As ferramentas moleculares têm sido utilizadas como alternativa no diagnóstico das candidemias. A técnica de MALDI-TOF (do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*) é baseada na análise do espectro de massa de proteínas ribossomais, que são altamente conservadas, e características de cada espécie e é de rápida execução, precisa e reprodutível (ALBATAINEH et al., 2016). A tecnologia T2 Ressonância Magnética, que consiste no uso de ressonância magnética para detectar produtos de PCR gerados por primers desenvolvidos para a região ITS2 de *Candida* spp., é rápida, sensível e de alta especificidade (ALBATAINEH et al., 2016; CALANDRA et al., 2016). Outras técnicas baseiam-se na detecção de componentes da parede celular fúngica, utilizando PCR ou técnicas imunológicas (CALANDRA et al., 2016).

1.6 Tratamento das candidemias

O tratamento da candidemia é feito utilizando-se basicamente 3 classes de antifúngicos: poliênicos, azólicos e equinocandinas (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

Os antifúngicos poliênicos se ligam ao ergosterol da membrana plasmática, desestabilizando-a, o que provoca desequilíbrio osmótico e, consequentemente,

morte celular. Fazem parte dessa classe a anfotericina B e a nistatina; entretanto, somente a primeira está disponível para o tratamento de infecções sistêmicas (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; NETT; ANDES, 2016). A anfotericina B é ativa contra a maioria das espécies de *Candida*; porém, apresenta hepato e nefrotoxicidade (NETT; ANDES, 2016). Embora a resistência a esse antifúngico seja rara, existem relatos de isolados com suscetibilidade reduzida ocasionada por diminuição no conteúdo de ergosterol na membrana celular (SARDI et al., 2013; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; NETT; ANDES, 2016).

Os azóis, tais como o fluconazol, voriconazol e posaconazol, apresentam mecanismo de ação baseado na desestabilização da membrana plasmática por meio da inibição da enzima lanosterol 14- α -desmetilase e, conseqüentemente, inibição da síntese de ergosterol, principal componente da membrana celular fúngica (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; NETT; ANDES, 2016).

O fluconazol apresenta ação contra muitas espécies de *Candida*; entretanto, tem ação reduzida contra *C. glabrata* e não tem ação contra *C. krusei*. Já o voriconazol apresenta atividade contra essas duas espécies, além de outras do mesmo gênero (NETT; ANDES, 2016). Além da resistência intrínseca, isolados de *Candida* spp. podem adquirir modificações que dificultam a ação desses antifúngicos. Os mecanismos de resistência adquirida aos azóis são baseados na diminuição do conteúdo citoplasmático dessas drogas, ocasionada pela expressão de bombas de efluxo, codificadas pelos genes *CDR1*, *CDR2* e *MDR1*, ou em mutações do gene *ERG11*, que codifica a enzima lanosterol 14- α -desmetilase (SARDI et al., 2013; PERLIN; SHOR; ZHAO; 2015; SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLÖRL, 2015).

Os antifúngicos azólicos geralmente apresentam efeitos adversos leves, embora possam, raramente, provocar falência hepática (NETT; ANDES, 2016). Dentre os antifúngicos dessa classe, o fluconazol e o voriconazol são utilizados no tratamento de candidemia (NETT; ANDES, 2016).

A classe das equinocandinas é a mais recente e compreende a anidulafungina, caspofungina e micafungina. Esses antifúngicos inibem a síntese de 1,3 β -glucana, desestabilizando a parede celular (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; NETT; ANDES, 2016). Seu espectro de ação abrange grande parte das espécies de *Candida*. Como mencionado anteriormente, embora isolados de *C. parapsilosis* possam apresentar maiores valores de CIM, esse fato não é clinicamente relevante

(MCCARTY; PAPPAS, 2016; NETT; ANDES, 2016). A resistência a essa classe é baseada em mutações no gene *FKS*, que codifica a enzima 1,3 β -D-glucana-sintase (PERLIN; SHOR; ZHAO; 2015; MCCARTY; PAPPAS, 2016; NETT; ANDES, 2016). Os antifúngicos dessa classe são bem tolerados e não apresentam efeitos adversos graves. Tanto a anidulafungina, quanto a caspofungina e micafungina são utilizadas no tratamento da candidemia (NETT; ANDES, 2016).

Embora existam outras classes de antifúngicos, estas não são utilizadas no tratamento de candidemia (NETT; ANDES, 2016).

A Sociedade Americana de Doenças Infecciosas recomenda que o tratamento de candidemia em pacientes não-neutropênicos seja iniciado por uma equinocandina. O fluconazol também pode ser utilizado quando o paciente não está em estado crítico e a possibilidade de espécies menos suscetíveis a esse antifúngico for descartada. Caso haja intolerância, indisponibilidade ou resistência aos antifúngicos anteriores, estes podem ser substituídos por anfotericina B. O voriconazol também pode ser utilizado, principalmente em casos de candidemia por *C. krusei*. Após a estabilização do paciente e confirmação da suscetibilidade dos isolados, a terapia inicial por equinocandina ou anfotericina B pode ser substituída por fluconazol. Para pacientes neutropênicos, é recomendado iniciar a terapia por uma equinocandina ou anfotericina B. O fluconazol também pode ser utilizado em pacientes não-críticos, que não fizeram uso desse antifúngico previamente e que não apresentam espécies menos suscetíveis a esse antifúngico. Caso seja necessário um maior espectro de ação, o voriconazol também pode ser utilizado (PAPPAS et al., 2016).

No Brasil, a Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, a Sociedade Brasileira de Infectologia e a Sociedade Paulista de Infectologia recomendam que o tratamento da candidemia em pacientes não-neutropênicos se inicie com uma equinocandina, exceto quando há evidência de *C. parapsilosis*. Alternativamente, a anfotericina B pode ser utilizada em pacientes que não responderam ao tratamento inicial ou que apresentam endocardite e meningite. O fluconazol também pode ser utilizado por pacientes estáveis e que não foram expostos previamente a esse antifúngico. O voriconazol pode ser utilizado em caso de resistência ao fluconazol e em casos de envolvimento do sistema nervoso central e endoftalmite. Após a estabilização do paciente e confirmação da suscetibilidade dos isolados, a terapia inicial pode ser

substituída por fluconazol. Em pacientes neutropênicos, equinocandinas ou anfotericina B devem ser utilizadas (COLOMBO et al., 2013).

1.7 Testes de suscetibilidade aos antifúngicos

Os testes de suscetibilidade aos antifúngicos podem ser utilizados para direcionar a terapia antifúngica, assim como para monitorar o surgimento de resistência e indicar o espectro de ação de possíveis agentes terapêuticos (ALBATAINEH et al., 2016). Atualmente, a técnica de microdiluição em caldo é a mais utilizada para a determinação da suscetibilidade através da determinação da CIM. Duas organizações desenvolveram protocolos para essa técnica, a *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). Os dois protocolos são semelhantes, mas apresentam diferenças quanto ao tamanho do inóculo, concentração de glicose no meio de cultura RPMI e determinação da CIM (SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLÖRL, 2015; ALBATAINEH et al., 2016).

Existem, também, métodos comerciais para a determinação da suscetibilidade aos antifúngicos: *Sensititre™ YeastOne™ colorimetric plate*, desenvolvido pela TREK Diagnostic Systems, e Etest®, desenvolvido pela bioMérieux. Finalmente, o Vitek® 2 yeast susceptibility test (bioMérieux) é um método automatizado também utilizado para essa finalidade (SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLÖRL, 2015).

A classificação da suscetibilidade depende de uma série de fatores, tais como a farmacocinética e farmacodinâmica do agente testado, mecanismos de resistência e distribuição dos valores de CIM entre linhagens selvagens e com mecanismos de resistência adquiridos (SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLÖRL, 2015). Para as espécies de *Candida*, existem pontos de corte para a determinação da suscetibilidade aos azóis e equinocandinas, mas não para o poliênico anfotericina B. Isso se deve à falta de correlação entre os resultados dos testes *in vitro* e a prática clínica. Para esse antifúngico, os estudos geralmente utilizam os valores epidemiológicos que separam isolados *wild-type*, que são suscetíveis, dos não *wild-type*, que apresentam mecanismos de resistência adquirida (ALBATAINEH et al., 2016).

1.8 Técnicas de genotipagem

As técnicas de genotipagem são capazes de diferenciar isolados da mesma espécie em clones e, assim, contribuir para a identificação de rotas de transmissão e confirmação de surtos em unidades hospitalares (ABDELJELIL et al., 2011). Existem várias técnicas de tipagem molecular, baseadas em diferentes princípios, cada uma com vantagens e desvantagens (CHEN et al., 2005; KHADRAOUI et al., 2010; ABBES et al., 2012; ; SONG et al., 2014; CHILLEMI et al., 2016).

A técnica *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE) permite a separação de moléculas de DNA de grande tamanho. Esta técnica pode ser utilizada na cariotipagem eletroforética, que consiste na genotipagem através da diferença de tamanho dos cromossomos, ou na análise do DNA genômico submetido à restrição enzimática, que diferencia as linhagens através de padrões de bandas obtidos após restrição com enzimas. De maneira geral, a segunda técnica apresenta maior poder de discriminação (ABDELJELIL et al., 2011; HEO et al., 2011; BATISTA et al., 2014). A técnica de PFGE apresenta boa reprodutibilidade. Entretanto, o tempo de execução e a necessidade de aparelhos específicos dificultam sua realização (CHEN et al., 2005; KHADRAOUI et al., 2010).

Microsatellite Length Polymorphism (MLP) é baseado no polimorfismo dos microssatélites, que são sequências em tandem, e é uma das técnicas mais utilizadas na tipagem de fungos (ABBES et al., 2012; CHILLEMI et al., 2016). Existem vários microssatélites descritos para *Candida* spp. e a combinação de dois ou mais marcadores aumenta o poder de discriminação da técnica (ABBES et al., 2012). Essa técnica apresenta alto poder de discriminação, além de ser de rápida execução e reprodutível (LI et al., 2015).

A técnica *Multilocus Sequence Typing* (MLST) consiste na genotipagem dos isolados através do sequenciamento de fragmentos de genes altamente conservados, conhecidos como *housekeeping*, o que fornece dados robustos e permite a comparação de resultados entre diversos estudos (CHEN et al. 2009; SONG et al., 2014). O banco de dados do MLST está no site www.mlst.net e disponibiliza protocolos e informações sobre linhagens do mundo todo. Atualmente, são disponibilizadas informações para 29 espécies de bactérias e fungos, incluindo *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*.

1.9 Justificativa do trabalho

Como foi explicitado anteriormente, apesar das espécies de *Candida* serem micro-organismos relevantes em infecções nosocomiais invasivas no mundo todo, a epidemiologia das candidemias pode variar de acordo com o local estudado. Assim, estudos epidemiológicos locais são de suma importância para a prática clínica, já que as diferenças de incidência e prevalência das espécies dificultam a extrapolação dos resultados obtidos em outros hospitais.

Candida spp. apresentam diferenças quanto à sensibilidade aos antifúngicos e produção de fatores de virulência, o que torna necessária a identificação da espécie. Ainda, algumas espécies são indistinguíveis fenotipicamente e, portanto, não são identificadas rotineiramente nos hospitais. Finalmente, a avaliação do perfil de suscetibilidade aos antifúngicos, bem como das características fenotípicas e genotípicas das linhagens envolvidas em episódios de candidemia, fornece informações importantes no estudo de *Candida* spp.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar o perfil fenotípico e genotípico de isolados de episódios de candidemia, ocorridos no Hospital das Clínicas da FMRP, pertencentes às espécies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*.

2.2 Objetivos específicos

- a) avaliar a sensibilidade dos isolados aos antifúngicos utilizados no tratamento de candidemias: anfotericina B, caspofungina, fluconazol e voriconazol;
- b) avaliar a produção de fatores de virulência através de testes fenotípicos: produção de proteinases, hemolisinas e fosfolipases;
- c) avaliar a diversidade genética dos isolados por meio de PFGE, análise de MLP e MLST;
- d) pesquisar os dados nos prontuários dos pacientes, para uma abordagem epidemiológica.

3.1 Hospital envolvido no estudo

Os isolados utilizados nesse trabalho foram obtidos de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC – FMRP) e em sua Unidade de Emergência (UE-HCFMRP), de junho de 2014 a novembro de 2015. No total, as duas unidades apresentam 883 leitos e recebem mais de 30 mil pacientes anualmente. Todos os pacientes com candidemia causada por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* ou *C. tropicalis* foram incluídos no estudo. Um episódio de candidemia foi definido como pelo menos uma hemocultura positiva para *Candida* spp.. Somente o primeiro episódio de cada paciente foi considerado, a menos que os episódios posteriores ocorressem em um intervalo maior que 30 dias do primeiro ou que fossem causados por espécies diferentes.

3.2 Isolados

Para a realização do trabalho, foram utilizados um total de 79 isolados (Apêndice A) das espécies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Além dos isolados provenientes de pacientes, linhagens padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC) foram utilizadas como controle: *C. albicans* (ATCC 14053), *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. tropicalis* (ATCC 750), *C. dubliniensis* INCQS 40172 (ATCC MYA-646), *C. metapsilosis* INCQS 40329 (ATCC 96143) e *C. orthopsilosis* (ATCC 96141). As amostras foram mantidas em caldo Sabouraud dextrose (Oxoid, Hampshire, Inglaterra), suplementado com 20% de glicerol (Merck, Darmstadt, Alemanha), em freezer a -80°C.

3.3 Confirmação da identificação das espécies

No Hospital das Clínicas, as hemoculturas foram realizadas utilizando-se o sistema Bactec™ (Becton & Dickinson, EUA). A identificação foi feita pelo sistema automatizado VITEK® 2 Compact (BioMérieux, França) e manualmente, baseado em características bioquímicas.

A confirmação da identificação foi realizada por métodos moleculares, em nosso laboratório, utilizando-se PCR com *primers* específicos para cada espécie

(Tabela 3) (MARTÍNEZ et al., 2010). Para a diferenciação das espécies do complexo *C. parapsilosis*, foi utilizada a metodologia desenvolvida por Feng et al. (2014), que é baseada em PCR seguida de digestão enzimática (*primers* descritos na Tabela 3).

Tabela 3 - *Primers* utilizados para a confirmação, por PCR, da identificação dos isolados.

Espécie	Primer	Fragmento (pb)
<i>C. albicans</i>	Fw: 5'- AAGTATTTGGGAGAAGGGAAAGGG-3' Rv: 5'-AAAATGGGCATTAAGGAAAAGAGC-3'	406
<i>C. glabrata</i>	Fw: 5'-ACATATGTTTGCTGAAAAGGC-3' Rv: 5'-CTTTTCTTAGTGTTTCAGGACTTC-3'	310
<i>C. parapsilosis</i>	Fw: 5'-AGGGATTGCCAATATGCCCA-3' Rv: 5'-GTGACATTGTGTAGATCCTTGG-3'	113
<i>C. tropicalis</i>	Fw: 5'-TGATAGTTAGGAAAGATCAGGTG-3' Rv: 5'-AACATATCCCATGTGTGTGT-3'	147
<i>C. dubliniensis</i>	Fw: 5'-AGTATTGGGAGAGGGAAAGACC-3' Rv: 5'-ACAGGGAAGTCGATTCTTGC-3'	270
<i>C. orthopsilosis</i> / <i>C. metapsilosis</i>	Fw: 5'-GCTTTAGTGGACAAATCAATGAYCT-3' Rv: 5'-AGTTGATGTAACCACCACCR TTG-3'	235/250

Fw: forward / **Rv:** reverse.

Fonte: Martínez et al. (2010) e Feng et al. (2014).

As PCRs foram realizadas utilizando-se a enzima Taq DNA Polymerase (Thermo scientific, EUA), de acordo com instruções do fabricante. As condições dos ciclos estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições dos ciclos para as reações utilizadas na identificação de *Candida* spp.

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo	Quantidade de ciclos
Desnaturação inicial	95	3 minutos	1
Desnaturação	95	30 segundos	35
Anelamento	55	30 segundos	35
Extensão	72	45 segundos	35
Extensão final	72	10 minutos	1

Fonte: o autor

Após as PCRs, os fragmentos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, de acordo com Sambrook e Russel (2001). Para a visualização do DNA,

os géis foram corados com SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, EUA). As linhagens ATCC foram utilizadas como controle positivo das reações (Figura 2) e uma reação feita com água no lugar do DNA foi utilizada como controle negativo.

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose demonstrando o tamanho dos fragmentos resultantes da amplificação, por PCR, utilizando-se *primers* específicos para cada espécie.

1. *Candida albicans* ATCC 14053 (310 pb); 2. *Candida glabrata* ATCC 90030 (406 pb); 3. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (113 pb); 4. *Candida tropicalis* ATCC 750 (147 pb).

Fonte: o autor

Para as reações de identificação do complexo *C. parapsilosis* (FENG et al., 2014), os fragmentos submetidos à eletroforese foram purificados, utilizando-se o kit QIAquick® gel extraction kit (Qiagen, Alemanha), e digeridos com a enzima Styl (Thermo scientific, EUA), de acordo com as instruções dos fabricantes. Uma vez realizada a digestão, os fragmentos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose. A espécie *C. parapsilosis* gera um fragmento de 171 pb, *C. metapsilosis* gera um fragmento de 250 pb e *C. orthopsilosis*, 235 pb. Após a digestão enzimática, o fragmento de *C. metapsilosis* continua intacto e, portanto, com 250 pb, e o fragmento de *C. orthopsilosis* é digerido em dois fragmentos: um com 70 pb e outro com 165 pb.

3.4 Testes de sensibilidade aos antifúngicos

A sensibilidade aos antifúngicos foi determinada utilizando-se a metodologia de microdiluição em caldo, descrita no documento M27-A3 (CLSI). A linhagem *C. parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizada como controle de qualidade.

Resumidamente, os isolados foram cultivados a 35°C, durante 24h, em ágar Sabouraud Dextrose. A partir desses, uma suspensão estoque, com turbidez equivalente à escala 0,5 de McFarland em solução salina 0,85%, foi confeccionada e

diluída subsequentemente (1:100 e 1:20) em meio RPMI. Os antifúngicos foram incorporados ao meio líquido RPMI, tamponado com MOPS, em diversas concentrações, em placas de 96 poços, e os isolados foram inoculados nos poços. As concentrações testadas para anfotericina B e voriconazol foram de 0,0313 a 16 µg/mL; para caspofungina, de 0,015 a 8 µg/mL; e para fluconazol de 0,125 a 64 µg/mL. As placas foram incubadas a 35°C, durante 24h.

As CIMs foram determinadas visualmente e definidas como a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento para caspofungina, fluconazol e voriconazol e a menor concentração capaz de inibir qualquer crescimento visível para anfotericina B. Os pontos de corte foram determinados pelo documento M27-S4 do CLSI, ou M27-S3, quando a última versão não fornecer. Como não existem pontos de corte determinados para a anfotericina B, foram utilizados aqueles descritos por Pfaller et al. (2012). Os pontos de corte utilizados no presente estudo estão detalhados na Tabela 5.

Tabela 5 - Pontos de corte utilizados nos testes de microdiluição em caldo.

Espécie de <i>Candida</i>	Antifúngico	CIM (µg/mL)		
		Suscetível	Suscetível dose dependente	Resistente
<i>C. albicans</i>	Anfotericina B	≤ 2		> 2
	Caspofungina	≤ 0,25	0,5	≥ 1
	Fluconazol	≤ 2	4	≥ 8
	Voriconazol	≤ 0,12	0,25 – 0,5	≥ 1
<i>C. glabrata</i>	Anfotericina B	≤ 2		> 2
	Caspofungina	≤ 0,12	0,25	≥ 0,5
	Fluconazol	-	≤ 32	≥ 64
	Voriconazol	≤ 1*	2*	≥ 4*
<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B	≤ 2		> 2
	Caspofungina	≤ 2	4	≥ 8
	Fluconazol	≤ 2	4	≥ 8
	Voriconazol	≤ 0,12	0,25 – 0,5	≥ 1

continua

conclusão

Espécie de <i>Candida</i>	Antifúngico	CIM (µg/mL)		
		Suscetível	Suscetível dose dependente	Resistente
<i>C. tropicalis</i>	Anfotericina B	≤ 2		> 2
	Caspofungina	≤ 0,25	0,5	≥ 1
	Fluconazol	≤ 2	4	≥ 8
	Voriconazol	≤ 0,25	0,5	≥ 1
<i>C. orthopsilosis</i>	Anfotericina B	≤ 2		> 2
	Caspofungina	≤ 2*		> 2*
	Fluconazol	≤ 8*	16 – 32*	≥ 64*
	Voriconazol	≤ 1*	2*	≥ 4*

* de acordo com M27-S3

Fonte: CLSI M27-S3, CLSI M27-S4, Pfaller et al. (2012).

3.5 Pesquisa de proteinase

A pesquisa de proteinase foi realizada de acordo com Mane et al. (2012). Uma cultura prévia em ágar Sabouraud dextrose, incubada a 37°C durante 24h, foi realizada. A partir dessa cultura, foi confeccionada uma suspensão em solução salina a 0,85%, com turbidez equivalente à escala 1 de McFarland e 5 µL dessa suspensão foram inoculados em ágar BSA (anexo A) e incubados a 37°C, durante 7 dias. Todos os testes foram feitos em duplicata.

A atividade de proteinase (Pr_z) foi caracterizada pela presença de halo claro, correspondente à degradação de proteínas ao redor da colônia, e calculada pela razão do diâmetro da colônia e o diâmetro do halo. A interpretação da Pr_z está descrita na Tabela 6.

Tabela 6 – Interpretação dos resultados dos testes para determinação da atividade de proteinase, fosfolipase e hemolisina.

Pr _z	Resultado
1	Negativo
0,64 – 0,99	Positivo
< 0,64	Fortemente positivo

Fonte: Mane et al. (2012).

3.6 Pesquisa de fosfolipase

A pesquisa de fosfolipase foi feita de acordo com Vidotto et al. (2004). Assim como no teste para a pesquisa de proteinase, foi confeccionada uma suspensão em solução salina a 0,85%, a partir de inóculo prévio, e 5 µL dessa suspensão foram inoculados em ágar fosfolipase (anexo B) e incubados a 37°C, durante 5 dias. Todos os testes foram feitos em duplicata.

A atividade de fosfolipase (P_z) foi caracterizada pela presença de halo opaco, correspondente à degradação de fosfolipídeos ao redor da colônia, e calculada pela razão do diâmetro da colônia e o diâmetro do halo. A interpretação da P_z foi igual à de proteinase, descrita na Tabela 6.

3.7 Pesquisa de hemolisina

A pesquisa de hemolisina foi realizada de acordo com Luo, Samaranayake e Yau (2001): uma cultura prévia foi realizada em ágar Sabouraud Dextrose e incubada durante 18h, a 37°C. A partir desta, uma suspensão com turbidez correspondente à escala 1 de McFarland foi feita em solução salina a 0,85% e 5 µL dessa suspensão foram inoculados em placa de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose suplementado com glicose e sangue de carneiro (anexo C). As placas foram incubadas a 37°C, durante 48h, em estufa com ambiente contendo 5% de CO₂. Todos os testes foram feitos em duplicata.

A atividade hemolítica (H_z) foi caracterizada pela presença de halo de hemólise ao redor da colônia e calculada pela razão do diâmetro da colônia e o diâmetro do halo. A interpretação da H_z foi igual à de proteinase, descrita na Tabela 6.

3.8 Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído de acordo com Sambrook e Russel (2001). Os isolados foram cultivados em 3 mL de meio Sabouraud líquido, a 37°C, sob agitação, durante 24 horas. As células foram coletadas por centrifugação (4000g – 5 minutos) e lavadas com água destilada estéril. O sobrenadante foi descartado e o precipitado,

ressuspenso em 1 mL de tampão de extração de DNA genômico (anexo D). A extração foi realizada utilizando-se pérolas de vidro tratadas com HCl e agitação em vórtex, durante 10 minutos. A desproteinização foi feita com fenol:clorofórmio (1:1) e agitação em vórtex, durante 10 minutos.

A fase aquosa foi separada por centrifugação (22000g - 15 minutos) e o DNA, precipitado com 540 µL de isopropanol (22000g - 5 minutos). O precipitado foi lavado com 300 µL de etanol 70% (22000g - 1 minuto). O DNA foi seco à temperatura ambiente, ressuspenso em água estéril e tratado com RNase na concentração final de 10 µg/mL, a 37°C, durante 1 hora.

A integridade do DNA foi avaliada empregando-se eletroforese em gel de agarose, de acordo com Sambrook e Russel (2001), e a quantificação e verificação da pureza foram realizadas utilizando-se o aparelho NanoVue Plus™ (GE, Inglaterra).

3.9 Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)

A técnica de PFGE foi realizada baseada em Miranda et al. (2012), Chen et al. (2005) e Shin et al. (2001).

Resumidamente, suspensões foram confeccionadas, em água estéril, a partir de inóculo prévio (37°C, 48h em ágar sabouraud dextrose), e lavadas duas vezes a 22000g, durante 10 minutos. A água foi retirada por aspiração e suspensões de concentração equivalente a 1mg de células por microlitro foram confeccionadas em EDTA (50 mM, pH 8). As suspensões foram homogeneizadas e 50 µL foram transferidos para novos microtubos contendo 150 µL de EDTA (50 mM, pH 8). A essas suspensões foram adicionados 40 µL de liticase (anexo E) e 240 µL de agarose *Seakem gold* (Lonza, Suíça) (anexo F). As soluções foram transferidas para os moldes de bloco de agarose (CHEF DRIII); estes foram incubados em câmara úmida a 4°C durante 15 minutos e, posteriormente, a 37°C durante 2 horas.

Após a incubação, os blocos foram retirados dos moldes e transferidos para tubos contendo 1,9 mL de tampão NET (anexo G) e proteinase K (1mg/mL), e incubados de 8 a 16 horas, a 56°C. Após a incubação, os blocos foram lavados 5 vezes com 2 mL de tampão CHEF TE 1x (anexo H) durante 15 minutos, sob agitação, à temperatura ambiente. Entre cada lavagem, os blocos foram incubados

durante 1 hora em repouso, também à temperatura ambiente. Ao final dessa etapa, os blocos foram armazenados em tampão CHEF TE 1x, a 4°C. Os blocos podem ser armazenados nessa condição por até 6 meses.

Para a digestão, cada bloco foi lavado 5 vezes com tampão DNS (anexo I) durante 30 minutos sob agitação, à temperatura ambiente. Após as lavagens, os blocos foram transferidos para tubos contendo tampão de digestão e a enzima *Paul* (anexo J) e incubados a 37°C, de 8 a 16 horas. Caso a digestão não possa ser realizada imediatamente, os blocos podem ser armazenados em tampão DNS, a 5°C, por até 7 dias.

Após a digestão, o tampão foi removido e os blocos, lavados com TE (anexo K), durante 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação. Os blocos foram aplicados em gel de agarose *Seakem gold* (1% em TBE) e a eletroforese em campo pulsado foi realizada no aparelho CHEF DR® III (Bio-Rad, França). O tampão utilizado para a corrida foi TBE 0,5x (anexo L) e as condições foram: 10 s de pulso inicial, 90 s de pulso final, 14°C, 6 V/cm, 120° de ângulo, 29 horas. O marcador de peso molecular utilizado foi *Salmonella* Braenderup H9812 digerida com 30 unidades de XbaI, a 37°C, durante 2 horas (HUNTER et al., 2005). O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) durante 30 minutos, descorado com água destilada durante 1 hora e 30 minutos e documentado em luz ultravioleta.

Os dados foram analisados utilizando-se o *software* BioNumerics 7.6 (AppliedMaths, Bélgica). Cada banda gerada foi identificada de acordo com o tamanho e foi utilizada para a construção do dendrograma de similaridade genética, construído pelo método de *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA).

3.10 Microsatellite Length Polymorphism (MLP)

Os marcadores de microssatélite utilizados variam de acordo com a espécie. Assim, os marcadores CDC3, HIS3, CAI e CAIII foram utilizados para *C. albicans* (ADACHI et al., 2009); MTI, ERG3, GLM4 e GLM5 para *C. glabrata* (ABBES et al., 2012); CP1, CP4 e CP6 para *C. parapsilosis* (SABINO et al., 2010); e URA3 e CT14 para *C. tropicalis* (DESNOS-OLLIVIER et al., 2008). Como foram obtidas somente

três linhagens de *C. orthopsilosis* e não existem marcadores de microssatélite descritos para essa espécie, essas linhagens não foram submetidas ao MLP.

As PCRs foram realizadas utilizando-se a enzima AmpliTaq® Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, USA) e *primers* marcados com fluoróforos (Tabela 7).

Tabela 7 – *Primers* utilizados para a amplificação dos marcadores de microssatélite de *Candida* spp.

Marcador	Primer
CDC3	Fw FAM -5'-CAGATGATTTTTTGTATGAGAAGAA-3'
	Rv 5'-CAGTCACAAGATTAATAATGTTCAAG-3'
HIS3	Fw VIC-5'-TGGCAAAAATGATATTCCAA-3'
	Rv 5'-TACACTATGCCCCAAACACA-3'
CAI	Fw NED-5'-ATGCCATTGAGTGGAATTGG-3'
	Rv 5'-AGTGGCTTGTGTTGGGTTTT-3'
CAIII	Fw PET-5'-TTGGAATCACTTCACCAGGA-3'
	Rv 5'-TTTCCGTGGCATCAGTATCA-3'
MTI	Fw FAM-5'-CAGCAATAATAGCTTCTGACTATGAC-3'
	Rv 5'-GACAGGAGCAACCGTTAGGA -3'
ERG3	Fw VIC-5'-AGTGCGAGTGTATGTAAAGAATG-3'
	Rv 5'-CGTATACCTTATCTCCGTTCAA-3'
GLM4	Fw FAM-5'-AGTGTTCAATTGTCGCCTTC-3'
	Rv 5'-AATGCAGGCTCACCATTITTC-3'
GLM5	Fw VIC-5'-TGGGGATAGTGGGAACTCAA-3'
	Rv 5'-CGATGATTTTCATGTCCGATG-3'
CP1	Fw PET-5'-AAAGTGCTACACACGCATCG -3'
	Rv 5'-GGCTTGCAATTTCAATTCCT-3'
CP4	Fw VIC-5'-CAAATCATCCAGCTTCAAACC-3'
	Rv 5'-CATCAAACAAGAATTCGATATCAC-3'
CP6	Fw FAM-5'-CAGGAACAGGACAATGGTGA-3'
	Rv 5'-TCTGGAGCCTCTAGGACGTTT-3'
URA3	Fw VIC-5'-ATTGGATAGTCCCTCTAACTCACTACTA-3'
	Rv 5'- AGCATTAGTTATATCACTCCACGATGAA-3'

continua

conclusão

Marcador	Primer
CT14	Fw FAM-5'- GTAAATCTTGTATACCGTGGA-3'
	Rv 5'-TAGCCCATTTTCTAGTTTTGC-3'

Fonte: Adachi et al. (2009), Abbes et al. (2012), Sabino et al. (2010), Desnos-Ollivier et al. (2008).

As reações de amplificação dos marcadores de microssatélites foram padronizadas utilizando-se as informações presentes nos artigos de referência, mencionados anteriormente, e as informações fornecidas pelos fornecedores da enzima AmpliTaq® Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, EUA) (Tabela 8).

Tabela 8 - Condições dos ciclos para as reações de amplificação dos marcadores de microssatélite de *Candida* spp.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Quantidade de ciclos
Desnaturação inicial	95	10 minutos	1
Desnaturação	95	30 segundos	27
Anelamento	55	30 segundos	27
Extensão	72	1 minuto	27
Extensão final	72	5 minutos	1

Fonte: o autor

As PCRs, para cada marcador, foram realizadas separadamente para evitar interação entre os primers. Reações contendo 8,925 µL de formamida Hi-Di, 0,075 µL de GeneScan™ 500 LIZ dye Size Standard (Applied Biosystems, EUA) e 1 µL das PCRs diluídas (1:4 em água ultrapura) foram enviadas para serem submetidas à eletroforese capilar no aparelho ABI® 3730 (Applied Biosystems, EUA) do Centro de Estudos do Genoma Humano (São Paulo).

Os dados foram analisados utilizando-se o *software* BioNumerics 7.6 (AppliedMaths, Bélgica). Cada pico gerado foi identificado de acordo com o tamanho e marcação utilizada. O tamanho dos fragmentos foi utilizado para a construção do dendrograma de similaridade genética, construído pelo método de UPGMA.

3.11 Multilocus Sequence Typing (MLST)

Analisando-se os resultados obtidos nos testes de suscetibilidade aos antifúngicos, produção de fatores de virulência, PFGE e MLP, 34 amostras foram selecionadas para a realização da técnica MLST: 14 de *C. albicans*, 10 de *C. glabrata* e 10 de *C. tropicalis*. Como a técnica MLST não foi desenvolvida para *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*, isolados dessas espécies não foram submetidos à mesma.

A técnica MLST é baseada no sequenciamento de fragmentos de genes *housekeeping*. Assim, para *C. albicans*, foram sequenciados fragmentos dos genes *ATT1a*, *ACC1*, *ADP1*, *MPI b*, *SYA1*, *VPS13* e *ZWF1b* (BOUGNOUX et al., 2003); para *C. glabrata*, fragmentos dos genes *FKS*, *LEU2*, *NMT1*, *TRP1*, *UGP1* e *URA3* (DODGSON et al., 2003); e para *C. tropicalis*, os genes *ICL1*, *MDR1*, *SAPT2*, *SAPT4*, *XYR1* e *ZWF1a* (TAVANTI et al., 2005). Os genes e a sequência dos *primers* utilizados na amplificação dos fragmentos estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9 – *Primers* utilizados para as reações de amplificação dos genes *housekeeping* de *Candida* spp., na técnica de MLST.

Espécie	Gene	Primer
<i>C. albicans</i>	<i>ATT1a</i>	Fw 5'-ACTCAAGCTAGATTTTTTGGC-3'
		Rv 5'-CAGCAACATGATTAGCCC-3'
	<i>ACC1</i>	Fw 5'-GCAAGAGAAATTTTAATTCAATG-3'
		Rv 5'-TTCATCAACATCATCCAAGTG- 3'
	<i>ADP1</i>	Fw 5'-GAGCCAAGTATGAATGATTTG- 3'
		Rv 5'-TTGATCAACAAACCCGATAAT- 3'
	<i>MPI b</i>	Fw 5'-ACCAGAAATGGCCATTGC-3'
		Rv 5'-GCAGCCATGCATTCAATTAT- 3'
	<i>SYA1</i>	Fw 5'-AGAAGAATTGTTGCTGTTACTG- 3'
		Rv 5'-GTTACCTTTACCACCAGCTTT- 3'
	<i>VPS13</i>	Fw 5'-TCGTTGAGAGATATTCGACTT- 3'
		Rv 5'-ACGGATGGATCTCCAGTCC- 3'
	<i>ZWF1b</i>	Fw 5'-GTTTCATTTGATCCTGAAGC- 3'
		Rv 5'-GCCATTGATAAGTACCTGGAT- 3'

continua

conclusão

Espécie	Gene	Primer
<i>C. glabrata</i>	<i>FKS</i>	Fw 5'- GTCAAATGCCACAACAACAACCT-3'
		Rv 5'- AGCACTTCAGCAGCGTCTTCAG-3'
	<i>LEU2</i>	Fw 5'- TTTCTTGTATCCTCCCATTGTTCA-3'
		Rv 5'- ATAGGTAAAGGTGGGTTGTGTTGC- 3'
	<i>NMT1</i>	Fw 5'- GCCGGTGTGGTGTGCTGCTC-3'
		Rv 5'- CGTTACTGCGGTGCTCGGTGTCTG- 3'
	<i>TRP1</i>	Fw 5'- AATTGTTCCAGCGTTTTTGT-3'
		Rv 5'- GACCAGTCCAGCTCTTTCAC- 3'
	<i>UGP1</i>	Fw 5'- TTTCAACACCGACAAGGACACAGA-3'
		Rv 5'- TCGGACTTCACTAGCAGCAAATCA- 3'
	<i>URA3</i>	Fw 5'- AGCGAATTGTTGAAGTTGGTTGA -3'
		Rv 5'- AATTCGGTTGTAAGATGATGTTGC- 3'
<i>C. tropicalis</i>	<i>ICL1</i>	Fw 5'-CAACAGATTGGTTGCCATCAGAGC-3'
		Rv 5'- CGAAGTCATCAACAGCCAAAGCAG-3'
	<i>MDR1</i>	Fw 5'- TGTTGGCATTACCCCTTCCT-3'
		Rv 5'-TGGAGCACCAAACAATGGGA-3'
	<i>SAPT2</i>	Fw 5'- CAACGATCGTGGTGCTG-3'
		Rv 5'- CACTGGTAGCTGAAGGAG-3'
	<i>SAPT4</i>	Fw 5'- TGCTTCTCCTACAACCTTCACCTCC-3'
		Rv 5'- ATTCCCATGACTCCCTGAGCAACA-3'
	<i>XYR1</i>	Fw 5'- AGTTGGTTTCGGATGTTG-3'
		Rv 5'- TCGTAAATCAAAGCACCACT-3'
	<i>ZWF1a</i>	Fw 5'- GGTGCTTCAGGAGATTTAGC-3'
		Rv 5'- ACCTTCAGTACCAAAGCTTC-3'

Fonte: Bougnoux et al. (2003), Dodgson et al. (2003), Tavanti et al. (2005).

As reações de amplificação dos fragmentos dos genes *housekeeping* foram padronizadas utilizando-se as informações presentes nos protocolos e aquelas fornecidas pelos fornecedores da enzima Takara Ex Taq™ (Takara Biotechnology, Japão) (Tabela 10).

Tabela 10 - Condições dos ciclos para as reações de amplificação dos genes *housekeeping* de *Candida* spp., utilizados na técnica de MLST.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Quantidade de ciclos
Desnaturação inicial	98	10 segundos	1
Desnaturação	98	10 segundos	30
Anelamento	58 / 56(<i>TRP1</i>)	30 segundos	30
Extensão	72	1 minuto	30
Extensão final	72	10 minutos	1

Fonte: o autor.

Após a PCR, 5 µL da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, para verificar o tamanho do fragmento gerado. O restante foi purificado utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean Up System (Promega, EUA), de acordo com instruções do fabricante. Os produtos de PCR purificados foram quantificados, utilizando-se o aparelho NanoVue Plus™ (GE, Inglaterra), e diluídos a 20 ng/µL. Reações compostas por 5 µL dos produtos de PCR e 2,5 µL do *primer* a 5 µM foram enviadas para a realização do sequenciamento em sequenciador automático de DNA ABI® 3730 (Applied Biosystems, EUA) do Centro de Estudos do Genoma Humano (São Paulo). Os *primers* utilizados no sequenciamento foram os mesmos utilizados na amplificação dos fragmentos.

As sequências foram analisadas utilizando-se o programa *ChromasPro* versão 1.41 (Technelysium, Austrália) e a sequência consenso entre as duplicatas foi obtida.

O diagrama de similaridade genética foi obtido utilizando-se o programa de livre acesso eBURST V3 (<http://eburst.mlst.net/>). Esse diagrama foi construído comparando-se os isolados utilizados neste estudo com os disponíveis no banco de dados de MLST.

Para cada espécie, as sequências referentes aos fragmentos dos genes *housekeeping* foram concatenadas, simulando uma sequência única, para que se pudesse construir um dendrograma de similaridade genética de MLST. Estas sequências concatenadas foram alinhadas e o dendrograma foi construído utilizando-se o método UPGMA, no programa BioNumerics 7.6 (AppliedMaths, Keijkstraat, Belgium).

3.12 Cálculo do índice de discriminação

O índice de discriminação das técnicas de genotipagem, PFGE, MLP e MLST, foi calculado utilizando-se uma variação do índice de diversidade de Simpson (Hunter; Fraser, 1989). O índice é obtido por meio da seguinte fórmula:

$$D = 1 - \left[1/N(N-1) \right] \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1)$$

N : número total de linhagens estudadas

s : número total de tipos obtidos no dendrograma

n_j : número de amostras que pertencem ao tipo j .

O índice de discriminação é a probabilidade de duas linhagens não relacionadas de uma população serem distribuídas em grupos de tipagem diferentes. Os valores de D variam de zero a um e, quanto mais próximo de um, maior a capacidade do método de distinguir cada linhagem de uma população.

3.13 Análise dos prontuários

Os prontuários dos pacientes foram analisados em busca de informações como fatores de risco, elucidação das cadeias de transmissão e prognóstico (FRANCA; RIBEIRO; QUEIROZ-TELLES, 2008; BERDAL et al., 2014). Para isso, os seguintes dados foram extraídos dos prontuários dos pacientes: sexo, idade, ala hospitalar de admissão, internação na UTI, diagnóstico, tratamento com antibióticos, nutrição parenteral, presença de cateter venoso central, neutropenia, diabetes, doença de base e características clínico-evolutivas da candidemia. A pesquisa de dados foi realizada com a colaboração do Professor Doutor Roberto Martinez, responsável pelo Laboratório de Investigação em Micologia Médica do Departamento Clínica Médica da FMRP-USP. Além dos dados dos pacientes, dados do hospital foram utilizados para calcular a incidência da candidemia no período estudado.

3.14 Análise estatística

Os resultados dos testes de produção de enzimas hidrolíticas extracelulares (hemolisina, fosfolipase e proteinase) foram analisados utilizando-se os testes de Mann-Whitney ou Wilcoxon, no programa Graphpad Prism versão 5. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Os dados obtidos na análise dos prontuários foram analisados utilizando-se o software Epi Info™ versão 7 (*Centers for Disease Control and Prevention* - CDC, EUA) e os testes de χ^2 e Fisher. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3.15 Ética

Esse trabalho foi aprovado pelos comitês de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (número CAAE 26123913.9.0000.5403).

4.1 Prevalência das espécies de *Candida*

Durante a reconfirmação da identificação, 3 isolados previamente identificados como *C. parapsilosis*, por meio de testes fenotípicos, foram confirmados como *C. orthopsilosis* utilizando-se a técnica molecular. Assim, essa espécie foi incluída no trabalho.

No período estudado, que foi de junho de 2014 a novembro de 2015, ocorreram 79 episódios de candidemia causadas por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. orthopsilosis*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. *C. albicans* foi a principal causa de candidemia (44%), seguida por *C. glabrata* (19%), *C. tropicalis* (19%), *C. parapsilosis* (14%) e *C. orthopsilosis* (4%) (Figura 3).

Figura 3 - Distribuição das espécies isoladas de 79 episódios de candidemia de pacientes internados no Hospital das Clínicas da FMRP-USP.

Fonte: o autor

4.2 Sensibilidade aos antifúngicos

Os resultados dos testes de suscetibilidade *in vitro* dos isolados de *Candida* spp. aos antifúngicos utilizados no tratamento das candidemias, estão resumidos na Tabela 11 e na Figura 4.

Tabela 11 – Média e intervalo das CIMs de 79 isolados de *Candida* spp. obtidos de pacientes internados no Hospital das Clínicas da FMRP – USP.

<i>Candida</i> spp.	Antifúngico	Intervalo	CIM (µg/mL)		
			CIM média* ± DP	CIM 50	CIM 90
<i>C. albicans</i>	Anfotericina B	0,5 – 1	0,79 ± 0,24	1	1
	Caspofungina	0,0313 – 0,25	0,11 ± 0,07	0,125	0,25
	Fluconazol	0,125 – 512	0,2 ± 86,5	0,125	0,5
	Voriconazol	0,0313 – 128	0,04 ± 21,6	0,0313	0,0313
<i>C. glabrata</i>	Anfotericina B	0,5 – 1	0,95 ± 0,13	1	1
	Caspofungina	0,015 – 0,25	0,10 ± 0,07	0,125	0,25
	Fluconazol	2 – 4	2,76 ± 1,0	2	4
	Voriconazol	0,0313 – 0,125	0,07 ± 0,03	0,0625	0,125
<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B	0,25 – 1	0,64 ± 0,3	0,5	1
	Caspofungina	0,25 – 1	0,50 ± 0,24	0,5	1
	Fluconazol	0,25 – 4	0,53 ± 1,2	0,5	2
	Voriconazol	0,0313 – 0,0625	0,03 ± 0,01	0,0313	0,0625
<i>C. tropicalis</i>	Anfotericina B	0,25 – 1	0,72 ± 0,3	1	1
	Caspofungina	0,0625 – 0,125	0,09 ± 0,03	0,125	0,125
	Fluconazol	0,125 – 2	0,33 ± 0,5	0,25	1
	Voriconazol	0,0313 – 0,25	0,04 ± 0,06	0,0313	0,0625
<i>C. orthopsilosis</i>	Anfotericina B	0,5 – 1	0,63 ± 0,29	0,5	1
	Caspofungina	0,125 – 0,25	0,20 ± 0,07	0,25	0,25
	Fluconazol	0,5	0,5 ± 0	0,5	0,5
	Voriconazol	0,0313	0,0313 ± 0	0,0313	0,0313

DP: desvio padrão *média geométrica

Fonte: o autor

Figura 4 - Perfil de suscetibilidade dos 79 isolados de *Candida* spp. obtidos de pacientes internados no Hospital das Clínicas da FMRP – USP.

(A) Perfil de suscetibilidade à caspofungina; (B) Perfil de suscetibilidade ao fluconazol; (C) Perfil de suscetibilidade ao voriconazol. *C. albicans*: n=35, *C. glabrata*: n=15, *C. parapsilosis*: n=11, *C. tropicalis*: n=15 e *C. orthopsilosis*: n=3.

Fonte: o autor.

Como pode ser observado, três isolados de *C. glabrata* foram suscetíveis dose-dependentes à caspofungina; todos os isolados de *C. glabrata* e um isolado de

C. parapsilosis apresentaram-se suscetíveis dose-dependentes ao fluconazol e um isolado de *C. albicans* foi suscetível dose-dependente ao voriconazol. Ainda, um isolado de *C. albicans* apresentou altos valores de CIM para fluconazol (512 µg/mL) e voriconazol (128 µg/mL), caracterizando resistência. Quanto à anfotericina B, nenhum isolado apresentou-se resistente.

4.3 Produção de enzimas hidrolíticas extracelulares

Os resultados da produção de enzimas hidrolíticas extracelulares estão resumidos na Tabela 12 e Figura 5. *C. albicans* foi a única espécie que apresentou atividade de fosfolipase ($P < 0,0001$). Quanto à produção de proteinase, embora isolados das espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* tenham apresentado atividade desta enzima, a primeira espécie apresentou atividade significativamente maior ($P < 0,0001$). Finalmente, isolados de todas as espécies foram capazes de produzir hemolisina; entretanto, as atividades demonstradas por *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* foram significativamente maiores ($P < 0,0001$).

Tabela 12 – Média e intervalo da atividade das enzimas hidrolíticas dos 79 isolados de *Candida* spp. obtidos de pacientes internados no Hospital das Clínicas da FMRP – USP.

<i>Candida</i> spp.	Fator de virulência	Intervalo	Média de atividade ± Desvio padrão
<i>C. albicans</i>	Hemolisina	0,47 - 1	0,65 ± 0,09
	Fosfolipase	0,38 - 1	0,48 ± 0,11
	Proteinase	0,32 - 1	0,51 ± 0,16
<i>C. glabrata</i>	Hemolisina	0,45 – 0,69	0,57 ± 0,06
	Fosfolipase	1	1 ± 0
	Proteinase	1	1 ± 0
<i>C. parapsilosis</i>	Hemolisina	0,67 - 1	0,95 ± 0,11
	Fosfolipase	1	1 ± 0
	Proteinase	0,55 - 1	0,91 ± 0,15
<i>C. tropicalis</i>	Hemolisina	0,47 – 0,71	0,59 ± 0,07
	Fosfolipase	1	1 ± 0
	Proteinase	0,5 - 1	0,78 ± 0,13

continua

conclusão

<i>Candida</i> spp.	Fator de virulência	Intervalo	Média de atividade ± Desvio padrão
<i>C. orthopsilosis</i>	Hemolisina	0,73 – 1	0,84 ± 0,12
	Fosfolipase	1	1 ± 0
	Proteinase	0,7 - 1	0,9 ± 0,15

Fonte: o autor

Figura 5 - Produção de fatores de virulência pelos 79 isolados de *Candida* spp. obtidos de pacientes internados no Hospital das Clínicas da FMRP – USP.

(A) Produção de hemolisina; (B) Produção de fosfolipase; (C) Produção de proteinase. *C. albicans*: n=35, *C. glabrata*: n=15, *C. parapsilosis*: n=11, *C. tropicalis*: n=15 e *C. orthopsilosis*: n=3.

Fonte: o autor.

4.4 Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)

Os resultados da técnica de PFGE geraram o seguinte dendrograma de similaridade genética para as espécies de *Candida* avaliadas (Figura 6).

Figura 6 – Dendrograma de similaridade genética gerado a partir do perfil de bandas, obtido pela técnica de PFGE, para os 79 isolados de *Candida* spp. estudados.

Como pode ser observado, foram gerados 82 PFGE tipos, incluindo as linhagens ATCC. A técnica de PFGE foi capaz diferenciar as espécies e dividi-las em *clusters* com similaridade maior que 61,7%: PFGE-A, PFGE-B, PFGE-C, PFGE-D, PFGE-E e PFGE-F. O *cluster* PFGE-A contém todas as linhagens da espécie *C. tropicalis*; o PFGE-B, as linhagens da espécie *C. parapsilosis*; o PFGE-C a linhagem ATCC de *C. metapsilosis*; o PFGE-D, as linhagens de *C. orthopsilosis*; o PFGE-E reuniu todas as linhagens da espécie *C. albicans*; e o PFGE-F, as linhagens de *C. glabrata*. As linhagens pertencentes ao complexo *C. parapsilosis* apresentaram similaridade maior que 69,6%.

O índice de discriminação dessa técnica foi de 0,999. Somente dois grupos com amostras com 100% de similaridade foram gerados: 1, com as amostras 24, 35 e 50 e 2, a amostra 20 e a ATCC 90030. É interessante ressaltar que todas essas linhagens pertencem à espécie *C. glabrata* e, no caso das amostras 24, 35 e 50, todas foram isoladas da mesma unidade de internação, uma unidade de cirurgia, porém, em períodos de tempo diferentes, superior a três meses entre si. Finalmente, nenhuma correlação com produção de fatores de virulência, suscetibilidade aos antifúngicos ou dados epidemiológicos foi encontrada.

4.5 Microsatellite Length Polymorphism (MLP)

Como os marcadores de microssatélite são específicos para cada espécie de *Candida*, foram gerados quatro dendrogramas de similaridade genética.

A Figura 7 mostra os resultados da técnica MLP para *C. albicans*. Para essa espécie, foram gerados 34 MLP tipos e um grupo com 100% de similaridade, que compreende as linhagens 3, 18 e 79. Essas três linhagens foram isoladas de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), mas em UTIs diferentes: 3 e 18 em uma das UTIs do Hospital das Clínicas e 79 na Unidade de Emergência. Ainda, os episódios apresentaram diferença de mais de três meses entre si. Essas três amostras, quando submetidas à técnica PFGE, apresentaram similaridade maior que 74,4%. O índice de discriminação da técnica MLP para *C. albicans* foi de 0,995 e, assim como ocorreu com o PFGE, não foi possível correlacionar os dados clínicos, de suscetibilidade e produção de fatores de virulência com a disposição das amostras no dendrograma de similaridade genética.

Figura 7 - Dendrograma de similaridade genética, gerado a partir do polimorfismo de microssatélites, para os 35 isolados de *C. albicans* estudados.

Fonte: o autor.

Para *C. glabrata*, o dendrograma (Figura 8) traz 12 MLP tipos e três grupos de isolados com 100% de similaridade, grupo 1, com as amostras 21, 24 e 35; grupo 2,

com as amostras 7 e 20; e grupo 3, com 6 e 72. Na técnica PFGE, as amostras 24 e 35 foram indistinguíveis entre si e a amostra 21 apresentou similaridade de 96,6% em relação às amostras 24 e 35; 7 e 20 apresentaram similaridade de 93,7%; e 6 e 72, 89,6%. Como discutido anteriormente, as linhagens 24 e 35 foram isoladas da mesma unidade de internação, entretanto, a linhagem 21 foi isolada de outra unidade. As linhagens do grupo 2 não apresentam características em comum. Já as linhagens que compõem o grupo 3 apresentaram-se suscetíveis dose-dependentes à caspofungina, mas uma linhagem que não foi incluída nesse grupo também apresenta essa característica. O índice de discriminação foi de 0,958.

Figura 8 - Dendrograma de similaridade genética, gerado a partir do polimorfismo de microssatélites, para os 15 isolados de *C. glabrata* estudados.

Fonte: o autor.

A Figura 9 traz o dendrograma de similaridade genética, gerado por MLP, para os isolados de *C. parapsilosis*. Como pode ser observado, foram gerados 12 MLP tipos e nenhum grupo com 100% de similaridade. Assim, o índice de discriminação para essa espécie foi de 1, o que também ocorreu quando a técnica PFGE foi utilizada para essa espécie.

Figura 9 - Dendrograma de similaridade genética, gerado a partir do polimorfismo de microssatélites, para os 11 isolados de *C. parapsilosis* estudados.

Fonte: o autor

Para a espécie *C. tropicalis*, a técnica MLP gerou um dendrograma (Figura 10) com 11 MLP tipos e dois grupos de amostras com similaridade de 100%: grupo 1, com as amostras 22, 26, 55 e ATCC 750; e grupo 2, com 59, 70 e 71. As linhagens desses dois grupos não apresentam nenhuma característica comum exclusiva do grupo. As linhagens 22, 26 e 55 apresentaram similaridade de 91,5% na técnica PFGE, mas essa similaridade foi de 68,6% em relação à ATCC 750. Já as linhagens 70 e 71 apresentaram 97,4% com a técnica de PFGE, mas essa similaridade diminuiu para 68,6% com a amostra 59. O índice de discriminação foi de 0,925.

Figura 10 - Dendrograma de similaridade genética, gerado a partir do polimorfismo de microssatélites, para os 15 isolados de *C. tropicalis* estudados.

Fonte: o autor

4.6 Multilocus Sequence Typing (MLST)

Para os 14 isolados de *C. albicans* selecionados, foram gerados 14 *Diploid Sequence Types* (DST) (Tabela 13), sendo que 11 destes não pertenciam a nenhum DST previamente descrito e que foram depositados no banco de dados para essa espécie (<http://pubmlst.org/calbicans/>).

Tabela 13 - Número dos alelos e *Diploid Sequence Type* obtidos, por MLST, para as 14 linhagens de *C. albicans* selecionadas.

Linhagem	DST	Gene						
		<i>ATT1a</i>	<i>ACC1</i>	<i>ADP1</i>	<i>MPIb</i>	<i>SYA1</i>	<i>VPS13</i>	<i>ZwF1b</i>
4	3169*	23	3	3	3	3	48	95
12	3178*	31	2	5	9	2	78	5
18	602	55	14	4	54	6	45	15
19	415	13	10	15	6	2	49	15

continua

conclusão

Linhagem	DST	Gene						
		<i>ATT1a</i>	<i>ACC1</i>	<i>ADP1</i>	<i>MPIb</i>	<i>SYA1</i>	<i>VPS13</i>	<i>ZwF1b</i>
29	3170*	8	5	6	12	2	21	5
33	3171*	13	32	15	19	34	160	15
40	3172*	2	5	5	9	2	106	5
58	3179*	2	5	5	12	2	21	5
61	3173*	8	5	5	12	2	106	5
67	3174*	2	5	6	157	2	78	5
68	1118	55	3	4	54	6	45	15
69	3175*	13	10	15	6	50	49	15
74	3176*	2	5	6	12	2	24	30
78	3177*	2	2	6	12	2	6	5

*Novos DSTs

Fonte: o autor.

O diagrama de similaridade genética dos DSTs de *C. albicans* encontra-se disponível no apêndice E e permite a visualização da relação das linhagens estudadas no presente trabalho com linhagens do mundo todo, depositadas no banco de dados. A Figura 11 corresponde à parte desse diagrama que representa as linhagens estudadas no presente trabalho.

As linhagens 12, 29, 33, 61, 67 e 74 não foram incluídas em nenhum complexo clonal.

A linhagem 4 (DST 3169) apresentou 3 *single locus variants* (SLV) (Apêndice B) e 22 *double locus variants* (DLV). O DST 3169 apresenta somente a linhagem do presente trabalho depositada no banco de dados de MLST. Os DSTs (SLVs) relacionados apresentam linhagens isoladas de sangue, na Alemanha, Noruega e Kuwait.

A linhagem 18 (DST 602) apresentou 14 SLVs (Apêndice B) e 36 DLVs. O DST 602 compreende linhagens isoladas de sangue, fezes e animais, no Brasil, Guiana, França e Coréia do Sul. Os DSTs relacionados como SLVs incluem linhagens isoladas de sangue, vagina, fezes, animais, orofaringe, lavado broncoalveolar, urina, escarro e outras, no Brasil, Guiana, Reino Unido, China, Austrália, Kuwait e Coréia do Sul.

A linhagem 19, de DST 415, apresentou 4 SLVs (Apêndice B) e 28 DLVs, sendo que um dos DSTs envolvidos é o 3175, da linhagem 69 do presente trabalho. O DST 415 inclui uma linhagem isolada de sangue, na Austrália. Além do DST 3175, os demais relacionados (SLVs) apresentam linhagens isoladas de sangue e lesões na Austrália e China.

A linhagem 40, de DST 3172, apresentou 7 SLVs (Apêndice B) e 88 DLVs. O DST 3172 apresenta somente a linhagem do presente trabalho depositada no banco de dados de MLST. Já os DSTs relacionados como SLVs incluem linhagens obtidas de sangue, urina, vagina, reto e outras, na Colômbia, Israel, Reino Unido, Marrocos, Estados Unidos, França, China, Irlanda, Austrália, Índia, Japão e Kuwait. O DST 581, SLV do DST 3172, também foi relacionado como SLV da linhagem 58.

A linhagem 58, de DST 3179, apresentou 8 SLVs (Apêndice B) e 75 DLVs. O DST 3179 inclui somente a linhagem do presente trabalho depositada no banco de dados. As demais linhagens relacionadas (SLVs) foram isoladas de sangue, urina, boca, fezes e vagina, na Colômbia, Israel, Estados Unidos, Reino Unido, Venezuela, África do Sul, França, Malásia, Austrália, Marrocos, Brasil, Irlanda, Kuwait e Áustria.

A linhagem 68 (DST 1118) foi relacionada a 3 SLVs (Apêndice B) e 25 DLVs. No banco de dados, o DST 1118 inclui linhagens isoladas de sangue, no Brasil, em 2013 e na Guiana. Os DSTs relacionados (SLVs) incluem o 602, relacionado à linhagem 18 do presente trabalho, e outros que apresentam linhagens isoladas em Taiwan e no Brasil, de amostras de sangue.

A linhagem 69 (DST 3175) apresentou 3 SLVs (Apêndice B) e 23 DLVs. O referido DST contém somente a linhagem do presente trabalho no banco de dados. As demais linhagens relacionadas como SLVs, além da linhagem 19 do presente trabalho, foram isoladas de sangue, fezes e boca, na Austrália e Bélgica.

Finalmente, a linhagem 78, de DST 3177, apresentou 2 SLVs (Apêndice B) e 21 DLVs. O referido DST contém somente a linhagem do presente trabalho no banco de dados. Os demais DSTs relacionados (SLVs) contém linhagens isoladas de sangue, no Reino Unido e Japão.

Figura 11 - Diagrama de similaridade genética das 14 linhagens de *C. albicans* selecionadas e das linhagens depositadas no banco de dados de MLST.

Construído em 18/01/17.

● DSTs do presente trabalho.

Fonte: o autor.

A Figura 12 traz o dendrograma de similaridade genética, gerado por MLST, para as 14 linhagens de *C. albicans* selecionadas. Como pode ser observado, nenhuma linhagem apresentou 100% de similaridade com outra e, assim, o índice de discriminação para essa espécie foi de 1, semelhante ao resultado da técnica de PFGE. Não foi possível correlacionar os dados clínicos, de suscetibilidade e produção de fatores de virulência com a disposição das amostras no dendrograma.

Figura 12 - Dendrograma de similaridade genética, gerado por MLST, para as 14 linhagens de *C. albicans* selecionadas.

Fonte: o autor.

Para *C. glabrata*, um novo alelo foi obtido, além de dois novos *Sequence Types* (ST). Estes serão submetidos ao banco de dados de MLST para essa espécie (<http://pubmlst.org/cglabrata/>) assim que a submissão de dados for disponibilizada. A Tabela 14 traz os alelos e STs para essa espécie.

Tabela 14 - Número dos alelos e *Sequence Type* obtidos, por MLST, para as 10 linhagens de *C. glabrata* selecionadas.

Linhagem	ST	Gene					
		<i>FKS</i>	<i>LEU2</i>	<i>NMT1</i>	<i>TRP1</i>	<i>UGP1</i>	<i>URA3</i>
6	10000*	5	7	8	4	3	6
7	3	5	7	8	7	3	6
16	75	50	16	9	4	13	50
20	3	5	7	8	7	3	6
21	7	3	4	4	3	3	4
25	16	7	7	11	10	5	9
28	10001*	16	9	10000#	13	13	9
46	15	8	5	3	5	1	1

continua

conclusão

Linhagem	ST	Gene					
		<i>FKS</i>	<i>LEU2</i>	<i>NMT1</i>	<i>TRP1</i>	<i>UGP1</i>	<i>URA3</i>
50	7	3	4	4	3	3	4
72	3	5	7	8	7	3	6

*Novos STs

#Novo alelo

Caracteres em vermelho: números de alelo e STs provisórios. O banco de dados encontra-se indisponível para novas submissões.

Fonte: o autor

O diagrama de similaridade genética dos STs de *C. glabrata* encontra-se disponível no apêndice F e a Figura 13 corresponde à parte desse diagrama que representa as linhagens estudadas no presente trabalho.

As linhagens 28 e 46 não foram incluídas em nenhum complexo clonal. A linhagem 6 (ST provisório 10000) apresentou 7 STs DLVs e 1 SLV (Apêndice C), o ST 3, no qual as linhagens 7, 20 e 72 do presente trabalho se incluem. O ST 10000 foi atribuído provisoriamente, a fim de possibilitar a análise dos resultados, já que o banco de dados de MLST para *C. glabrata* encontra-se indisponível para novas submissões. Assim que as novas submissões forem liberadas, os novos alelos e STs encontrados nesse trabalho serão submetidos. O ST 3 apresentou 8 SLVs (Apêndice C) e nenhum DLV. Esse ST inclui linhagens isoladas de fezes, boca, ânus, vagina, sangue, fluido de articulação, escarro e outras fontes desconhecidas, na Bélgica, Alemanha, Holanda, Colômbia, Argentina, Brasil, México, Equador, Chile, Espanha, Reino Unido e Estados Unidos.

A linhagem 16, de ST 75, apresentou 1 SLV (Apêndice C) e nenhum DLV. O ST 75 apresenta linhagens isoladas de sangue, vagina e outras fontes, no Irã. O ST 78 (SLV) apresenta uma linhagem isolada de urina, no Irã.

As linhagens 21 e 50, de ST 7, apresentaram 4 SLVs (Apêndice C) e nenhum DLV. O ST 7 inclui linhagens isoladas de vagina, boca, nariz, fezes, escarro e fontes desconhecidas, na Bélgica, Alemanha, Japão e Equador. Já as linhagens relacionadas foram isoladas de pus, sangue e fonte desconhecida, no Japão, Estados Unidos e Taiwan.

Finalmente, a linhagem 25 (ST 16) apresentou 4 SLVs (Apêndice C) e nenhum DLV. O ST 16 apresenta linhagens isoladas de ascite, lavado

broncoalveolar, sangue, vagina, boca e fontes desconhecidas, na Colômbia, Brasil, México, Equador e Estados Unidos. Os STs relacionados apresentam linhagens de origem desconhecida, no Brasil, Estados Unidos e Taiwan.

Figura 13 - Diagrama de similaridade genética das 10 linhagens de *C. glabrata* selecionadas e das linhagens depositadas no banco de dados de MLST.

Construído em 25/01/17.

● STs do presente trabalho.

● STs provisórios.

Fonte: o autor.

O dendrograma de similaridade genética de *C. glabrata* (Figura 14), gerado por MLST, traz dois grupos de amostras com 100% de similaridade, grupo 1, composto pelas amostras 7, 20 e 72; e grupo 2, com as amostras 21 e 50. As amostras 7, 20 e 72 apresentaram similaridade maior que 90% quando submetidas ao PFGE. Quanto ao MLP, 7 e 20 apresentaram 100% de similaridade entre si e 87,5% em relação à 72. Já as amostras do grupo 2 apresentaram similaridade de 96,6% na técnica PFGE e 8,3% na técnica MLP. Não foi possível correlacionar os índices de similaridade com os dados clínicos, de virulência e suscetibilidade. O índice de discriminação foi de 0,911.

Figura 14 - Dendrograma de similaridade genética, gerado por MLST, para as 10 linhagens de *C. glabrata* selecionadas.

Fonte: o autor.

Finalmente, as 10 linhagens selecionadas de *C. tropicalis*, quando submetidas ao MLST, originaram 5 novos alelos e 8 novos DSTs (Tabela 15).

Tabela 15 - Número dos alelos e *Diploid Sequence Type* obtidos, por MLST, para as 10 linhagens de *C. tropicalis* selecionadas.

Linhagem	DST	Gene					
		<i>ICL1</i>	<i>MDR1</i>	<i>SAPT2</i>	<i>SAPT4</i>	<i>XYR1</i>	<i>ZWF1a</i>
11	669*	16	142 [#]	4	20	132	1
26	670*	1	24	3	7	17	6
34	671*	39 [#]	143 [#]	47 [#]	7	88	29
37	318	3	4	4	41	77	4
59	672*	1	1	10	1	31	1
62	252	1	66	3	7	9	7
64	673*	1	17	48 [#]	14	65	3
71	674*	5	33	4	34	2	9
76	675*	3	7	4	6	6	7
80	676*	5	33	4	34	51	9

*Novos STs

[#]Novos alelos

Fonte: o autor.

O diagrama de similaridade genética dos DSTs de *C. tropicalis* encontra-se disponível no apêndice G. A Figura 15 corresponde à parte desse diagrama que representa as linhagens estudadas no presente trabalho.

Figura 15 - Diagrama de similaridade genética das 10 linhagens de *C. tropicalis* selecionadas e das linhagens depositadas no banco de dados de MLST.

Construído em 23/01/17.

● DSTs encontrados no presente trabalho.

Fonte: o autor.

As linhagens 11, 34, 62 e 64 não foram relacionadas em nenhum complexo clonal, não apresentando, portanto, nenhum SLV (Apêndice D).

A linhagem 26, de DST 670, apresentou 6 SLVs (Apêndice D) e 5 DLVs. O DST 670 apresenta somente a linhagem desse trabalho no banco de dados mundial de MLST para *C. tropicalis*. Os DSTs relacionados como SLVs apresentam linhagens isoladas de sangue, vagina e fezes, no Brasil, Estados Unidos e Reino Unido.

A linhagem 37 (DST 318) apresentou 3 SLVs (Apêndice D) e 4 DLVs. O referido DST apresenta uma linhagem isolada de orofaringe, na China. Os demais DSTs relacionados (SLVs) incluem linhagens isoladas de urina, orofaringe e outras regiões anatômicas, na China e no Brasil.

A linhagem 59, de DST 672, apresentou 3 SLVs (Apêndice D) e 11 DLVs. O DST 672 inclui somente a linhagem do presente trabalho no banco de dados. Os

outros DSTs relacionados (SLVs) incluem linhagem isoladas de sangue, no Reino Unido e Brasil.

As linhagens 71 (DST 674) e 80 (DST 676) apresentaram-se SLV entre si (Apêndice D) e nenhum DLV. No banco de dados, ambos os DSTs contém somente as linhagens do presente trabalho.

Finalmente, a linhagem 76, de DST 675, apresentou 2 SLVs (Apêndice D) e 6 DLVs. O DST 675 contém somente a referida linhagem no banco de dados. Os demais DSTs, SLVs, apresentam linhagens isoladas de sangue e orofaringe, no Reino Unido e Índia.

A Figura 16 traz dendrograma de similaridade genética gerado por MLST para as 10 linhagens de *C. tropicalis* selecionadas. Não houve 100% de similaridade entre as amostras, o que significa um índice de discriminação de 1. Entretanto, todas as amostras apresentaram similaridade maior que 98,4%, o que não ocorreu quando essas amostras foram submetidas ao PFGE e MLP. Assim como nos resultados anteriores, não houve correlação com a distribuição das amostras no dendrograma e os dados clínicos, de virulência e suscetibilidade aos antifúngicos.

Figura 16 - Dendrograma de similaridade genética, gerado por MLST, para as 10 linhagens de *C. tropicalis* selecionadas.

Fonte: o autor.

4.7 Análise dos prontuários

Durante o período estudado, a incidência de candidemia causada por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. tropicalis* no hospital foi de 1,52 episódios por 1000 admissões. A média da idade dos pacientes foi de $42,7 \pm 26,6$ e variou de 0,02 a 88 anos. Entretanto, a média de idade dos pacientes acometidos por *C. orthopsilosis* foi menor que um ano ($0,58 \pm 0,32$) (Figura 17).

Figura 17 - Média de idade dos pacientes internados no Hospital das Clínicas da FMRP – USP, acometidos por candidemia, no período de junho de 2014 a novembro de 2015.

Fonte: o autor.

A candidemia afetou mais homens (57%) do que mulheres (43%), exceto por pacientes acometidos por *C. orthopsilosis*, dos quais 66,7% eram mulheres (Figura 18).

Figura 18 - Sexo dos pacientes internados no Hospital das Clínicas da FMRP – USP, acometidos por candidemia, no período de junho de 2014 a novembro de 2015.

Fonte: o autor.

Dos 79 pacientes, 33 (41,8%) estavam internados em unidades médicas, 19 (24%) em unidades de cirurgia e 27 (34,2%) em UTIs. Porém, todas as amostras de *C. orthopsilosis* foram isoladas de pacientes internados em UTIs e a maioria de *C. glabrata* (46,7%) e *C. parapsilosis* (45,4%) foi isolada de pacientes internados em unidades cirúrgicas (Figura 19).

Figura 19 - Alas de internação dos pacientes do Hospital das Clínicas da FMRP – USP, acometidos por candidemia, no período de junho de 2014 a novembro de 2015.

Fonte: o autor.

Todos os pacientes possuíam pelo menos uma doença de base e as mais comuns foram: câncer sólido (27,8%), diabetes (22,8%), doenças gastrointestinais (20,2%) e doenças hepáticas (15,2%). Entretanto, pacientes acometidos por *C. parapsilosis* foram afetados, principalmente, por doenças gastrointestinais (36,4%); pacientes acometidos por *C. tropicalis* foram afetados, principalmente, por doenças pulmonares, hepáticas e neoplasias hematológicas (20%); e pacientes acometidos por *C. orthopsilosis* apresentaram, principalmente, doenças genéticas e malformações congênitas (66,7%) (Tabela 16).

Muitos pacientes apresentaram um ou mais fatores de risco no período de 30 dias anteriores ao episódio de candidemia e a antibioticoterapia foi o mais comum (86,1%), seguido por sonda vesical (68,3%), acesso venoso central (59,5%), procedimentos cirúrgicos (54,4%), nutrição parenteral (41,8%) e neutropenia (13,9%) (Tabela 16). Houve relação entre o uso de sonda vesical e desfecho negativo da candidemia ($P=0.03$) (Tabela 17).

Tabela 16 – Doenças de base e fatores de risco apresentados por pacientes acometidos por candidemia no Hospital das Clínicas da FMRP, de junho de 2014 a novembro de 2015.

	Candida spp.					
	C. albicans (n=35)	C. glabrata (n= 15)	C. parapsilosis (n=11)	C. tropicalis (n=15)	C. orthopsilosis (n=3)	Todas (n=79)
Fatores de risco n (%)						
Antibioticoterapia	27 (77,1)	14 (93,3)	10 (90,9)	14 (93,3)	3 (100)	68 (86,1)
Acesso venoso central	19 (54,3)	9 (60)	8 (72,7)	8 (53,3)	3 (100)	47 (59,5)
Cirurgias	17 (48,6)	10 (66,7)	7 (63,6)	7 (46,7)	2 (66,7)	43 (54,4)
Neutropenia	4 (11,4)	0	2 (18,2)	5 (33,3)	0	11 (13,9)
Nutrição parenteral	13 (37,1)	5 (33,3)	6 (54,5)	7 (46,7)	2 (66,7)	33 (41,8)
Sonda vesical	23 (65,7)	12 (80)	5 (45,4)	12 (80)	2 (66,7)	54 (68,3)
Doenças de base n (%)						
Câncer sólido	11 (31,4)	7 (46,7)	2 (18,2)	2 (13,3)	0	22 (27,8)
Prematuridade	2 (5,7)	0	0	0	1 (33,3)	3 (3,8)
Neoplasia hematológica	4 (11,4)	0	1 (9,1)	3 (20)	0	7 (8,9)
Doenças cardíacas	1 (2,8)	1 (6,7)	1 (9,1)	1 (6,7)	0	4 (5,1)
Doenças neurológicas	4 (11,4)	0	0	1 (6,7)	0	5 (6,3)
Transplante de órgão	1 (2,8)	0	0	0	0	1 (1,3)

continua

conclusão

	<i>Candida</i> spp.					Todas (n=79)
	<i>C. albicans</i> (n=35)	<i>C. glabrata</i> (n= 15)	<i>C. parapsilosis</i> (n=11)	<i>C. tropicalis</i> (n=15)	<i>C. orthopsilosis</i> (n=3)	
Doenças gastrointestinais	7 (20)	3 (20)	4 (36,4)	2 (13,3)	0	16 (20,2)
Doenças pulmonares	4 (11,4)	1 (6,7)	0	3 (20)	1 (33,3)	9 (11,4)
Doenças vasculares	2 (5,7)	2 (13,3)	1 (9,1)	0	0	5 (6,3)
HIV	4 (11,4)	0	0	0	0	4 (5,1)
Trauma	2 (5,7)	0	2 (18,2)	2 (13,3)	0	6 (7,6)
Doenças genéticas / Malformação congênita	2 (5,7)	0	1 (9,1)	1 (6,7)	2 (66,7)	6 (7,6)
Doenças renais	1 (2,8)	1 (6,7)	1 (9,1)	0	0	3 (3,8)
Diabetes Mellitus	10 (28,6)	4 (26,7)	2 (18,2)	2 (13,3)	0	18 (22,8)
Doenças hepáticas	4 (11,4)	5 (33,3)	0	3 (20)	0	12 (15,2)
Doenças pancreáticas	1 (2,8)	1 (6,7)	0	1 (6,7)	0	3 (3,8)

Fonte: o autor.

Tabela 17 - Relação entre características clínicas e desfecho em pacientes com candidemia internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto de junho de 2014 a novembro de 2015.

	Óbito n (%)	Sobrevivência n (%)	Valor de P
Gênero			
Feminino	19 (24)	15 (19)	0,5
Masculino	22 (27,8)	23 (29,2)	
Antibioticoterapia			
Não	7 (8,9)	4 (5,1)	0,4
Sim	34 (43)	34 (43)	
Acesso venoso central			
Não	15 (19)	17 (21,5)	0,5
Sim	26 (32,9)	21 (26,6)	
Cirurgias			
Não	18 (22,8)	19 (24)	0,6
Sim	23 (29,2)	19 (24)	

continua

conclusão

	Óbito n (%)	Sobrevivência n (%)	Valor de <i>P</i>
Neutropenia			
Não	37 (46,8)	31 (39,2)	0,3
Sim	4 (5,1)	7 (8,9)	
Nutrição parenteral			
Não	28 (35,4)	18 (22,8)	0,06
Sim	13 (16,5)	20 (25,3)	
Sonda vesical			
Não	8 (10,1)	16 (20,3)	0,03
Sim	33 (41,8)	22 (27,8)	

Fonte: o autor.

Em geral, a taxa de mortalidade total foi de 52%. A espécie que apresentou a maior taxa foi *C. glabrata* (73%), seguida por *C. albicans* (51%), *C. tropicalis* (47%), *C. parapsilosis* (36%) e *C. orthopsilosis* (33%). Apesar da diferença de mortalidade apresentada entre as espécies, essa não foi estatisticamente significativa ($P=0,35$).

Apesar dos progressos na prevenção e controle de infecções nosocomiais, a candidemia ainda é um desafio nos hospitais do mundo todo. Essa doença é associada a altas taxas de mortalidade, prolongamento do tempo de hospitalização e altos custos hospitalares (MOTTA et al., 2010; CAGGIANO et al., 2015).

A incidência da candidemia durante o período estudado foi de 1,52 episódios a cada 1000 admissões, valor compatível com outros estudos brasileiros: 1,87/1000 (Motta et al., 2010), 1,66/1000 (COLOMBO et al., 2007), 1,2/1000 (WILLE et al., 2013) e 1,8/1000 admissões (HOFFMANN-SANTOS et al., 2013). Estudos no mundo todo relataram diferentes valores de incidência: na China, 0,38/1000 (TAN et al., 2015); em Hong Kong, 0,25/1000 (TAN et al., 2015); na Índia, 1,94/1000 (TAN et al., 2015); na Tailândia, 1,31/1000 (TAN et al., 2015); em Taiwan, 2,93/1000 (TAN et al., 2015); na Turquia, 2,9/1000 (SUTCU et al., 2016). Ainda, estudos realizados em um mesmo país podem observar valores diferentes. Na Itália, De Rosa et al. (2015) reportaram 1,8/1000, enquanto Caggiano et al. (2015) obtiveram 0,31/1,000 e Bassetti et al. (2015), 0,79/1000.

Os valores de incidência da candidemia podem variar entre países, hospitais e até entre diferentes unidades em um mesmo hospital. Esses valores são afetados por muitos fatores, que incluem as práticas hospitalares utilizadas, o perfil dos pacientes, o tamanho do hospital estudado, os antifúngicos disponíveis para tratamento, as ferramentas de diagnóstico utilizadas e o tempo para a conclusão do mesmo (YAPAR, 2014; CAGGIANO et al., 2015; VALLABHANENI et al., 2016). Assim, estudos locais como esse são fundamentais para a prevenção e tratamento da candidemia.

Apesar dessa doença ser causada por espécies de *Candida*, cada espécie apresenta características específicas, tais como morfologia, composição da parede celular, assimilação de nutrientes, produção de fatores de virulência e suscetibilidade aos antifúngicos (WHIBLEY; GAFFEN, 2015; ALBATAINEH et al., 2016). Complexos de espécies, como *C. parapsilosis sensu lato* podem compreender espécies fenotipicamente idênticas, mas que apresentam diferenças quanto à suscetibilidade aos antifúngicos, prevalência e virulência (CHEN et al., 2010; ZICCARDI et al., 2015). Como a identificação realizada nos hospitais geralmente é baseada em características bioquímicas, essas espécies podem ser erroneamente identificadas, o que gera dados imprecisos sobre sua epidemiologia.

No presente trabalho, *C. albicans* foi a principal espécie causadora de candidemia, seguida por *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis* (Figura 3). Apesar de vários estudos demonstrarem que a prevalência das espécies não-*albicans* está aumentando, *C. albicans* ainda é a espécie predominante em muitos locais. Caggiano et al. (2015) observaram uma prevalência de 44,2% para *C. albicans*, 34,7% para *C. parapsilosis*, 5,6% para *C. glabrata* e 4,8% para *C. tropicalis*. Wille et al. (2013) reportaram 42% de *C. albicans*, 27% de *C. tropicalis*, 22% de *C. parapsilosis* e 4% de *C. glabrata*. Na China, Gong et al. (2016) verificaram que *C. albicans* causou candidemia em 40,1% dos pacientes, *C. parapsilosis* em 21,3%, *C. tropicalis* em 17,2%, e *C. glabrata* em 12,9%. Entretanto, Chan et al. (2015) observaram maior prevalência de *C. parapsilosis* (52%) do que *C. albicans* (25%), *C. tropicalis* (7.5%), *C. glabrata* (6.6%), *C. lusitaniae* (5.6%) e *C. krusei* (2.8%) em um hospital pediátrico, o que reforça que as características do paciente influenciam na prevalência das espécies.

A espécie *C. tropicalis* é um importante agente causador de candidemia no Brasil. No estudo de Costa et al. (2014), essa espécie foi a mais prevalente, causando 30,5% dos casos de candidemia, seguida por *C. albicans*, com 28,7%, *C. parapsilosis*, com 24,1% e *C. glabrata*, com 8,3%.

A prevalência da espécie *C. glabrata* no Brasil é, geralmente, pequena; entretanto, esse trabalho encontrou uma quantidade significativa de candidemia causada por essa espécie (Figura 3). O recente aumento da prevalência de *C. glabrata* tem sido relacionado ao uso de fluconazol como profilaxia, uma vez que essa espécie apresenta reduzida suscetibilidade a esse antifúngico (SARDI et al., 2013; COLOMBO et al., 2014; GUPTA; VARMA, 2015). Embora a prevalência de *C. glabrata* seja pequena no Brasil, em outros países essa espécie é frequente causadora de candidemia. Nos Estados Unidos, Cleveland et al. (2015) observaram prevalência de 36% para *C. albicans*, 27% para *C. glabrata*, 15% para *C. parapsilosis* e 9% para *C. tropicalis*.

Desde que o complexo *C. parapsilosis* foi dividido em 3 espécies (*C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. parapsilosis sensu stricto*), estudos têm se dedicado a descrever as diferenças epidemiológicas dessas espécies. Embora *C. parapsilosis* seja a espécie predominante, *Candida orthopsilosis* já foi relacionada como a quinta maior causa de candidemia no estudo de Pemán et al. (2012),

realizado na Espanha. *C. metapsilosis* já foi relacionada à menor virulência e sua frequência em episódios de candidemia é bem reduzida (BLANCO-BLANCO et al., 2014; ZICCARDI et al., 2015). No presente trabalho não foram encontrados isolados de *C. metapsilosis*, assim como nos trabalhos de Blanco-Blanco et al. (2014), realizado na Espanha, e Taj-Aldeen et al. (2014), realizado no Qatar. Entretanto, Chen et al. (2010) relataram 91,1% de *C. parapsilosis*, 4,4% de *C. metapsilosis* e 4,4% de *C. orthopsilosis*.

A prevalência das espécies de *Candida* também é afetada pelos antifúngicos utilizados como profilaxia. Os testes de sensibilidade são essenciais para o monitoramento do aparecimento de resistência aos antifúngicos e também podem ser utilizados para guiar as escolhas terapêuticas (MOTTA et al., 2010). A resistência *in vitro* pode resultar em resistência clínica, o que pode levar a falhas na terapia e, conseqüentemente, morte. A resistência pode ser intrínseca ou adquirida (WILLE et al., 2013; CONSTANTE et al., 2014; BASSETTI et al., 2015; PERLIN, SHOR, ZHAO, 2015; SANGUINETTI, POSTERARO; LASS-FLÖRL, 2015).

A resistência adquirida pode ser decorrente de menor assimilação da droga, modificação do alvo terapêutico ou expressão de transportadores que expulsam a droga do interior da célula, tais como as bombas de efluxo (PERLIN; SHOR; ZHAO, 2015; SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLÖRL, 2015).

A resistência às equinocandinas permanece baixa; entretanto, isolados de *C. glabrata* tem apresentado reduzida suscetibilidade a essa classe de antifúngicos (PERLIN, SHOR, ZHAO, et al., 2015). Os presentes resultados corroboram com esse fato, já que somente isolados dessa espécie apresentaram-se suscetíveis dose-dependentes à caspofungina. A resistência a essa classe é relacionada a mutações no gene *FKS* e reduzida produção de 1,3-beta-glucana (PERLIN, SHOR, ZHAO, 2015).

Candida glabrata é intrinsecamente menos suscetível ao fluconazol e, como esperado, no presente estudo todos os isolados pertencentes a essa espécie foram suscetíveis dose-dependentes a esse antifúngico (RODRIGUES; HENRIQUES, 2013; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

Em *C. albicans*, a resistência aos antifúngicos azólicos é relacionada com mutações no gene *Erg11*, que codifica a proteína alvo dos antifúngicos azólicos (lanosterol 14- α -desmetilase - envolvida na via biossintética do ergosterol); ou na

expressão dos genes *CDR1*, *CDR2* e *MDR1*, que codificam proteínas capazes de expulsar os antifúngicos do interior celular. Estudos recentes reportaram o aumento da resistência aos azóis em espécies que geralmente são relacionadas com alta suscetibilidade a esses antifúngicos, tais como *C. albicans* e *C. parapsilosis* (PERLIN; SHOR; ZHAO; 2015; SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLÖRL, 2015). É interessante observar que a linhagem da espécie *C. albicans* que apresentou resistência ao fluconazol e voriconazol foi isolada de um paciente HIV positivo, que provavelmente já fez uso de fluconazol como profilaxia.

A resistência à anfotericina B é rara e os resultados aqui apresentados estão de acordo, visto que todos os isolados foram suscetíveis a esse antifúngico. Porém, existem relatos de isolados com suscetibilidade reduzida ocasionada por diminuição no conteúdo de ergosterol na membrana celular (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; NETT; ANDES, 2016).

A prevalência também pode ser afetada pela produção de fatores de virulência, tais como as enzimas hidrolíticas extracelulares, que são de grande importância no estabelecimento da candidemia. Estudos anteriores mostraram que a produção pode variar de acordo com as espécies e local de isolamento da amostra (TELLAPRAGADA et al., 2014; SARIGUZEL et al., 2015). A lise dos eritrócitos pelas hemolisinas permite que a levedura adquira ferro, o que é essencial para a sobrevivência da mesma (SENEVIRATNE et al., 2011; FAVERO et al., 2014). A produção de proteinase facilita o escape do sistema imunológico do hospedeiro através da degradação de albumina e alfa-macroglobulina, entre outras (SENEVIRATNE et al., 2011). A hidrólise dos fosfolípidos de membrana, pela fosfolipase, leva à lise celular e danos aos tecidos (MATTEI et al., 2013; SARIGUZEL et al., 2015).

Os resultados desse trabalho estão de acordo com outros estudos. De Luca et al. (2012) reportaram forte atividade de proteinase e fosfolipase em *C. albicans*, em relação a *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Sariguzel et al. (2015) encontraram maior atividade de fosfolipase e proteinase em *C. albicans* que em isolados de espécies não-*albicans*. O mesmo foi descrito por Tay et al. (2011). Riceto et al. (2014) reportaram atividade hemolítica em *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Ainda, Abi-Chacra et al. (2013) obtiveram fraca atividade hemolítica e forte atividade proteolítica em *C. parapsilosis*.

Além da prevalência, suscetibilidade às drogas utilizadas na terapia e produção de fatores de virulência, os estudos epidemiológicos podem incluir as técnicas de genotipagem, que são utilizadas na identificação de rotas de transmissão e confirmação de surtos em unidades hospitalares (ABDELJELIL et al., 2011). Não existe técnica ideal e cada uma apresenta vantagens e desvantagens (CHEN et al., 2005; KHADRAOUI et al., 2010; ABBES et al., 2012; SONG et al., 2014; CHILLEMI et al., 2016).

No presente trabalho, a técnica PFGE apresentou índice de discriminação de 0,999, compatível com outros descritos anteriormente. Chen et al. (2005), em seu trabalho com linhagens de *C. albicans* isoladas de diferentes sítios em hospitais de Taiwan, obtiveram um índice de discriminação de 0,995. Também em Taiwan, Lin et al. (2007) estudaram linhagens da espécie *C. glabrata* isoladas de diferentes sítios anatômicos e relataram um índice de discriminação de 0,99.

Os índices de discriminação obtidos na técnica MLP foram de 0,995 para *C. albicans*; 0,958 para *C. glabrata*; 1 para *C. parapsilosis*; e 0,925 para *C. tropicalis*. Estudos anteriores relataram índices de 0,94, obtido para isolados de *C. glabrata* provenientes de hospitais na Áustria e Alemanha (KLOTZ et al., 2016) e 0,99, em isolados de *C. parapsilosis* no Brasil (BARBEDO et al., 2015). Entretanto, valores menores já foram relatados, como 0,89, por Chillemi et al. (2016).

A técnica de MLST apresentou índices de discriminação de 1 para *C. albicans* e *C. tropicalis* e 0,911 para *C. glabrata*. Chou et al. (2007) relataram índice de discriminação de 0,916 para linhagens de *C. tropicalis* em Taiwan. Já Lin et al. (2007) relataram um valor inferior, de 0,85.

As três técnicas utilizadas apresentaram índices de discriminação satisfatórios para genotipagem das espécies estudadas. A técnica de MLST apresenta a vantagem de ser facilmente padronizada e robusta, permitindo a análise entre diferentes laboratórios (CHOU et al., 2007).

O dendrograma de similaridade genética gerado por PFGE apresentou dois grupos de linhagens com 100% de similaridade, todas da espécie *C. glabrata*. Em um dos grupos, as três linhagens foram isoladas de pacientes internados na mesma unidade. Quando essas linhagens foram submetidas ao MLP, duas delas foram consideradas com 100% de similaridade; já a terceira apresentou similaridade menor

que 10%. Entretanto, no MLP, outra linhagem, originada em outra unidade de internação, apresentou 100% de similaridade com as duas amostras.

Na técnica MLP, somente a espécie *C. parapsilosis* não apresentou grupos com similaridade de 100%. Embora as demais espécies tenham apresentado esse tipo de grupo, a similaridade de 100% não foi obtida na técnica de PFGE.

Analisando-se os índices de similaridade apresentados nos dendrogramas das diferentes espécies e técnicas, é possível concluir que a variabilidade genética dos isolados de *C. glabrata* incluídos nesse estudo foi menor que as demais espécies estudadas. Sabe-se que *C. albicans* e *C. tropicalis* são espécies diplóides com grande variabilidade devido à frequência de eventos de recombinação (JACOBSEN et al., 2008). Já *C. glabrata* é haplóide e se reproduz exclusivamente por reprodução assexuada, o que leva a menor variabilidade genética (GLÖCKNER; CORNELLY, 2015).

O banco de dados mundial de MLST disponível *online* torna possível a comparação entre linhagens estudadas no mundo todo. O DST 365 de *C. albicans*, SLV da linhagem 18 do presente trabalho, foi um dos clones mais prevalentes em crianças no trabalho de Wang et al. (2015). Entretanto, a linhagem 18 foi isolada de um adulto.

Os STs 3 e 7 de *C. glabrata* também foram frequentes entre as linhagens estudadas por Lin et al. (2007). Assim como ocorreu no presente trabalho, as linhagens apresentaram-se, em sua maioria, suscetíveis dose-dependente ao fluconazol e suscetíveis ao voriconazol.

Alguns DSTs de *C. tropicalis* podem ser associados à resistência aos azóis nessa espécie: os DSTs 98, 140, 376, 505, 506 e 507 (CHOU et al., 2007; WANG et al., 2016). No trabalho de Wang et al. (2016), o DST 346 reuniu linhagens resistentes ao fluconazol, o que não ocorreu com a linhagem 37 do presente trabalho, que foi relacionada como SLV do DST 346.

Finalmente, não foi possível correlacionar a origem dos isolados, bem como sua suscetibilidade antifúngica e produção de fatores de virulência com a genotipagem, o que também ocorreu em outros estudos (CHILLEMI et al., 2016; KLOTZ et al., 2016). Entretanto, utilizando as técnicas de genotipagem, outros autores puderam investigar a presença e origem de surtos (GUDUCUOGLU et al., 2016) e isolados recorrentes em um mesmo paciente (CHEN et al., 2005).

Os dados clínicos são essenciais em estudos epidemiológicos. No presente estudo, os dados obtidos nos prontuários dos pacientes permitiram uma análise do perfil dos pacientes acometidos por candidemias. A média de idade dos pacientes, obtida no presente estudo, está de acordo com o usualmente reportado. Motta et al. (2010) reportaram uma média de idade de 40 anos, enquanto Colombo et al. (2007) encontraram uma média de 42,9 anos. Embora o número de isolados de *C. orthopsilosis* seja pequeno, outros estudos também encontraram as mesmas informações: Blanco-Blanco et al. (2014) obtiveram mais isolados de *C. orthopsilosis* em neonatos e 75% dos pacientes com candidemia por *C. orthopsilosis* no trabalho de Taj-Aldeen et al. (2014) apresentavam menos de um ano de idade. Além disso, vários estudos apontam que a candidemia acomete mais homens que mulheres (MOTTA et al., 2010; CAGGIANO et al., 2015). Quanto aos pacientes de *C. orthopsilosis*, que em sua maioria são mulheres, o número reduzido de isolados (3) não permite maiores conclusões.

Os fatores de risco são comuns em pacientes com candidemia e, frequentemente, a antibioticoterapia é o fator mais encontrado. Caggiano et al. (2015) observaram que 86,8% dos pacientes estudados foram submetidos à antibioticoterapia, 86,3% apresentavam cateter e 34,3% nutrição parenteral. Ainda, Bassetti et al. (2015) reportaram 34,3% de procedimentos cirúrgicos, 69,1% de nutrição parenteral, 84,4% de dispositivos intravasculares e 91% de antibioticoterapia. Finalmente, Costa et al. (2014) observaram 97,9% de antibioticoterapia, 67% de sonda vesical, 53,6% de nutrição parenteral e 11,3% de neutropenia.

No presente trabalho, foi verificada uma relação entre o uso de sondas vesicais e óbito. Apesar do uso desses dispositivos ser muito comum, estes podem servir como superfície para o desenvolvimento de biofilmes de *Candida* e agir como fontes de disseminação (MCCARTHY; PAPPAS, 2016; PÉMAN; QUINDÓS, 2016). Sutcu et al. (2016) observaram que pacientes que fazem uso de sondas vesicais tem maior risco de desenvolver candidemia.

As doenças de base estão comumente presentes em casos de candidemia e todos os pacientes desse estudo apresentaram pelo menos uma doença desse tipo, das quais câncer sólido, diabetes, doenças gastrointestinais e hepáticas foram as mais prevalentes. Wille et al. (2013) observaram doenças de base em 97,4% dos

pacientes estudados, sendo que 31,7% apresentavam câncer e 7,9%, diabetes. No estudo de Bassetti et al. (2015), 34,8% dos pacientes foram acometidos por câncer sólido, 27,9% por diabetes, 12,3% por doenças hepáticas, 8,3% por doenças renais e 4,9% por doenças hematológicas.

Finalmente, a taxa de mortalidade total obtida nesse estudo foi de 52%, valor que está de acordo com outras reportadas: 39% (DE ROSA et al., 2015), 47,4% (BASSETTI et al., 2015) e 61% (COLOMBO et al., 2007). A espécie que apresentou a maior taxa foi *C. glabrata* (73%), seguida por *C. albicans* (51%), *C. tropicalis* (47%), *C. parapsilosis* (36%) e *C. orthopsilosis* (33%). A alta taxa de mortalidade, apresentada em casos de candidemia por *C. glabrata*, não é surpreendente, visto que essa espécie está geralmente relacionada a altas taxas: 100% (COLOMBO et al., 2007) e 53,8% (GUPTA; VARMA, 2015).

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem as seguintes conclusões:

- a) apesar da crescente prevalência de espécies não-*albicans*, a espécie *C. albicans* ainda é predominante. Entretanto, *C. glabrata* e *C. tropicalis* apresentam relevante prevalência como espécie causadora de candidemia no hospital estudado;
- b) apesar da resistência aos antifúngicos ser menos frequente que a resistência aos antibióticos, existem isolados de *Candida* spp. que apresentam suscetibilidade diminuída à caspofungina, fluconazol e voriconazol. Assim, o monitoramento do surgimento de resistência é essencial na prática clínica;
- c) a espécie *C. albicans* é a principal produtora de fatores de virulência;
- d) a variabilidade genética dos isolados de *C. glabrata* incluídos nesse estudo foi menor que as demais espécies estudadas;
- e) a candidemia atinge pacientes de todas as idades e principalmente homens;
- f) os fatores de risco e doenças de base são comuns nos pacientes acometidos por candidemias;
- g) a taxa de mortalidade, relacionada à candidemia, continua elevada;
- h) Os resultados obtidos no estudo são importantes para o conhecimento das características da candidemia no hospital estudado e podem ser utilizados na prática clínica para orientar o tratamento empírico dessa doença, bem como para o conhecimento do perfil dos pacientes acometidos por candidemias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

¹ De acordo com a Associação de Normas Técnicas. NBR 6023

ABBES, S. et al. *Candida glabrata* strain relatedness by new microsatellite markers. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, n. 1, p. 83-91, Jan 2012. ISSN 1435-4373. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21598073>>.

ABI-CHACRA, É. et al. Phenotypical properties associated with virulence from clinical isolates belonging to the *Candida parapsilosis* complex. **FEMS Yeast Res**, v. 13, n. 8, p. 831-48, Dec 2013. ISSN 1567-1364. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24103069>>.

ABDELJELIL, J. et al. Molecular typing of *Candida albicans* isolates from patients and health care workers in a neonatal intensive care unit. **J Appl Microbiol**, v. 111, n. 5, p. 1235-49, Nov 2011. ISSN 1365-2672. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21824239>>.

ADACHI, H. et al. Genotyping of *Candida albicans* by Fragment Analysis of Microsatellites Combined with 25S rDNA and RPS-based Strategies. **Journal of Medical Mycology**, n. 3, v. 50, p. 167-174, 2009. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjmm/50/3/50_3_167/_pdf>.

ALBATAINEH, M. T. et al. Update from the Laboratory: Clinical Identification and Susceptibility Testing of Fungi and Trends in Antifungal Resistance. **Infect Dis Clin North Am**, v. 30, n. 1, p. 13-35, Mar 2016. ISSN 1557-9824. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26739605>>.

ALCOBA-FLÓREZ, J. et al. Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 8, p. 4107-11, Aug 2005. ISSN 0095-1137. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16081957>>.

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>>.

BATISTA, G. C. et al. Oral colonization: a possible source for candidemia in low-weight neonates. **J Mycol Med**, v. 24, n. 2, p. 81-6, Jun 2014. ISSN 1773-0449. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24440610>>.

BARBEDO, L. S. et al. Different scenarios for *Candida parapsilosis* fungaemia reveal high numbers of mixed *C. parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* infections. **J Med Microbiol**, v. 64, n. Pt 1, p. 7-17, Jan 2015. ISSN 1473-5644. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25351711>>.

BASSETTI, M. et al. Clinical and therapeutic aspects of candidemia: a five year single centre study. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0127534, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26010361>>.

BERDAL, J. E. et al. Nosocomial candidemia; risk factors and prognosis revisited; 11 years experience from a Norwegian secondary hospital. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e103916, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25079361>>.

BLANCO-BLANCO, M. T. et al. *Candida orthopsilosis* fungemias in a Spanish tertiary care hospital: incidence, epidemiology and antifungal susceptibility. **Rev Iberoam Micol**, v. 31, n. 2, p. 145-8, 2014 Apr-Jun 2014. ISSN 2173-9188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23680638> >.

CAGGIANO, G. et al. *Candida* Bloodstream Infections in Italy: Changing Epidemiology during 16 Years of Surveillance. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 256580, 2015. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26064890> >.

CALANDRA, T. et al. Diagnosis and management of invasive candidiasis in the ICU: an updated approach to an old enemy. **Crit Care**, v. 20, n. 1, p. 125, 2016. ISSN 1466-609X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27230564>>.

CANTEY, J. B.; MILSTONE, A. M. Bloodstream infections: epidemiology and resistance. **Clin Perinatol**, v. 42, n. 1, p. 1-16, vii, Mar 2015. ISSN 1557-9840. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25677993>>

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: <<http://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>>.

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 2005a. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15713608> >.

_____. The molecular epidemiology of serial *Candida tropicalis* isolates from ICU patients as revealed by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. **Infect Genet Evol**, v. 9, n. 5, p. 912-20, Sep 2009. ISSN 1567-7257. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19540937>>;

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: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20851551>>.

CHILLEMI, V. et al. Multilocus microsatellite analysis of European and African *Candida glabrata* isolates. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 35, n. 6, p. 885-92, Jun 2016. ISSN 1435-4373. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26946511> >.

CHOU, H. H. et al. Multilocus sequence typing of *Candida tropicalis* shows clonal cluster enriched in isolates with resistance or trailing growth of fluconazole. **Diagn**

Microbiol Infect Dis, v. 58, n. 4, p. 427-33, Aug 2007. ISSN 0732-8893. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17509791>>

CLEVELAND, A. A. et al. Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008-2013: results from population-based surveillance. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0120452, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25822249>>.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. Approved Standard M27-A3. Wayne: CLSI, 2008.

_____. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Third Informational Supplement**. CLSI document M27-S3. Wayne: CLSI, 2008.

_____. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Forth Informational Supplement**. CLSI document M27-S4. Wayne: CLSI, 2012.

COLOMBO, A. L. et al. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 28, n. 5, p. 570-6, May 2007. ISSN 0899-823X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17464917>>.

_____. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Braz J Infect Dis**, v. 17, n. 3, p. 283-312, 2013 May-Jun 2013. ISSN 1678-4391. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23693017>>.

_____. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. **Intensive Care Med**, v. 40, n. 10, p. 1489-98, Oct 2014. ISSN 1432-1238. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25082359>>.

CONSTANTE, C. C. et al. Different risk factors for candidemia occur for *Candida* species belonging to the *C. parapsilosis* complex. **Med Mycol**, v. 52, n. 4, p. 403-6, May 2014. ISSN 1460-2709. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24782105>>.

CORREIA, A. et al. *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 56, n. Pt 1, p. 313-7, Jan 2006. ISSN 1466-5026. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16403904>>.

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: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25103140>>.

DESNO-OLLIVIER, M. et al. Clonal Population of Flucytosine-Resistant *Candida tropicalis* from Blood Cultures, Paris, France. **Emerging Infectious Diseases**, n. 4, v. 14, p. 557-565, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2570934/>>.

DE LUCA, C. et al. Candidemia: species involved, virulence factors and antimycotic susceptibility. **New Microbiol**, v. 35, n. 4, p. 459-68, Oct 2012. ISSN 1121-7138. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23109013>>.

DE ROSA, F. G. et al. The Effect on mortality of fluconazole or echinocandins treatment in candidemia in internal medicine wards. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0125149, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25938486>>.

FAVERO, D. et al. Hemolytic factor production by clinical isolates of *Candida* species. **Curr Microbiol**, v. 68, n. 2, p. 161-6, Feb 2014. ISSN 1432-0991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24048697>>.

FENG, X. et al. Identification and differentiation of *Candida parapsilosis* complex species by use of exon-primed intron-crossing PCR. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 5, p. 1758-61, May 2014. ISSN 1098-660X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24622093>>.

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

GLÖCKNER, A.; CORNELLY, O. A. *Candida glabrata* - unique features and challenges in the clinical management of invasive infections. **Mycoses**, v. 58, n. 8, p. 445-50, Aug 2015. ISSN 1439-0507. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26207423>>.

GONG, X. et al. Invasive candidiasis in intensive care units in China: Risk factors and prognoses of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* infections. **Am J Infect Control**, Jan 2016. ISSN 1527-3296. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26781222>>.

GUDUCUOGLU, H. et al. *Candida albicans* outbreak associated with total parenteral nutrition in the neonatal unit. **Indian J Med Microbiol**, v. 34, n. 2, p. 202-7, 2016 Apr-Jun 2016. ISSN 1998-3646. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27080773>>.

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>>.

GUPTA, A.; VARMA, A. *Candida glabrata* candidemia: An emerging threat in critically ill patients. **Indian J Crit Care Med**, v. 19, n. 3, p. 151-4, Mar 2015. ISSN 0972-5229. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25810610> >.

HEO, S. M. et al. Genetic relationships between *Candida albicans* strains isolated from dental plaque, trachea, and bronchoalveolar lavage fluid from mechanically ventilated intensive care unit patients. **J Oral Microbiol**, v. 3, 2011. ISSN 2000-2297. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21731911>>.

HOFFMANN-SANTOS, H. D. et al. Six-year trend analysis of nosocomial candidemia and risk factors in two intensive care hospitals in Mato Grosso, midwest region of Brazil. **Mycopathologia**, v. 176, n. 5-6, p. 409-15, Dec 2013. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24113801> >.

HUNTER, S. B. et al. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 3, p. 1045-50, Mar 2005. ISSN 0095-1137. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15750058>>.

HUNTER, P. R.; FRASER, C. A. Application of a numerical index of discriminatory power to a comparison of four physiochemical typing methods for *Candida albicans*. **J Clin Microbiol**, v. 27, n. 10, p. 2156-60, Oct 1989. ISSN 0095-1137. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2685017>>.

JACOBSEN, M. D. et al. Molecular phylogenetic analysis of *Candida tropicalis* isolates by multi-locus sequence typing. **Fungal Genet Biol**, v. 45, n. 6, p. 1040-2, Jun 2008. ISSN 1096-0937. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18440253>>.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochim Pol**, v. 56, n. 2, p. 211-24, 2009. ISSN 1734-154X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19543556>>.

KHADRAOUI, N. et al. Pulsed Field Gel Electrophoresis types of *Candida albicans* isolates from an intensive care unit in a Tunisian hospital. **Ann Biol Clin (Paris)**, v. 69, n. 3, p. 289-94, 2011 May-Jun 2011. ISSN 0003-3898. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21659044> >.

KLOTZ, U. et al. Echinocandin resistance and population structure of invasive *Candida glabrata* isolates from two university hospitals in Germany and Austria. **Mycoses**, v. 59, n. 5, p. 312-8, May 2016. ISSN 1439-0507. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26806376> >.

KOEHLER, P.; CORNELLY, O. A. Contemporary Strategies in the Prevention and Management of Fungal Infections. **Infect Dis Clin North Am**, v. 30, n. 1, p. 265-75, Mar 2016. ISSN 1557-9824. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26739606>>.

LI, D. et al. Molecular surveillance of candidemia due to *Candida albicans* among cancer patients during 2009 to 2013 by microsatellite typing. **Microb Pathog**, v. 81, p. 28-32, Apr 2015. ISSN 1096-1208. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25769820> >.

LIN, C. Y. et al. Assessment of *Candida glabrata* strain relatedness by pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 8, p. 2452-9, Aug 2007. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17553975> >.

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L. P.; YAU, J. Y. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 8, p. 2971-4, Aug 2001. ISSN 0095-1137. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11474025>>.

MANE, A. et al. Increased expression of virulence attributes in oral *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-positive individuals. **J Med Microbiol**, v. 61, n. Pt 2, p. 285-90, Feb 2012. ISSN 1473-5644. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21959206> >.

MARTÍNEZ, J. M. et al. Identification of pathogenic yeast species by polymerase chain reaction amplification of the RPS0 gene intron fragment. **J Appl Microbiol**, v. 108, n. 6, p. 1917-27, Jun 2010. ISSN 1365-2672. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19968730> >.

MATTEI, A. S. et al. Determination of germ tube, phospholipase, and proteinase production by bloodstream isolates of *Candida albicans*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46, n. 3, p. 340-2, 2013 May-Jun 2013. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23856861> >.

MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P. G. Invasive Candidiasis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 30, n. 1, p. 103-24, Mar 2016. ISSN 1557-9824. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26739610> >.

MIRANDA, L. et al. *Candida parapsilosis* candidaemia in a neonatal unit over 7 years: a case series study. **BMJ Open**, v. 2, n. 4, 2012. ISSN 2044-6055. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22869093> >.

MODRZEWSKA, B.; KURNATOWSKI, P. Selected pathogenic characteristics of fungi from the genus *Candida*. **Ann Parasitol**, v. 59, n. 2, p. 57-66, 2013. ISSN 2299-0631. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24171298>>.

MOTTA, A. L. et al. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. **Braz J Infect Dis**, v. 14, n. 5, p. 441-8, 2010 Sep-Oct 2010. ISSN 1678-4391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21221471> >.

NEGRI, M. et al. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, n. 7, p. 1399-412, Jul 2012. ISSN 1435-4373. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22037823> >.

NETT, J. E.; ANDES, D. R. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. **Infect Dis Clin North Am**, v. 30, n. 1, p. 51-83, Mar 2016. ISSN 1557-9824. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26739608> >.

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>>.

PEMÁN, J. et al. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 5, p. 1181-7, May 2012. ISSN 1460-2091. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22351683> >.

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> >.

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: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26120512> >.

PFALLER, M. A. et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine, and itraconazole and *Candida* spp. as determined by CLSI broth microdilution. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 6, p. 2040-6, Jun 2012. ISSN 1098-660X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22461672>>.

QUINDÓS, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. **Rev Iberoam Micol**, v. 31, n. 1, p. 42-8, 2014 Jan-Mar 2014. ISSN 2173-9188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24270071> >.

RICETO, É. et al. Enzymatic and hemolytic activity in different *Candida* species. **Rev Iberoam Micol**, v. 32, n. 2, p. 79-82, 2015 Apr-Jun 2015a. ISSN 2173-9188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24704439> >.

RODRIGUES, C. F.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 33, n. 5, p. 673-88, May 2014. ISSN 1435-4373. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24249283> >.

ROMEO, O. et al. A multiplex PCR protocol for rapid identification of *Candida glabrata* and its phylogenetically related species *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis*. **J Microbiol Methods**, v. 79, n. 1, p. 117-20, Oct 2009. ISSN 1872-8359. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19635503>>.

SABINO, R. et al. New Polymorphic Microsatellite Markers Able to Distinguish among *Candida parapsilosis* Sensus Stricto Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 5,

v. 48, p. 1677–1682, 2010. Disponível em: <
<http://jcm.asm.org/content/48/5/1677.full.pdf>>.

SAINT-EXUPÉRY, A. **O pequeno príncipe**. L&PM. Porto Alegre, 2015.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W. 2001. **Molecular Cloning: A laboratory Manual**. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖRL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58 Suppl 2, p. 2-13, Jun 2015. ISSN 1439-0507. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26033251> >.

SARDI, J. C. et al. A Mini Review of *Candida* Species in Hospital Infection: Epidemiology, Virulence Factor and Drugs Resistance and Prophylaxis. **Trop Med Surg**, v. 1, 2013. ISSN 2329-9088. Disponível em: <
<http://www.esciencecentral.org/journals/a-mini-review-of-candida-species-in-hospital-infection-2329-9088.1000141.php?aid=18547>>.

SARIGUZEL, F. et al. Investigation of the relationship between virulence factors and genotype of *Candida* spp. isolated from blood cultures. **J Infect Dev Ctries**, v. 9, n. 8, p. 857-64, Aug 2015. ISSN 1972-2680. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26322878> >.

SENEVIRATNE, C. J. et al. Antifungal susceptibility and virulence attributes of bloodstream isolates of *Candida* from Hong Kong and Finland. **Mycopathologia**, v. 172, n. 5, p. 389-95, Nov 2011. ISSN 1573-0832. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21744043> >.

SHIN, J. H.; et al. Electrophoretic karyotype analysis of sequential *Candida parapsilosis* isolates from patients with persistent or recurrent fungemia. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 4, p. 1258-63, Apr 2001. ISSN 0095-1137. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283038> >.

SONG, E. S. et al. Multilocus sequence typing for the analysis of clonality among *Candida albicans* strains from a neonatal intensive care unit. **Med Mycol**, v. 52, n. 6, p. 653-8, Aug 2014. ISSN 1460-2709. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25037934>>.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 204237, 2013. ISSN 2314-6141. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23878798> >.

SUTCU, M. et al. Epidemiologic and microbiologic evaluation of nosocomial infections associated with *Candida* spp. in children: A multicenter study from Istanbul, Turkey. **Am J Infect Control**, Jun 2016. ISSN 1527-3296. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27339794> >.

TAJ-ALDEEN, S. J. et al. Epidemiology of candidemia in Qatar, the Middle East: performance of MALDI-TOF MS for the identification of *Candida* species, species distribution, outcome, and susceptibility pattern. **Infection**, v. 42, n. 2, p. 393-404, Apr 2014. ISSN 1439-0973. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24352810>>.

TAN, B. H. et al. Incidence and species distribution of candidaemia in Asia: a laboratory-based surveillance study. **Clin Microbiol Infect**, v. 21, n. 10, p. 946-53, Oct 2015. ISSN 1469-0691. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26100373>>.

TAY, S. T. et al. Proteinase, phospholipase, biofilm forming abilities and antifungal susceptibilities of Malaysian *Candida* isolates from blood cultures. **Med Mycol**, v. 49, n. 5, p. 556-60, Jul 2011. ISSN 1460-2709. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21254967>>.

TELLAPRAGADA, C. et al. Antifungal susceptibility patterns, in vitro production of virulence factors, and evaluation of diagnostic modalities for the speciation of pathogenic *Candida* from blood stream infections and vulvovaginal candidiasis. **J Pathog**, v. 2014, p. 142864, 2014. ISSN 2090-3057. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25110589>>.

VALLABHANENI, S. et al. The Global Burden of Fungal Diseases. **Infect Dis Clin North Am**, v. 30, n. 1, p. 1-11, Mar 2016. ISSN 1557-9824. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26739604>>.

VIDOTTO, V. et al. Differences in extracellular enzymatic activity between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates. **Rev Iberoam Micol**, v. 21, n. 2, p. 70-4, Jun 2004. ISSN 1130-1406. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15538830>>.

WANG, S. H. et al. Molecular epidemiology of invasive *Candida albicans* at a tertiary hospital in northern Taiwan from 2003 to 2011. **Med Mycol**, v. 53, n. 8, p. 828-36, Nov 2015. ISSN 1460-2709. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26333357>>.

WANG, Y. et al. Multilocus sequence typing of *Candida tropicalis* shows clonal cluster enrichment in azole-resistant isolates from patients in Shanghai, China. **Infect Genet Evol**, v. 44, p. 418-24, Oct 2016. ISSN 1567-7257. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27456280>>.

WHIBLEY, N.; GAFFEN, S. L. Beyond *Candida albicans*: Mechanisms of immunity to non-albicans *Candida* species. **Cytokine**, v. 76, n. 1, p. 42-52, Nov 2015. ISSN 1096-0023. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26276374>>.

WILLE, M. P. et al. Historical trends in the epidemiology of candidaemia: analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, May 2013. ISSN 1678-8060. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23778668>>.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Ther Clin Risk Manag**, v. 10, p. 95-105, 2014. ISSN 1176-6336. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24611015>>.

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: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26319940>>.

Apêndice A – Isolados obtidos e utilizados nesse estudo.

Isolado	Espécie	Ano de isolamento
1	<i>C. albicans</i>	2014
2	<i>C. albicans</i>	2014
3	<i>C. albicans</i>	2014
4*	<i>C. albicans</i>	2014
5	<i>C. parapsilosis</i>	2014
6*	<i>C. glabrata</i>	2014
7*	<i>C. glabrata</i>	2014
8	<i>C. albicans</i>	2014
9	<i>C. parapsilosis</i>	2014
10	<i>C. albicans</i>	2014
11*	<i>C. tropicalis</i>	2014
12*	<i>C. albicans</i>	2014
13	<i>C. albicans</i>	2014
14	<i>C. tropicalis</i>	2014
15	<i>C. albicans</i>	2014
16*	<i>C. glabrata</i>	2014
17	<i>C. tropicalis</i>	2014
18*	<i>C. albicans</i>	2014
19*	<i>C. albicans</i>	2014
20*	<i>C. glabrata</i>	2014
21*	<i>C. glabrata</i>	2014
22	<i>C. tropicalis</i>	2014
23	<i>C. albicans</i>	2014
24	<i>C. glabrata</i>	2014
25*	<i>C. glabrata</i>	2014
26*	<i>C. tropicalis</i>	2014
27	<i>C. albicans</i>	2014
28*	<i>C. glabrata</i>	2014
29*	<i>C. albicans</i>	2015

continua

continuação

Isolado	Espécie	Ano de isolamento
30	<i>C. parapsilosis</i>	2015
31	<i>C. parapsilosis</i>	2015
32	<i>C. albicans</i>	2015
33*	<i>C. albicans</i>	2015
34*	<i>C. tropicalis</i>	2015
35	<i>C. glabrata</i>	2015
36	<i>C. parapsilosis</i>	2015
37*	<i>C. tropicalis</i>	2015
38	<i>C. albicans</i>	2015
39	<i>C. parapsilosis</i>	2015
40*	<i>C. albicans</i>	2015
41	<i>C. albicans</i>	2015
42	<i>C. orthopsilosis</i>	2015
43	<i>C. albicans</i>	2015
44	<i>C. parapsilosis</i>	2015
45	<i>C. albicans</i>	2015
46*	<i>C. glabrata</i>	2015
47	<i>C. parapsilosis</i>	2015
48	<i>C. glabrata</i>	2015
49	<i>C. parapsilosis</i>	2015
50*	<i>C. glabrata</i>	2015
51	<i>C. albicans</i>	2015
52	<i>C. parapsilosis</i>	2015
53	<i>C. albicans</i>	2015
54	<i>C. albicans</i>	2015
55	<i>C. tropicalis</i>	2015
56	<i>C. albicans</i>	2015
57	<i>C. orthopsilosis</i>	2015
58*	<i>C. albicans</i>	2015

continua

conclusão

Isolado	Espécie	Ano de isolamento
59*	<i>C. tropicalis</i>	2015
60	<i>C. albicans</i>	2015
61*	<i>C. albicans</i>	2015
62*	<i>C. tropicalis</i>	2015
63	<i>C. orthopsilosis</i>	2015
64*	<i>C. tropicalis</i>	2015
65	<i>C. glabrata</i>	2015
66	<i>C. parapsilosis</i>	2015
67*	<i>C. albicans</i>	2015
68*	<i>C. albicans</i>	2015
69*	<i>C. albicans</i>	2015
70	<i>C. tropicalis</i>	2015
71*	<i>C. tropicalis</i>	2015
72*	<i>C. glabrata</i>	2015
74*	<i>C. albicans</i>	2015
75	<i>C. glabrata</i>	2015
76*	<i>C. tropicalis</i>	2015
77	<i>C. albicans</i>	2015
78*	<i>C. albicans</i>	2015
79	<i>C. albicans</i>	2015
80*	<i>C. tropicalis</i>	2015

* Linhagens selecionadas para a técnica de MLST

Fonte: o autor

Apêndice B – *Diploid sequence types* das amostras de *Candida albicans* selecionadas e *single locus variants* relacionados.

Linhagem	DST	Quantidade de SLVs	DSTs <i>single locus variants</i>
4	3169	3	1299, 2084 e 2595
12	3178	0	-
18	602	14	365, 1029, 1118, 1171, 1360, 1624, 1625, 1637, 1951, 2753, 2221, 2693, 2900 e 3012
19	415	4	416, 2592, 2959 e 3175
29	3170	0	-
33	3171	0	-
40	3172	7	79, 185, 426, 581, 2880, 3063 e 3156
58	3179	8	37, 116, 314, 581, 586, 1253, 2140 e 2176.
61	3173	0	-
67	3174	0	-
68	1118	3	602, 1754, 3035
69	3175	3	415, 868 e 2592
74	3176	0	-
78	3177	2	278 e 554

Fonte: o autor

Apêndice C – *Sequence types* das amostras de *Candida glabrata* selecionadas e *single locus variants* relacionados.

Linhagem	ST	Quantidade de SLVs	STs <i>single locus variants</i>
6	10000*	1	3
7	3	8	33, 37, 42, 63, 68, 70, 72 e 10000
16	75	1	78
20	3	8	33, 37, 42, 63, 68, 70, 72 e 10000
21	7	3	30, 41 e 66
25	16	4	35, 38, 52 e 60
28	10001*	0	-

continua

conclusão

Linhagem	ST	Quantidade de SLVs	STs <i>single locus variants</i>
46	15	0	-
50	7	3	30, 41 e 66
72	3	8	33, 37, 42, 63, 68, 70, 72 e 10000

Caracteres em vermelho: números de STs provisórios. O banco de dados encontra-se indisponível para novas submissões.

Fonte: o autor

Apêndice D – *Diploid sequence types* das amostras de *Candida tropicalis* selecionadas e *single locus variants* relacionados.

Linhagem	DST	Quantidade de SLVs	DSTs <i>single locus variants</i>
11	669	0	-
26	670	6	42, 124, 232, 239, 240 e 262
34	671	0	-
37	318	3	264, 310 e 346
59	672	3	50, 256 e 677
62	252	0	-
64	673	0	-
71	674	1	676
76	675	2	14 e 221
80	676	1	674

Fonte: o autor

Apêndice E – Diagrama de similaridade genética contendo DSTs de *Candida albicans* depositados no banco de dados mundial de MLST.

Construído em 18/01/17

● DSTs encontrados no presente trabalho

Fonte: o autor

Apêndice F – Diagrama de similaridade genética contendo DSTs de *Candida glabrata* depositados no banco de dados mundial de MLST.

Construído em 25/01/17.

● DSTs encontrados no presente trabalho.

● STs provisórios.

Fonte: o autor

Apêndice G – Diagrama de similaridade genética contendo DSTs de *Candida tropicalis* depositados no banco de dados mundial de MLST.

Construído em 23/01/17.

● DSTs encontrados no presente trabalho.

Fonte: o autor

Anexo A – Ágar BSA.

Ágar	2% (p/v)
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,62 mM
K ₂ HPO ₄	28,7 mM
NaCl	171 mM
Extrato de levedura	0,2% (p/v)
Glicose	4% (p/v)
BSA	0,5% (p/v)

Dissolver o ágar em água destilada (140 mL para 200 mL de meio de cultura) e esterilizar em autoclave a 121°C, 1kgf/cm², durante 20 minutos. Dissolver o restante dos componentes em água destilada (60 mL para 200 mL de meio de cultura), ajustar o pH para 3,5 com HCl 1M e esterilizar por filtração. Acrescentar a solução ao ágar fundido no momento do uso.

Anexo B – Ágar fosfolipase.

Ágar Sabouraud	quantidade indicada pelo fabricante
NaCl	1 M
CaCl ₂	5 mM
Emulsão de ovo estéril	8% (v/v)

Dissolver o ágar Sabouraud, o NaCl e o CaCl₂ em água destilada e esterilizar em autoclave a 121°C, 1kgf/cm², durante 20 minutos. Acrescentar a emulsão de ovo no momento do uso.

Anexo C – Ágar Sabouraud suplementado com glicose e sangue de carneiro.

Ágar Sabouraud	quantidade indicada pelo fabricante
Glicose	3% (p/v)
Sangue de carneiro	7% (v/v)

Dissolver o ágar Sabouraud e a glicose em água destilada e esterilizar em autoclave a 121°C, 1kgf/cm², durante 20 minutos. Acrescentar o sangue de carneiro no momento do uso.

Anexo D – Tampão de extração de DNA genômico.

Tris-HCl, pH 8,5	200 mM
NaCl	250 mM
EDTA	25 mM
SDS	0,5% (p/v)

Dissolver todos os componentes em água destilada.

Anexo E – Liticase.

Liticase	1250 UI/mL
Glicerol	50% (v/v)
Na ₃ PO ₄	10 mM

Dissolver todos os componentes em água livre de nuclease. Armazenar a -20°C.

Anexo F – Solução de agarose *Seakem gold*.

Agarose <i>Seakem gold</i>	2 (p/v)
EDTA 125 mM, pH 7,5	25% (v/v)

Dissolver todos os componentes em água deionizada.

Anexo G – Tampão NET.

Tris 1 M, pH 7,5	1 mL
------------------	------

EDTA 0,5 M pH 8	90 mL
Laurilsarcosine 10%	10 mL

Misturar todos os componentes no momento do uso.

Anexo H – Tampão CHEF TE.

EDTA 0,5M, pH 7	13 mL
EDTA 0,5M pH 8	13 mL
Tris 1M pH 7	6,5 mL
Tris 1 M pH 8	6,5 mL
Água deionizada	q.s.p. 130 mL

Misturar todos os componentes no momento do uso.

Anexo I – Tampão DNS.

Tris 1M, pH 8	10 mL
MgCl ₂	500 µL
Água deionizada	q.s.p. 100 mL

Misturar todos os componentes no momento do uso.

Anexo J – Tampão de digestão.

Tampão R 10X	1x
<i>Paul</i>	20 U

Adicionar todos os componentes à água livre de nuclease no momento do uso.

Anexo K – TE.

EDTA 1 M, pH 8	1 mL
Tris 1 M, pH 7,5	10 mL
Água deionizada	q.s.p. 1000 mL

Misturar todos os componentes no momento do uso.

Anexo L – Tampão TBE 0,5x.

EDTA	0,5 mM
Tris	50 mM
Ácido bórico	50 mM

Dissolver os componentes em água deionizada.